

**Strukturelle und funktionelle  
Charakterisierung  
von redoxaktiven Proteinen  
des Malariaparasiten  
*Plasmodium falciparum***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl. oec. troph. Christine Nickel

Herborn

angefertigt am Institut für Ernährungswissenschaft,  
Professur für Biochemie der Ernährung des Menschen  
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und  
Umweltmanagement  
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Klug

2. Gutachterin: Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg

„Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem  
Stolz; denn sie zeigt ihm seine Grenzen.“  
(Albert Schweizer)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf).....	1
1.1.1 <i>Plasmodium falciparum</i> und Malaria.....	1
1.1.2 Besonderheiten des Organismus.....	5
1.1.2.1 Der Apicoplast.....	5
1.1.2.2 Hämoglobin-Abbau.....	9
1.2 Antioxidative Systeme.....	11
1.2.1 Das Glutathion-System.....	12
1.2.1.1 Glutathion (GSH) und Glutathionreduktase (GR).....	12
1.2.1.2 Glutaredoxin (Grx).....	13
1.2.2 Das Thioredoxin-System.....	15
1.2.2.1 Thioredoxinreduktase (TrxR).....	15
1.2.2.2 Thioredoxin.....	17
1.2.2.3 Peroxiredoxine (Prx).....	21
1.2.2.3.1 Einteilung.....	22
1.2.2.3.2 Mechanismus und Kinetik.....	23
1.2.2.3.3 Struktur und Oligomerisierung.....	25
1.2.2.3.4 Reduzierende Substrate.....	27
1.2.2.3.5 Oxidierende Substrate.....	28
1.2.2.3.6 Regulation und physiologische Funktion.....	29
1.2.2.3.7 Situation in <i>Plasmodium falciparum</i> .....	30
1.3 Zielsetzung.....	31
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.1 Material.....	32
2.1.1 Chemikalien.....	32
2.1.2 Geräte.....	33
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.4 Material zur Säulenchromatographie.....	34
2.1.5 Größenstandards.....	34
2.1.5.1 DNA-Marker.....	34
2.1.5.2 Protein-Marker.....	34
2.1.6 Molekularbiologische Reagenziensätze.....	34
2.1.7 Proteinbiochemische Reagenziensätze.....	34
2.1.8 Material zur Kristallisation.....	35
2.1.9 Plasmide.....	35
2.1.10 Enzyme.....	35
2.1.11 Bakterienstämme.....	36
2.1.12 Lösungen.....	37
2.1.12.1 Stammlösungen.....	37

2.1.12.2 Medien.....	37
2.1.12.3 Puffer.....	37
2.1.12.3.1 Puffer zur Plasmidisolierung.....	37
2.1.12.3.2 Präparations- und Säulenpuffer.....	38
2.1.12.3.3 Assay-Puffer.....	38
2.1.12.4 Elektrophorese- und Blottingpuffer.....	39
2.1.12.5 Kristallisationspuffer.....	41
2.2 Methoden.....	42
2.2.1 Mikro- und Molekularbiologische Methoden.....	42
2.2.1.1 Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	42
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	42
2.2.1.3 Klonierung.....	44
2.2.1.3.1 Restriktion.....	44
2.2.1.3.2 Ligation.....	45
2.2.1.3.3 Zielgerichtete Mutagenese ( <i>site-directed mutagenesis</i> ).....	45
2.2.1.4 Transformation in <i>Escherichia coli</i> .....	46
2.2.1.4.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Calciumchlorid-Methode).....	46
2.2.1.4.2 Transformation.....	46
2.2.1.4.3 Selektion / Identifizierung positiver Klone.....	46
2.2.1.4.4 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> .....	47
2.2.1.5 Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	47
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	48
2.2.2.1 Proteinreinigung.....	48
2.2.2.1.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten.....	48
2.2.2.1.2 Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose.....	48
2.2.2.1.3 Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose.....	48
2.2.2.1.4 Kontrolle mittels SDS-PAGE.....	49
2.2.2.2 Proteinanalyse.....	51
2.2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	51
2.2.2.2.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration.....	51
2.2.2.2.3 Immunologischer Proteinnachweis (Western Blot).....	53
2.2.2.3 Enzymkinetik.....	54
2.2.2.3.1 DTNB-Bestimmung.....	54
2.2.2.3.2 Insulin-Assay.....	54
2.2.2.3.3 TrxR-Assay.....	55
2.2.2.3.4 Trx-Endpunktbestimmung.....	56
2.2.2.3.5 TPx-Assay.....	56
2.2.2.3.6 GR-Assay.....	56
2.2.2.3.7 HEDS-Assay.....	57
2.2.2.3.8 GrxPx-Assay.....	57
2.2.2.3.9 Lip-DH-Assay.....	57
2.2.2.3.10 Berechnung kinetischer Parameter.....	57
2.2.2.4 Kristallisation.....	59
2.2.2.4.1 Kristallisations-Screening.....	59
2.2.2.4.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen.....	59
2.2.3 Anzucht von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	60
2.2.3.1 Kultivierung.....	60
2.2.3.2 Synchronisation der Kulturen.....	60
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
3.1 Thioredoxine und Thioredoxin-ähnliche Proteine aus Pf.....	61

3.1.1	<i>Thioredoxin-like protein1</i> (Tlp1) .....	61
3.1.1.1	Klonierung .....	61
3.1.1.2	Überexpression und Reinigung .....	62
3.1.1.3	Biochemische Untersuchungen mit Tlp1 .....	62
3.1.2	<i>Thioredoxin-like protein2</i> (Tlp2) .....	64
3.1.2.1	Klonierungen .....	64
3.1.2.2	Überexpression .....	65
3.1.2.3	<i>In vitro</i> -Translation .....	68
3.1.2.4	Klonierung, Überexpression und Reinigung der MBP-Tlp2-Fusion .....	68
3.1.3	Thioredoxin 2 (Trx2).....	71
3.1.3.1	Klonierungen .....	71
3.1.3.2	Überexpression und Reinigung von Trx2k; biochemische Interaktionen .....	72
3.1.3.3	Überexpression und vorläufige Charakterisierung des Trx2sk .....	74
3.1.4	Thioredoxin 3 (Trx3).....	75
3.1.4.1	Klonierung, Expression und Reinigung .....	75
3.1.4.2	Vorläufige Redox-Ergebnisse .....	77
3.2	Herstellung des PfTrx1 ohne His-tag (Trx1-His) .....	78
3.2.1	Herstellung eines pQE30PfTrx1-Konstrukts ohne His-tag.....	78
3.2.2	Überexpression und Reinigung des tag-freien PfTrx1 .....	79
3.2.3	Kristallansätze .....	80
3.3	Herstellung verschiedener PfTrxR-Formen .....	81
3.3.1	N-terminal verlängerte, „alternative“ PfTrxR.....	81
3.3.1.1	Klonierung, Expression und Reinigung .....	81
3.3.1.2	Herstellung einer altPfTrxR ohne His-tag.....	82
3.3.2	N-terminal verkürzte PfTrxR .....	83
3.3.2.1	Expression und Reinigung .....	83
3.3.3	PfTrxR ohne His-tag .....	84
3.3.3.1	Expression und Reinigung .....	84
3.3.3.2	Kristallisation der PfTrxR-His .....	85
3.3.4	Inhibitormessungen an PfTrxR .....	86
3.3.5	Inhibitortests an <i>Plasmodium</i> -Kulturen .....	88
3.4	Enzymaktivitätstests mit bekannten Redox-Proteinen aus <i>Plasmodium falciparum</i> .....	90
3.4.1	Reduktion von Peroxiden durch Trx bzw. Grx .....	90
3.4.2	Reduktion von DHA durch das Trx-System bzw. Grx .....	90
3.4.3	Reduktion von Liponsäure/Liponamid .....	92
3.5	PfAOP .....	94
3.5.1	Identifizierung der Sequenz von AOP .....	94
3.5.2	Klonierung des AOP-Gens.....	95
3.5.3	Klonierung und Überexpression der verkürzten Sequenz AOPoS .....	95
3.5.4	DTNB-Titration mit AOPoS .....	96
3.5.5	Qualitative Untersuchungen mit AOPoS .....	97
3.5.6	Klonierung der Sequenz für das „reife“ AOP.....	97
3.5.7	Expression und Reinigung von AOPsk.....	98
3.5.8	DTNB-Titration mit AOPsk.....	98
3.5.9	Enzymkinetische Charakterisierung von AOPsk .....	99
3.5.10	pH-Verhalten.....	102
3.5.11	Reduktion von AOPsk durch Plrx.....	103
3.5.12	Qualitative Untersuchungen zur Funktion von AOPsk.....	106
3.5.13	Oligomerisierung / FPLC-Verhalten.....	107
3.5.14	Kristallisation .....	108

3.5.15	Intrazelluläres Targeting .....	110
3.6	Charakterisierung des erweiterten Substratspektrums der Pf-Thioredoxinperoxidase1 (PfTPx1).....	111
3.6.1	Ermittlung der Grx-abhängigen Peroxidase-Aktivität der PfTPx1 .....	111
3.6.2	Reduktion der PfTPx1 durch PfPlrx .....	113
3.6.3	Feststellung der DHA-Reduktase-Aktivität von PfTPx1 .....	115
3.6.4	Mutagenese zu den Formen C74A und C170A .....	117
3.6.5	Kinetische Charakterisierung der Mutanten.....	118
3.6.6	Untersuchung der Oligomerisierung der PfTPx1.....	120
3.7	Untersuchung der Hemmung verschiedener (Pf-)Proteine durch Hämin (Ferriprotoporphyrin IX, FPIX) .....	122
3.7.1	Hemmung der Glutathionreduktasen durch FPIX .....	122
3.7.2	Hemmung der Pf-Thioredoxinreduktase durch FPIX.....	124
3.7.3	Hemmung von Pf-Glutaredoxin durch FP .....	126
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>128</b>
4.1	Thioredoxine und Thioredoxin-ähnliche Proteine aus <i>Plasmodium falciparum</i> .	128
4.1.1	<i>Thioredoxin-like protein 1</i> (Tlp1) .....	129
4.1.2	<i>Thioredoxin-like protein 2</i> (Tlp2) .....	131
4.1.3	Thioredoxin 2 (Trx2) und Thioredoxin 3 (Trx3) .....	132
4.2	PfTrxR – Genvariation und Hemmung .....	138
4.2.1	N-terminal veränderte TrxR-Formen .....	138
4.2.2	Inhibitoren der PfTrxR.....	139
4.3	Interaktionen von Thioredoxin1 und Glutaredoxin aus Pf.....	141
4.3.1	Interaktion mit Peroxiden.....	141
4.3.2	Interaktion mit Dehydroascorbat.....	142
4.3.3	Interaktion mit Liponsäure/-amid .....	145
4.4	PfAOP ( <i>antioxidant protein</i> ) – ein TypV-Prx.....	147
4.4.1	Identifizierung der reifen Proteinsequenz; Reduktionszustand.....	147
4.4.2	Peroxidase-Aktivität und Substratspezifität.....	148
4.4.2.1	Reduzierende Substrate; kinetischer Vergleich mit verwandten Proteinen	148
4.4.2.2	Oxidierende Substrate .....	150
4.4.3	Oligomerisierungszustand.....	153
4.4.4	Röntgenstruktur.....	154
4.4.5	Subzelluläre Lokalisation.....	155
4.5	Weitere Charakterisierung der Pf-Thioredoxinperoxidase1 (TPx1).....	159
4.5.1	Substratspezifität .....	159
4.5.1.1	Glutaredoxin.....	159
4.5.1.2	Plasmoredoxin.....	160
4.5.1.3	Dehydroascorbat.....	161
4.5.2	Bedeutung der Cysteinreste C74 und C170 .....	161
4.5.3	Oligomere der TPx1 .....	165
4.6	Hemmung von Pf-Enzymen durch Ferriprotoporphyrin IX .....	167
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>171</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>173</b>
6.1	Literaturverzeichnis .....	173
6.2	Eigene Veröffentlichungen .....	197
6.3	Computerprogramme .....	199
6.3.1	Schnittstellensuche.....	199
6.3.2	Sequenzübersetzung DNA→Protein.....	199

---

6.3.3	BLASTs .....	199
6.3.4	Proteinparameter .....	199
6.3.5	Alignments .....	199
6.3.6	Signalpeptidvorhersage .....	199
6.3.7	Vorhersage der Apicoplast-Lokalisation.....	199
6.3.8	Vorhersage der Mitochondrium-Lokalisation.....	200
6.3.9	Analyse der <i>codon usage</i> .....	200
6.3.10	Hydrophobizitätsplot und Transmembran-Vorhersage.....	200
6.3.11	Konservierte Domänen.....	200
6.3.12	Posttranslationale Modifikationen .....	200
6.3.13	Disulfidbrücken.....	200
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>201</b>



## Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon$	Absorptionskoeffizient
$\Delta A$	Absorptionsdifferenz
Amp	Ampicillin
AOP	<i>antioxidant protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat (Ammoniumpersulfat)
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
C	Carbenicillin
CH	Chloramphenicol
CuOOH	Cumenhydroperoxid (Kumol / Isopropylbenzol / 2-Phenylpropan)
DHA	Dehydroascorbat
DL	Durchlauf
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTE	1,4-Dithioerythrit (-threitol)
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat)
DTT	1,4-Dithiothreitol (-threitol)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FP	Ferriprotoporphyrin(IX)
G6PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathionthiol
GSSG	Glutathiondisulfid
HEDS	$\beta$ -Hydroxyethyl-disulfid
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LA	Liponsäure
LAM	Liponamid
LB	Luria-Bertani
LipDH	Liponamiddehydrogenase
M	Marker
MBP	<i>maltose-binding protein</i>
$M_w$	Molekulargewicht
NADH, NAD <sup>+</sup>	reduziertes, oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH, NADP <sup>+</sup>	reduziertes, oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
orf	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pt	<i>Populus trichocarpa</i>
Py	<i>Plasmodium yoelii</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCOOH	Phosphatidylcholinhydroperoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
Plrx	Plasmoredoxin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prx	Peroxiredoxin(e)
PV	Parasitophore Vakuole
RE	Rohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro min
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
tBOOH	tert.-Butylhydroperoxid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> , Tetramethylethylendiamin
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TPx	Thioredoxinperoxidase
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
U	Enzymeinheit (Units, $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
ÜK	Übernachtkultur
USP	Ultraschallpellet
VK	Vorkultur

Bei Enzymen erläutern die Präfixe den Ursprung (z. B. Pf für *Plasmodium falciparum*, Dm für *Drosophila melanogaster*, h für den Menschen). Für häufig erwähnte Organismen wird das Kürzel auch alleinstehend verwendet (z. B. Tg für *Toxoplasma gondii*, Pt für *Populus trichocarpa*, Hi für *Haemophilus influenzae*).

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.	Globale Verbreitung der Malaria.....	1
Abb. 1.2.	Lebenszyklus des Malariaerregers <i>Plasmodium falciparum</i> in der <i>Anopheles</i> -Mücke und im Menschen. Abbildung nach D. Wirth (Wiesner <i>et al.</i> 2003), verändert.....	3
Abb. 1.3.	Der evolutionäre Ursprung des Apicoplasten. Nach Roos <i>et al.</i> , 2002; verändert.....	6
Abb. 1.4.	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines <i>Toxoplasma gondii</i> -Tachyzoiten. ....	7
Abb. 1.5.	Trx- und GSH-System von <i>Plasmodium falciparum</i> . ....	13
Abb. 1.6.	Reaktionsmechanismus der hTrxR. Aus: Gromer <i>et al.</i> , 2004.....	16
Abb. 1.7.	Schematische Darstellung des <i>thioredoxin fold</i> . Aus: Sheehan <i>et al.</i> , 2001. ....	18
Abb. 1.8.	Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der TXNPx aus <i>Crithidia fasciculata</i> . ....	24
Abb. 2.1.	Kalibrierung der Superdex 200 Chromatographiesäule. ....	52
Abb. 2.2.	Aufbau eines <i>Semidry</i> -Blot. ....	53
Abb. 2.3.	Schema eines Kristallansatzes nach dem <i>hanging-drop</i> -Verfahren. ....	59
Abb. 3.1.	Vergleich der amplifizierten Tlp1-Sequenz mit verdauten pSK-Klonen. ....	61
Abb. 3.2.	Verhalten von Tlp1 im Insulin-Assay.....	62
Abb. 3.3.	Reinigungsprofile von Tlp2pRSetA in C41 und C43 und entsprechender Expressionskontrollen mit leerem pRSet A. ....	66
Abb. 3.4.	Western Blot verschiedener Reinigungsfractionen von Tlp2pRSetA in C41 bzw. C43 (links) und von leerem pRSetA vgl. mit Tlp2pRSetA in C41 (rechts).....	67
Abb. 3.5.	Insulin-Assay mit Tlp2. ....	67
Abb. 3.6.	Ergebnis der <i>in vitro</i> -Translation des Tlp2. ....	68
Abb. 3.7.	Expressionskontrolle des Fusions-proteins MBP-Tlp2 in pBUF1b und M15.....	69
Abb. 3.8.	Reinigungsprofil des MBP-Tlp2-Fusionsproteins über Amylose. ....	70
Abb. 3.9.	Zeitverlauf der Spaltung des Fusionsproteins MBP-Tlp2 durch TEV. ....	70
Abb. 3.10.	Amplifikation der Trx2-Sequenz. ....	71
Abb. 3.11.	Alignment der Trx2-Sequenz mit anderen Thioredoxinsequenzen.....	72
Abb. 3.12.	Ältere Probe gereinigten Thioredoxins 2 (k) (links) im 15%igen SDS-Gel. ....	73
Abb. 3.13.	Insulin-Assay mit Trx2k. ....	74
Abb. 3.14.	Expressionskontrolle von Trx2sk. ....	74
Abb. 3.15.	Amplifikation der Trx3-Sequenz. ....	76
Abb. 3.16.	Expressionskontrolle der ÜE von Trx3.....	77
Abb. 3.17.	Gereinigtes PfTrx1-His nach der Gelfiltration.....	80
Abb. 3.18.	Sequenzbeginn der bearbeiteten PfTrxR-Varianten.....	83
Abb. 3.19.	Reinigungsprofil der PfTrxR-His in der 12%igen SDS-PAGE. ....	84
Abb. 3.20.	Profil der Nachreinigung der Waschfraktion von PfTrxR-His in der 12%igen SDS-PAGE. ....	85
Abb. 3.21.	Kristallfotos der PfTrxR-His.....	85
Abb. 3.22.	IC <sub>50</sub> -Kurven für die Inhibitoren 028 (a.), 036 (b.) und 064 (c.) an den Kulturen.....	89
Abb. 3.23.	Parasitenkulturen ohne (a.) bzw. unter Einfluss von 10 µM (b.) und 100 µM (c.) 028 nach 48h.....	89
Abb. 3.24.	Trx-Abhängigkeit der Reaktion Trx(SH) <sub>2</sub> ↔DHA.....	91

Abb. 3.25.	DHA-Abhängigkeit der Reaktion $\text{Trx}(\text{SH})_2 \leftrightarrow \text{DHA}$ .....	91
Abb. 3.26.	Trx-Abhängigkeit der LA- bzw. LAM-Reduktion durch das Trx-System.....	93
Abb. 3.27.	Verifizierung der AOP-Sequenz nach Genefinder mittels PCR. ....	95
Abb. 3.28.	Aminosäuresequenz des PfaOP. ....	98
Abb. 3.29.	Aufreinigung von AOPsk. ....	98
Abb. 3.30.	Grx-Abhängigkeit der Prx-Aktivität. ....	100
Abb. 3.31.	Trx-Abhängigkeit der Prx-Aktivität.....	100
Abb. 3.32.	Prx-Abhängigkeit der Aktivität bei 0.5 $\mu\text{M}$ Grx.....	101
Abb. 3.33.	Prx-Abhängigkeit der Aktivität bei 0.5 $\mu\text{M}$ Trx. ....	101
Abb. 3.34.	Abhängigkeit der AOPsk-Aktivität von der tBOOH-Konzentration. ....	102
Abb. 3.35.	Abhängigkeit der AOPsk-Aktivität von der PCOOH-Konzentration. ....	102
Abb. 3.36.	pH-Profile von AOPsk mit Trx- bzw. Grx-backup-System. ....	103
Abb. 3.37.	Reduzierende/nicht-reduzierende SDS-PAGE von AOPsk.....	107
Abb. 3.38.	Kristalle des AOPsk.....	109
Abb. 3.39.	Strukturmodell des PfaOP. ....	110
Abb. 3.40.	Immunfluoreszenz mit Tg-Tachyzoiten.....	111
Abb. 3.41.	Grx-Abhängigkeit der PfTPx1.....	112
Abb. 3.42.	TPx-Abhängigkeit mit 0.5 $\mu\text{M}$ Trx (a) bzw. Grx (b). ....	113
Abb. 3.43.	Substrat-Abhängigkeit der Reduktion von DHA durch PfTPx1.....	116
Abb. 3.44.	TPx-Abhängigkeit der Reduktion von DHA. ....	116
Abb. 3.45.	Reinigungsprofile der PfTPx1 WT (A.), C74A (B.) und C170A (C.). ....	117
Abb. 3.46.	Grx-Abhängigkeit der TPx1C74A.....	119
Abb. 3.47.	Grx-Abhängigkeit der TPx1C170A.....	119
Abb. 3.48.	Abhängigkeit der Aktivität des WT-Enzyms (a. und b.) bzw. der Mutanten C74A (c.) und C170A (d.) von der Trx-Konzentration.....	120
Abb. 3.49.	Verhalten der PfTPx1-Formen in der 15%igen, denaturierenden SDS-PAGE.....	121
Abb. 3.50.	Hemmung der Hefe-GR durch 25 $\mu\text{M}$ FPIX im Assay nach Aft und Müller. ....	122
Abb. 3.51.	Bereinigte Enzym-aktivitäten im Assay nach Aft und Müller. ....	123
Abb. 3.52.	Hemmung der Hefe-GR (a), humanen GR (b) und PfGR (c) durch 25 $\mu\text{M}$ FP. ....	124
Abb. 3.53.	Bestimmung der $\text{IC}_{50}$ -Konzentration für FPIX an PfTrxR. ....	125
Abb. 3.54.	Zeitabhängigkeit der TrxR-Hemmung durch FPIX. ....	126
Abb. 4.1.	Schematische Darstellung eines flagellaren Axonems im Querschnitt.....	129
Abb. 4.2.	Kyte-Doolittle-Plot der Aminosäure-sequenz von Tlp2. ....	131
Abb. 4.3.	Alignment von PfTrx2 mit dem Trxm1 aus At.....	133
Abb. 4.4.	Alignment von PfTrx3 mit dem Trx y1 aus At.....	134
Abb. 4.5.	Erweitertes Trx- und GSH-System von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	166
Abb. 4.6.	Beeinflussung von Pf-Enzymen durch FP im metabolischen Zusammenhang.....	168

## Tabellenverzeichnis

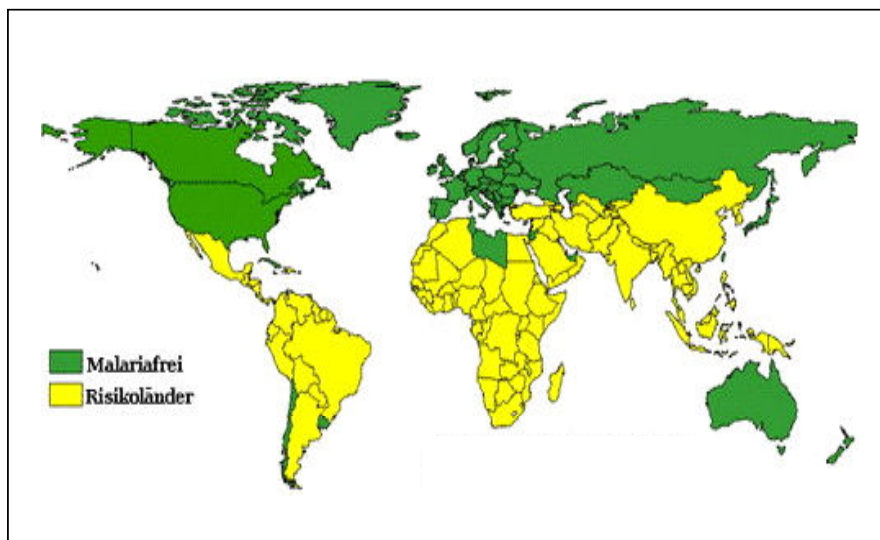
Tabelle 1.1. Humanpathogene <i>Plasmodium</i> -Spezies. ....	2
Tabelle 2.1. Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Vektoren. ....	35
Tabelle 2.2. Genotypen der verwendeten Bakterienstämme mit Referenzen. ....	36
Tabelle 2.3. Typisches Pipettierschema einer PCR. ....	43
Tabelle 2.4. Typisches Temperaturprofil einer PCR. ....	43
Tabelle 2.5. Typisches Beispiel für einen Restriktions-Doppelansatz von Vektor und Insert. ....	44
Tabelle 2.6. Optimiertes Reinigungsschema der shortPfTrxR über 2',5'-ADP-Sepharose. ....	49
Tabelle 2.7. Rezept für vier 15%ige SDS-Gele einschließlich Sammelgelen (4%). ....	50
Tabelle 2.8. Vorbereitung der SDS-PAGE-Proben in dieser Arbeit. ....	50
Tabelle 2.9. Pipettierschema des TrxR-DTNB-Assays. ....	55
Tabelle 2.10. Pipettierschema des TrxR-Trx-Assays. ....	55
Tabelle 2.11. Pipettierschema des GR-Assays. ....	57
Tabelle 3.1. Pipettierschema des TEV-Protease-Spaltungsansatzes. ....	70
Tabelle 3.2. Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung der mittleren Bande aus Abb. 3.12. ....	73
Tabelle 3.3. Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung der unteren Bande aus Abb. 3.12. ....	73
Tabelle 3.4. Exonverteilung der Trx3-Sequenz. Grau unterlegt: putatives Signalpeptid. ....	76
Tabelle 3.5. Lokalisationsvorhersagen für Trx3. ....	76
Tabelle 3.6. IC <sub>50</sub> -Werte verschiedener Verbindungen an PfTrxR und hTrxR. ....	87
Tabelle 3.7. Auswirkungen der Verbindungen 028, 036 und 064 auf Plasmodien-Kulturen. ....	88
Tabelle 3.8. Reduktion von DHA durch Plrx. ....	92
Tabelle 3.9. Ergebnisse der untersuchten Interaktionen von Trx1 und Grx. ....	94
Tabelle 3.10. DTNB-Titration von AOPsk. ....	99
Tabelle 3.11. Umsetzung verschiedener Hydroperoxide durch AOPsk. ....	102
Tabelle 3.12. Pipettierschema und Ergebnisse der SH-Gruppenbestimmung der Messreihe Trx → AOPsk. ....	104
Tabelle 3.13. Zusammensetzung der Proben- und Kontrollansätze zur Erfassung der Interaktion Plrx → AOPsk und Ergebnisse der Messungen. ....	105
Tabelle 3.14. Bedingungen und Ergebnisse der Gelfiltrationen mit AOPsk. ....	108
Tabelle 3.15. Kristallisationsbedingungen der zur Röntgenstrukturanalyse verschickten Kristalle. ....	109
Tabelle 3.16. Pipettierschema und SH-Gruppenbestimmung der Messung der Trx→TPx1-Interaktion. ....	114
Tabelle 3.17. Zusammensetzung der Inkubationsansätze zur Messung der Reduktion von TPx1 durch Plrx und Ergebnisse. ....	114
Tabelle 3.18. Pipettierschemata und Ergebnisse der Untersuchung einer Interaktion FP ↔ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	127
Tabelle 4.1. Übereinstimmungen zwischen Trx aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) und Pf. ....	133
Tabelle 4.2. Vergleich der kinetischen Parameter der TPx1-Aktivität je nach Elektronen-donorsystem. ....	160
Tabelle 4.3. Vergleich der kinetischen Parameter für WT-TPx1 und Mutanten. ....	164

# 1 Einleitung

## 1.1 *Plasmodium falciparum* (Pf)

### 1.1.1 *Plasmodium falciparum* und Malaria

Malaria ist eine Infektionskrankheit mit Geschichte: Bereits aus Aufzeichnungen der alten Ägypter geht ihre Verbreitung hervor; der griechische Arzt Hippokrates beschrieb um 400 v. Chr. ein Krankheitsbild, welches dem der Malaria entspricht. Leider ist sie nach wie vor aktuell: Über zwei Million Menschen sterben jährlich an Malaria, 500 Millionen erkranken (Ridley, 2003), fast die Hälfte der Weltbevölkerung ist infektionsgefährdet (Butler, 2004). Besonders hoch ist die Mortalität bei Kindern unter 5 Jahren. Verbreitungsgebiete sind v. a. die ärmsten Regionen der Welt (tropisches Afrika, Südostasien, Südamerika) (Abb.1.1); die Krankheit ihrerseits hat wiederum negativen Einfluss auf die wirtschaftliche Entwicklung.



**Abb. 1.1. Globale Verbreitung der Malaria.**

Quelle:

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Aboutdpdx.htm>

Centers for Disease Control & Prevention; National Center for Infectious Diseases; Division of Parasitic Diseases

Die Schwierigkeiten bei der Bekämpfung liegen nicht nur im Verständnis der zugrunde liegenden biochemischen Prozesse, sondern auch in der kostengünstigen Herstellung und Verteilung entsprechender Medikamente. Ein massives Problem stellt die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber den bewährtesten Wirkstoffen - Chloroquin und Sulphadoxin/Pyrimethamin – dar (Ridley, 2002; Goldberg, 2002). Ein Impfstoff gegen Malaria schien bereits vor 20 Jahren in Sicht, lässt jedoch bis heute auf sich warten (Etkin, 2003). Zwar erreichen wiederholt infizierte Personen klinische Immunität (Prämunität), diese ist aber zum einen auf lokale Erreger-Spezies begrenzt und bezieht sich zum anderen lediglich auf die Manifestation der Erkrankung; die Infektion als solche ist weiterhin vorhanden und ihr Fortbestehen sogar notwendig für die Asymptomatik (Richie und Saul, 2002). Neben der Behandlung der Erkrankung und der Entwicklung einer Vaccine wird die Strategie der Ausrottung des Vektors, der *Anopheles*-Mücke, verfolgt (Richie und Saul, 2002). Prominentestes Beispiel war die Anwendung von DDT v. a. in den 60er Jahren, die zwar Erfolg versprechend verlief, jedoch aufgrund der Toxizität der Verbindung gestoppt wurde.

Das Anwendungsverbot ist umstritten: Seit 2001 wird in Südafrika wieder DDT gesprüht; 2004 gestand die WHO die Verwendung in Innenräumen zu.

In vielen Teilen der Welt hat trotz Bekämpfungskampagnen wie der WHO-geführten „Roll Back Malaria“ in den letzten Jahren eine Steigerung der Erkrankungen stattgefunden (Tongren *et al.*, 2004). Schätzungen gehen gar von einer Verdopplung in den nächsten 20 Jahren aus (Sachs und Malaney, 2002), falls nicht effektive Gegenmaßnahmen durchgeführt werden.

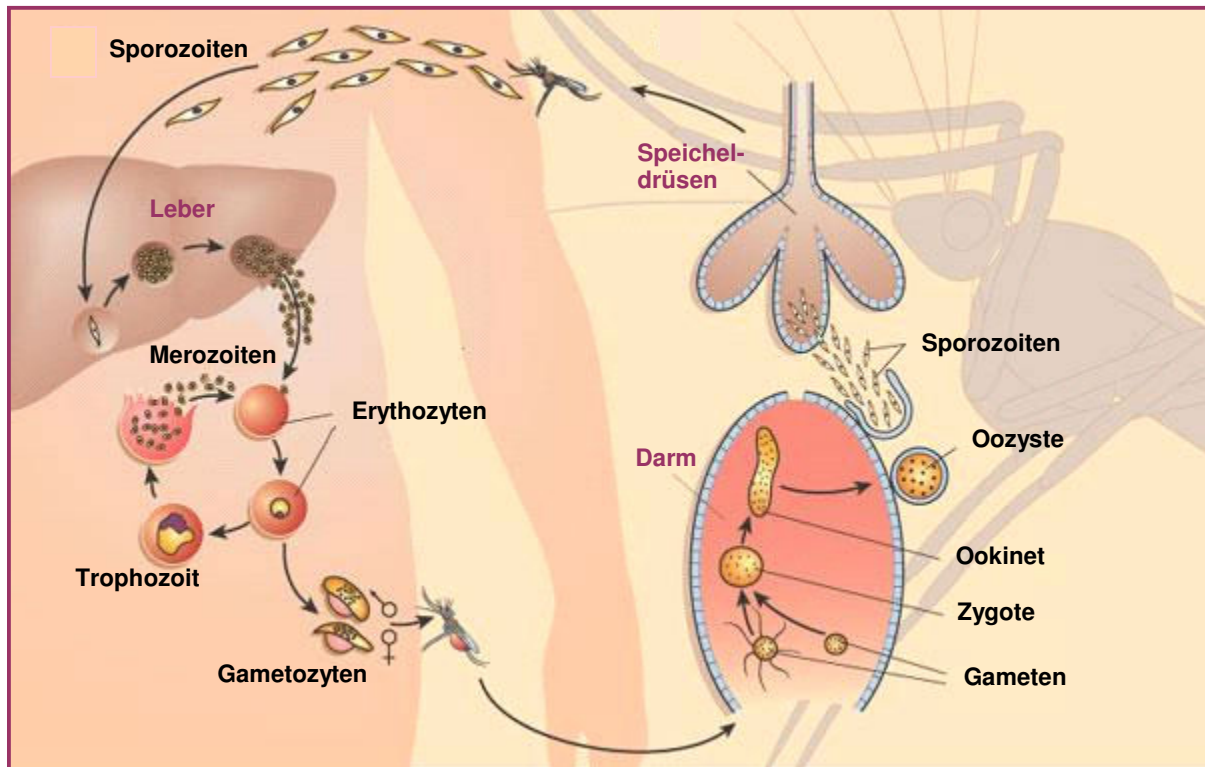
Bei der Mehrheit der Malaria-Fälle zeigt sich die Erkrankung mit unspezifischer fiebriger Symptomatik; die Erscheinungsformen der schweren Malaria sind v. a. durch Anämie und eine charakteristische zerebrale Symptomatik charakterisiert, die durch Zerstörung der roten Blutzellen und die Obstruktion feiner Blutgefäße im Gehirn zustande kommen (Mackintosh *et al.*, 2004). Jedoch ist die Manifestation der Erkrankung komplexer als lange Zeit angenommen und nicht als auf einzelne Organe beschränkt anzusehen. Die wohl wichtigste Determinante für die Überlebensprognose ist die metabolische Azidose, die wiederum verschiedene Ursachen haben kann (Miller *et al.*, 2002). Der schlechte Ausgangszustand der Erkrankten, insbesondere der Kinder, und opportunistische bakterielle Infektionen verschärfen die Situation (Miller *et al.*, 2002).

Verursacher der Erkrankung sind Parasiten der Gattung *Plasmodium*. Als Mitglieder des Stammes der Apicomplexa sind sie verwandt mit mehreren Tausend anderen parasitischen Protozoen, darunter *Trypanosoma*, der Erreger der Schlafkrankheit, und *Toxoplasma* (Toxoplasmose). Die genannten Parasiten haben sich unverwechselbare Lebensstrategien angeeignet. Während *Toxoplasma* fast jeden Vertebraten infizieren und in nahezu jedem Zelltyp kultiviert werden kann (Generalist), gilt *Plasmodium* als der perfekte Spezialist: Jede Spezies infiziert nur eine/einige wenige Wirtsorganismen, und auch die Anzahl übertragender Mückenarten – Spezies der Gattung *Anopheles* – ist begrenzt. Außerdem auffallend ist die ausgeprägte Gewebespezifität der verschiedenen Zyklusphasen von *Plasmodium* (Roos *et al.*, 2002). Von den vier humanpathogenen Spezies (Tabelle 1.1) ist *Plasmodium falciparum* die gefährlichste.

Spezies	Malariaform
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria tropica
<i>Plasmodium vivax</i>	Malaria tertiana
<i>Plasmodium ovale</i>	Malaria tertiana
<i>Plasmodium malariae</i>	Malaria quartana

**Tabelle 1.1. Humanpathogene *Plasmodium*-Spezies.**

Der Lebenszyklus der Plasmodien ist in Abb. 1.2 gezeigt und in Anlehnung an Mehlhorn und Piekarski (2002) und Wiesner *et al.* (2003) beschrieben.



**Abb. 1.2.** Lebenszyklus des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* in der *Anopheles*-Mücke und im Menschen. Abbildung nach D. Wirth (Wiesner *et al.* 2003), verändert.

Der Lebenszyklus von Pf verläuft in den drei für Sporozoen typischen Phasen: Während die asexuelle Vermehrung (Schizogonie) im Zwischenwirt Mensch stattfindet, verlaufen die sexuellen Stadien Gamogonie und Sporogonie in der Mücke als dem Endwirt. Mit dem Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke werden Sporozoiten in das subkutane Gewebe injiziert, von wo sie über die Blutbahn rasch zur Leber gelangen.

Bei dem symptomfreien Befall der Hepatozyten entstehen aus jedem Sporozoit tausende Merozoiten, welche wiederum in die Blutbahn freigesetzt werden. Zur eigentlichen Erkrankung führt nun erst die asexuelle Vermehrung in den roten Blutzellen (Miller *et al.*, 2002). Bei *P. falciparum* und *vivax* dauert ein intraerythrozytärer Zyklus 48 h, wobei eine Differenzierung vom Ringstadium über das Trophozystenstadium zu den Schizonten stattfindet. Im späten Schizont (Segmentier-Stadium) erfolgt die Teilung in meist 16 Merozoiten. Durch Platzen des Blutkörperchens gelangen diese ins Blut; die gleichzeitig freigesetzten Stoffwechselprodukte führen zum Fieberschub. Der Rhythmus der Fieberattacken ist jedoch nur dann klar abgegrenzt, wenn es bei einer einzigen Infektion bleibt. Während des Blutstadiums erfolgt bei Pf auch die Differenzierung einiger Parasiten zu weiblichen und männlichen Gametozyten. Der Anteil dieser geschlechtlichen Formen ist abhängig von der Stresssituation des Parasiten und damit vor allem von Sauerstoffkonzentration, Temperatur und menschlichem Immunsystem, bzw. Chemotherapeutika. Die bei einem erneuten Mückenstich mit der Blutmahlzeit aufgenommenen Gametozyten entwickeln sich im Mitteldarm des Insekts zu Gameten weiter und verschmelzen schließlich zum Ookineten. Diese bewegliche Zygote durchdringt das Darmepithel und siedelt sich an der Darmaußenwand an. Es bilden sich Sporozoiten aus, die nach Platzen der nun als Oozyste bezeichneten Struktur in die Speicheldrüse einwandern. Beim nächsten Saugakt erfolgt erneut die Übertragung.

Die traditionelle Vorgehensweise bei der Impfstoffentwicklung beinhaltet die Inaktivierung und Abschwächung des Erregers. Eine Vaccine mit entsprechend behandelten Pf-Sporozoiten wurde bereits 1973 zum ersten Mal angewendet (Clyde *et al.*). Der nachweislich protektive Effekt einer solchen Maßnahme hält jedoch maximal 10,5 Monate an (Hoffman *et al.*, 2002). Die Massenproduktion bestrahlter Sporozoiten und ihre Verteilung zu realistischen Preisen sind ebenfalls problematisch (Tongren *et al.*, 2004). Auch Impfstoffe auf der Basis einzelner Antigene zeigen bislang keinen ausreichend langen Erfolg, was u. a. durch stadien-spezifische Antigenexpression und Antigenpolymorphismus zu erklären ist (Richie und Saul, 2002). Die Behandlung der Erkrankung wird daher auf nicht absehbare Zeit wichtigster Bestandteil der Malariaabekämpfung sein.



Die meisten derzeit gebräuchlichen „Antimalarials“ sind Abkömmlinge traditioneller Heilmittel. So haben die Chinoline, zu denen auch Chloroquin gehört, ihren Ursprung in Chinin, der Wirksubstanz der aus Südamerika stammenden *Chinona*-Rinde. Artemisinin ist in der chinesischen Beifussart „Qinghao“ (*Artemisia annua*) enthalten (Ridley, 2002). Diese Verbindungen scheinen durch die Beeinflussung zahlreicher Targetmoleküle zu wirken, von denen man zwar mittlerweile einige, jedoch längst nicht alle kennt (Famin und Ginsburg, 2003; Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Auch heute noch werden, mehr oder weniger auf dem *Trial-and-error*-Prinzip beruhend, natürlich vorkommende Wirkstoffe gegen Malaria gefunden, so z. B. das Gewürz Curcumin (Reddy *et al.*, 2005). Präferiert wird allerdings die rationelle Medikamentenentwicklung basierend auf der Kenntnis plasmodienspezifischer Strukturen und Proteine. Jedoch können auch Enzyme mit Wirtszellhomologen als Zielmoleküle dienen, wenn die Enzymstrukturen ausreichend markante Unterschiede aufweisen (Goldberg, 2002; Hoffman *et al.*, 2002). Solche Vertreter sind für zahlreiche Stoffwechselwege beschrieben (Becker und Kirk, 2004). Der Redoxstoffwechsel besitzt einige potentielle *drug targets*: Der Wirkstoff Methylenblau richtet sich u. a. gegen die Glutathionreduktase des Parasiten; bei den *double-headed prodrugs* wird ein GR-Inhibitor reversibel mit einem 4-Aminochinolinderivat (wie Chloroquin) verknüpft (Davioud-Charvet, 2001). Die Glutathion-S-Transferase und das Glyoxalase-System sind ebenfalls vielversprechende Zielmoleküle (Becker und Kirk, 2004). Mit Plasmoredoxin besitzt Pf ferner ein einzigartiges Redoxprotein (Becker *et al.*, 2003).

Selbst bei vergleichbarer Auswirkung eines Inhibitors auf isoliertes Parasiten- und Wirtsenzym ist eine Nutzung noch nicht auszuschließen: Eine Verbindung kann auch durch unterschiedliche Aufnahme in die Zellen, spezifische intrazelluläre Behandlung oder unterschiedlich schnellen Ersatz des gehemmten Enzyms noch parasiten-spezifisch wirken (Goldberg, 2002).

Die Sequenzierung des Pf-Genoms wurde 2002 abgeschlossen (Gardner *et al.*, 2002). Bemerkenswerterweise zeigt das Pf-Genom, das sich durch hohen AT-Gehalt auszeichnet (Wilson *et al.*, 2004), im Vergleich zu dem anderer Eukaryoten die höchste Ähnlichkeit zu *Arabidopsis thaliana* (Gardner *et al.*, 2002). Die genomischen und proteomischen Daten, die in den letzten Jahren entstanden, sind in der spezifischen Datenbank PlasmoDB zugänglich (Tongren *et al.*, 2004). Im Zuge der Sequenzierung wurden vorläufige Annotationen für über 5000 mutmaßliche offene Leserahmen (orf) verfügbar (Gardner *et al.*, 2002), die jedoch nur als vorläufig betrachtet werden können (Wilson, 2004). Ca. 60% der orf haben keine Orthologe (Wilson *et al.*, 2004).

Arraydaten von Le Roch *et al.* mit 25 bp-Oligos indizieren, dass 4557 Gene (88%) zumindest 1x während des gesamten Wirtszyklus exprimiert werden. Intraerythrozytär wird nur ein erstaunlich geringer Prozentsatz der Gene (>20% von 4488 untersuchten Genen) konstant exprimiert, die meisten anderen zeigten je ein distinktes Maximum und Minimum der Transkription (Bozdech und Ginsburg, 2003).

### 1.1.2 Besonderheiten des Organismus

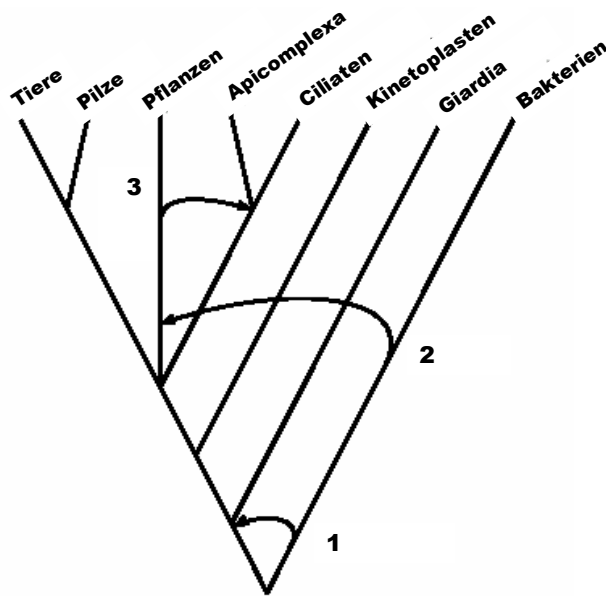
Die Besonderheiten von *Plasmodium* ergeben sich v. a. durch den häufigen Wechsel seiner Lebensbedingungen. Insbesondere die Vermehrung im roten Blutkörperchen als eine der am stärksten differenzierten Zellen des menschlichen Organismus erfordert spezielle Vorkehrungen. So sezerniert der Parasit Proteine in das Cytoplasma und die Plasmamembran des Erythrozyten, der nach seiner Reifung selber weder Kern noch die Ausstattung für Proteinsynthese und -transport besitzt (Cooke *et al.*, 2004). Durch Einbau von Kanälen in die Erythrozytenmembran 12-16 h nach der Invasion wird ein stärkerer Stoffaustausch mit dem Plasma ermöglicht (Ginsburg *et al.*, 1985). Mit Hilfe integraler Membranproteine, die in den sog. *knobs* verankert sind, erreicht der Parasit die Anheftung der infizierten roten Blutzellen an das Gefäßendothel. Im Cytoplasma der Wirtszelle installiert *Plasmodium* ein Transportsystem, zu dem die *Maurer's clefts* und das Tubulovesikuläre Netzwerk gehören (Cooke *et al.*, 2004). Der Parasit selbst umgibt sich mit einer parasitophoren Vakuole, die bei dem Endocytose-ähnlichen Prozess des Erythrozyten-Befalls entsteht.

Charakteristisch für die Apicomplexa ist auf der Ebene der subzellulären Organisation ferner ein „apikaler Organellenkomplex“, von dem sich ihre Bezeichnung ableitet (Roos *et al.*, 2002). Zu diesem Komplex gehören spezialisierte sekretorische Organellen (Rhoptries, Mikronema und *dense granules*) und Cytoskelettelemente (Conoid). Die genaue Funktion dieser Organellen ist noch nicht bekannt, aber es ist anzunehmen, dass sie mit der Anhaftung an die Wirtszelle und der Invasion in Verbindung stehen. Der apikale Komplex befindet sich im vorderen Teil der eindringenden Zelle (dem Zoit). Der Inhalt der Micronema wird auf den Zellkontakt mit der Wirtszelle hin ausgeschüttet, die Freisetzung des Rhoptry-Inhaltes geht mit der Etablierung der intrazellulären parasitären Vakuole parallel, in welcher sich die Teilung der Parasiten vollzieht. Auch die *dense granules* werden im Zuge der Invasion entladen (Dubremetz *et al.*, 1998).

Die Apicomplexa besitzen eine Vielzahl weiterer ungewöhnlicher Organellen: Der innere Membrankomplex ist essentiell für die ungewöhnlichen Teilungsmodi dieser Parasiten. Die wahrscheinlich bemerkenswerteste aller intrazellulären Organellen jedoch ist das Plastid.

#### 1.1.2.1 Der Apicoplast

Wie die Bezeichnung dieses Kompartimentes besagt, handelt es sich um eine Chloroplasten-ähnliche Organelle, die der Parasit durch sekundäre Endosymbiose erlangte. Dabei umschloss ein Vorfahr aller Apicomplexa-Parasiten eine eukaryotische Alge und behielt das Algen-Plastid als solches bei (Gardner *et al.*, 2002). Der sekundäre endosymbiontische Transfer der Plastid-DNA hat wahrscheinlich schon vor der Aufzweigung in Apicomplexa, Dinoflagellaten und Ciliaten (zusammengefasst als Alveolata bezeichnet) stattgefunden (Fast *et al.*, 2001). Die Identität des Endosymbionten ist noch nicht völlig geklärt; sowohl für das Cyanobakterium (Köhler *et al.*, 1997; Gardner *et al.*, 1994) als auch für eine Rotalge als Vorläufer (McFadden *et al.*, 1997; Wilson, 1993) gibt es Hinweise.



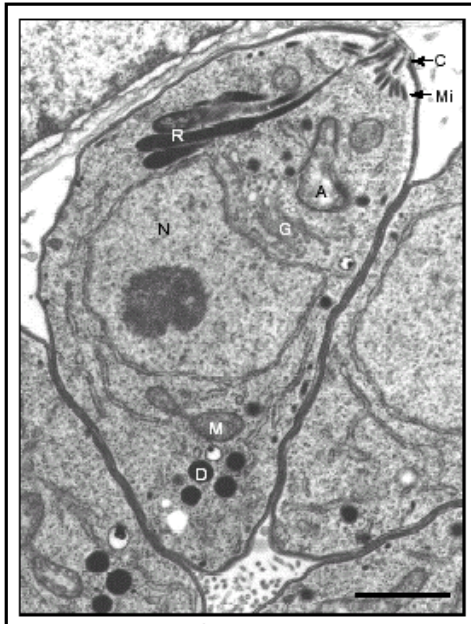
**Abb. 1.3. Der evolutionäre Ursprung des Apicoplasten.** Nach Roos *et al.*, 2002; verändert. 1: Entstehung der Mitochondrien. 2: Entstehung der Plastiden. 3: Entstehung der Apicoplasten.

Die Entdeckung des Apicoplasten geschah bei der Suche nach dem Wirkziel verschiedener Antibiotika. Trotz struktureller Unterschiede schienen die Verbindungen über einen gemeinsamen Mechanismus zu wirken – in jedem Fall trat bei den Parasiten der Phänotyp des *delayed death* auf (Fichera *et al.*, 1995).

Bei diesem Phänomen ist die Lebens- und Teilungsfähigkeit in der ursprünglichen Wirtszelle unverändert, aber nach Reinvansion eines neuen Wirtes stirbt der Parasit. Ziel der Antibiotika waren weder cytoplasmatische noch mitochondriale Ribosomen (Beckers *et al.*, 1995), sondern die von einem mysteriösen, zirkulären 35 kb-DNA-Element codierten Ribosomen (Beckers *et al.*, 1995; Roos *et al.*, 2002). Dieses Element, welches 1975 zum ersten Mal beschrieben wurde (Kilejan, 1975), entspricht hinsichtlich Gen-, „Inhalt“ als auch Organisation einem Algen-Plastidgenom, das durch zahlreiche Deletionen und Umordnungen verkleinert wurde (Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001). Die Replikation erfolgt allerdings, im Gegensatz zu dem chloroplastischen Genom, nicht autonom, sondern eng an die des Nucleus gekoppelt (Foth und McFadden, 2003). Der Hauptunterschied ist aber das vollständige Fehlen der Photosynthesegene. Die Apicomplexa scheinen diese schon relativ früh in der Entwicklung des Stammes verloren zu haben (Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001).

Die Verwandtschaft zu Algen und Pflanzen zeigt sich auch auf biochemischer Ebene bei Ähnlichkeiten von Stoffwechselwegen (Cavalier-Smith, 1993) und in der Sensitivität der Apicomplexa gegenüber vielen Herbiziden. Es ist anzunehmen, dass die pflanzliche Seite der Zellbiologie der Apicomplexa bislang unterschätzt wurde (Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001).

Der Apicoplast (wie in den meisten Algen gibt es nur ein Plastid pro Zelle) liegt, wie für *Toxoplasma* gezeigt wurde, apikal des Nucleus (Roos *et al.*, 2002) und es werden verschiedene enge Beziehungen zu Mitochondrium (Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001; Roos *et al.*, 2002; Oborník *et al.*, 2002) und Golgi-Apparat (Hopkins *et al.*, 1999; Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001) diskutiert. Das Plastid ist mit 0.15-1.5 µm relativ klein und hat eine ovoide Form (Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001)



**Abb. 1.4. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten.**

Aus Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001. A: Apicoplast, C: Conoid, D: Dense granules, G: Golgi-Apparat, M: Mitochondrium, Mi: Micronemes, R: Rhoptries.

Obwohl die Anzahl organeller Membranen als eine recht konservierte Eigenschaft gilt (Cavalier-Smith, 2000) und auch die Übereinstimmung der Targeting-Mechanismen für eine identische Membrananzahl spricht (Foth und McFadden, 2003), existieren verschiedene Angaben für die Anzahl der Apicoplast-Membranen (3-5, Roos *et al.*, 2001; Maréchal, 2001; 4 (*Toxoplasma*) bzw. 3 (*Plasmodium*), Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001).

Das 35 kb-Genom, das im Falle von Pf in 1-15 Kopien (Köhler *et al.*, 1997) und überwiegend zirkulärer Form (Williamson *et al.*, 2001) vorliegt, hat den niedrigsten Informationsgehalt aller Organellengenome (Roos *et al.*, 2002) und codiert insgesamt für lediglich 30 Proteine (Wilson *et al.*, 1998). Dazu gehören v. a. Gene, die der Proteinexpression in der Organelle dienen. Der direkte Nachweis Apicoplast-codierter Proteine konnte noch nicht erbracht werden, woraus die Vermutung resultiert, dass sie nur in infinitesimalen Mengen produziert werden. Die überwiegende Mehrheit der für endosymbiotische Organellen bestimmten Proteine wird im Cytoplasma synthetisiert und posttranslational importiert (Hauke und Schatz, 1997). Die Kerncodierung vieler Organellenproteine resultiert aus einem zurückliegenden Gentransfer von dem Genom des an Selbständigkeit verlierenden Endosymbionten (Gardner *et al.*, 2002). Bislang ist die Apicoplastlokalisierung in Pf für nur wenige kerncodierte Proteine verifiziert (Waller *et al.*, 2000), aber Schätzungen belaufen sich auf 150 (Roos *et al.*, 2002) bis 551 (Gardner *et al.*, 2002) Apicoplast-Kandidaten; letztere Zahl entspricht 10% der kerncodierten Proteine.

Der Transfer in den Apicoplasten wird durch eine zweiteilige N-terminale Leadersequenz vermittelt. Wird der N-terminale Teil an GFP gekoppelt, führt das zur Sekretion des Proteins (bzw. Anhäufung in der PV; Waller *et al.*, 2000), was daraufhin deutet, dass das Apicoplast-Targeting über den sekretorischen Weg erfolgt (Van Dooren *et al.*, 2000). Wird er durch eine andere allgemeine Sekretionssignalsequenz (z. B. von Parasitenoberflächenproteinen) ersetzt, bleibt der Transport in den Apicoplasten erhalten. Bei Deletion des Sekretionssignals akkumuliert das Protein im Cytosol (Waller *et al.*, 2000). Nach Eintritt in das Endomembransystem erfolgt wahrscheinlich die Abspaltung dieser ersten Sequenz (Signalpeptid) und legt so die Plastid-gerichtete Domäne (Transitpeptid; TP) frei (Roos *et al.*, 2002; Van Dooren *et al.*, 2002).

Diese subterminale Domäne ist von sehr variabler Länge (40-200 AS) und ähnelt Transitpeptiden für pflanzliche Chloroplastenproteine. (Foth *et al.*, 2003). Auch sie ist essentiell für erfolgreiche Verbringung in den Apicoplasten (Roos *et al.*, 2002), kann aber durch eine Chloroplasten-Signalsequenz ersetzt werden (Crawford, unveröffentlicht in Roos *et al.*, 2002). Sogar eine Leadersequenz aus einem Standard-Signalpeptid eines sekretorischen

Proteins gekoppelt an ein pflanzliches Chloroplasten-Transitpeptid ist hinreichend für die Verbringung in den Apicoplasten (Crawford und Roos, unveröffentlicht in Van Dooren *et al.*, 2000).

Weitere gut etablierte Charakteristika eines Plastid-Transitpeptids sind die positive Nettoladung, und Bindungsstellen für Chaperone wie Hsp70. Ansonsten sind noch keine Consensus-Sequenzen oder strukturellen Eigenschaften bekannt (Foth und McFadden, 2003). Eine Vermutung ist, dass wichtige Eigenschaften durch Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmt werden (Van Dooren *et al.*, 2000). Andererseits scheinen Chloroplasten-TP in wässrigem Medium gar keine Sekundär- oder Tertiärstruktur zu besitzen (Von Heijne und Nishikawa, 1991).

Zu den Biosynthesewegen, die mit dem Apicoplasten in Verbindung gebracht werden, gehören die Bildung von AS, Häm, Isoprenoiden und Fettsäuren. Dies lässt vermuten, dass genannte Verbindungen z. T. aus dem Apicoplast exportiert werden, wie es für Pflanzenplastide der Fall ist (Gardner *et al.*, 2002). Im Falle nicht-photosynthetischer Pflanzenplastide ist der Export dieser Substanzen der Grund für den Erhalt der Organellen (Foth und McFadden, 2003). Als Kohlenstoffquelle für diese Synthesen scheinen importierte Triosephosphate und PEP zu dienen (Roos *et al.*, 2002).

Besondere Bedeutung wurde der Entdeckung von Enzymen des DOXP(1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat)-Weges in Pf beigemessen, da der HMG-CoA-Weg (Mevalonat-Weg) zur Synthese von Isoprenoiden in Apicomplexa-Parasiten fehlt (Jomaa *et al.*, 1999). Da sich der DOXP-Weg (Non-Mevalonat-Weg) nicht in Säugetieren findet, würden dazugehörige Enzyme also ideale *drug targets* darstellen. Beim DOXP-Weg wird zunächst aus Pyruvat und GA3P DOXP hergestellt und daraus schließlich Isopentenylphosphat. Drei der in diesen Weg involvierten Enzyme wurden bislang identifiziert (Gardner *et al.*, 2002), für eines davon konnte Apicoplast-Targeting in *Toxoplasma* gezeigt werden (Jomaa *et al.*, 1999). Jomaa und Kollegen demonstrierten außerdem die Wirksamkeit des Antibiotikums und Herbizids Fosmidomycin, das sich gegen genanntes Enzym richtet, bei *P. vinckei*.

Für die Existenz eines Plastid-lokaliserten TypII-Fettsäure-Syntheseweges sind u. a. mit dem Nachweis verschiedener involvierter Enzyme im A. zahlreiche Beweise erbracht (Waller *et al.*, 2000; Jelenska *et al.*, 2001; Surolia und Surolia, 2001), und es wird vermutet, dass es sich bei der *de novo*-Generation von Fettsäuren um einen essentiellen Stoffwechselweg des Parasiten handelt. Zur Ausbildung der PV nach der Wirtszellinvasion benötigt der Parasit große Mengen an Membranlipiden, und die Notwendigkeit des Plastids für deren Bereitstellung würde den *delayed death* nach Zerstörung des Apicoplasten erklären (Foth und McFadden, 2003). Reduziertes Ferredoxin, das in nicht-photosynthetisch aktiven Plastiden NADPH-abhängig durch die FNR entsteht, könnte als Reduktionsmittel für die Desaturierung von Fettsäuren dienen.

Fichera und Roos vermuten eine Rolle des Apicoplasts bei der Etablierung der Parasitophoren Vakuole während der Wirtszellinvasion (1997). Die Bedeutung des Plastids für die Infektion der Wirtszelle wurde bereits mit der Beobachtung des *delayed death* durch Antibiotika suggeriert. Das Wachstum von Apicomplexa-Parasiten kann durch Verbindungen gehemmt werden, die die Autonomie des Apicoplasten zerstören, sei es auf Ebene der DNA-Replikation oder der Transkription, RNA-Prozessierung, Translation oder Proteinreifung

(McFadden und Roos, 1999). Der *delayed death* wurde auch bei Plastid-defizienten Parasiten beobachtet (He *et al.*, 2001). Der Apicoplast hat also, obwohl oft als degeneriertes Plastid angesehen, vitale Funktionen.

### 1.1.2.2 Hämoglobin-Abbau

Bei Hämin handelt es sich chemisch gesehen um Ferriprotoporphyrin IX, d. h. um Häm, dessen zentrales Eisenatom im Oxidationszustand (+3) vorliegt. Häm ist der katalytisch essentielle Bestandteil zahlreicher Enzymproteine, wie beispielsweise Cytochrom P450 oder Katalase. Vor allem aber dient es durch seine Fähigkeit, Sauerstoff anzulagern als dessen Träger im Blut in Form des Oxyhämoglobin. Das Hämoglobin der Erythrozyten stellt auch den größten Hämspeicher des Körpers dar (Hebbel und Eaton, 1989).

Erhöhte Konzentrationen an freiem Häm als Produkt der Hämoglobin-Denaturierung finden sich bei Krankheitsbildern wie z. B.  $\beta$ -Thalassämie, Sichelzellanämie (Shaklai *et al.*, 1985) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Mangel (Janney *et al.*, 1986), aber auch unter erhöhtem oxidativem Stress (Hebbel und Eaton, 1989).

Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) interkaliert in die Membran-Doppelschicht und bindet an Membranproteine (Kirschner-Zilber *et al.*, 1982), was über die Dissoziation von Membranskelettproteinen (Liu *et al.*, 1985) und die Steigerung der Membranpermeabilität zu der unter gesteigerten Häminkonzentrationen beobachteten Zellyse führen kann (Fitch *et al.*, 1983). Eine FP-Konzentration von 6  $\mu$ M ist ausreichend für diese Wirkung (Chou und Fitch, 1980). Eine weitere Ursache für die Toxizität des FP ist neben den Detergens-ähnlichen Eigenschaften (Chou und Fitch, 1981) seine Elektrophilie/Redoxaktivität (Tappel, 1953). So ist beispielsweise die Induktion der Peroxidation von Membranlipiden durch FP beschrieben (Sugioka *et al.*, 1987).

Die Erhöhung der FP-Konzentration in Malaria-infizierten Erythrozyten ist auf den Hämoglobin-Verdau des Parasiten zurückzuführen. Das Hämoglobin wird dazu samt weiteren Bestandteilen des Wirtscytoplasmas durch Pinozytose aufgenommen und in diesen sogenannten Transportvesikeln (TV) (laut Hempelmann *et al.* geschehen Hb-Verdau und Hämpolymerisation schon in den TV (2003)) zur sauren Fressvakuole (FV) (pH 5.2) gebracht, wo der eigentliche Abbau stattfindet (Francis *et al.*, 1997). Dieser beginnt mit der Umwandlung des Oxy- in Methämoglobin. Das dabei entstehende Superoxid dismutiert im umgebenden sauren Milieu spontan zu  $H_2O_2$  (Francis *et al.*, 1997), welches ebenfalls zur Steigerung des oxidativen Stress' beiträgt. Der niedrige pH der FV ist notwendig, um die Aktivierung der Proenzyme der Aspartat-Proteasen Plasmepsin I und II zu ermöglichen. Diese könnten dann nach heutigem Kenntnisstand den Verdau des Hämoglobin-Proteins beginnen. Allerdings wurde die zur Aktivierung ebenfalls benötigte spezifische Protease noch nicht in der Fressvakuole nachgewiesen (Ginsburg, 2003). Die weitere Zerkleinerung der durch die Plasmepsine entstandenen Fragmente in Peptide wird der Cystein-Protease Falcipain zugeschrieben (Francis *et al.*, 1997). Die Hydrolyse der Peptide in Aminosäuren erfolgt möglicherweise nicht in der FV, sondern im Cytoplasma. Die Gewinnung der Aminosäuren stellt das Ziel des Hämoglobin-Verdaus dar – der Parasit verwendet sie zur Synthese seiner Proteine (Francis *et al.*, 1997); letztere wird durch Häm auch stimuliert (Surolia und Padmanaban, 1991). Die Intensität dieses Abbaus überschreitet jedoch das Ausmaß, das für

die ausreichende Bereitstellung der Aminosäuren nötig wäre. Eine Erklärungsmöglichkeit für die extensive Hämoglobindegradation wird in der Notwendigkeit gesehen, den osmotischen Druck des Wirtscytoplasmas abzusenken: Nur durch die Verringerung der Konzentration impermeabler gelöster Stoffe könne eine vorzeitige Lyse der stark permeabilisierten Wirtszelle verhindert werden, so postulieren Lew *et al.* (2003).

Ein Teil des als Nebenprodukt entstehenden Ferriprotoporphyrins unterliegt in der digestiven Vakuole einem Polymerisierungsprozess, bei dem das Fe(III) einer Häm-Untereinheit mit der Propionat-Seitenkette einer zweiten verknüpft wird. Einzelne Ketten werden zusätzlich über die Carboxylatgruppen quervernetzt, wodurch die Struktur des entstehenden unlöslichen Pigmentes Hämozoin Komplexität und Festigkeit erhält (Pagola *et al.*, 2000). Der Prozess der Hämozoin-Bildung stellt ein interessantes *drug target* dar und ist immer noch Gegenstand der Forschung. Während anfänglich die Beteiligung einer Hämpolymerase vermutet wurde (Slater und Cerami, 1992), gab es zwischenzeitlich auch Hinweise auf einen spontanen Ablauf des Prozesses (Adams *et al.*, 1996) und auf eine autokatalytische Umwandlung von Häm durch vorgebildetes Hämozoin (Dorn *et al.*, 1995). Mittlerweile gilt jedoch die Notwendigkeit der Anwesenheit parasitischen Materials als gesichert (Pandey und Tekwani, 1996). Ebenso akzeptiert ist die Beteiligung von Phospholipiden (Egan *et al.*, 1994) und HRP (*histidin-rich proteins*) (Sullivan *et al.*, 1996), wenngleich noch strittig ist, ob genannte Komponenten in dem Maße in der FV vorhanden sind, um eine hinreichende Katalyse des Prozesses zu bewirken. Uneinigkeit herrscht ferner über den Anteil an freiem FP, der der Polymerisierung entgeht. Einige Autoren ermittelten den als Hämozoin entgifteten Teil des FP mit lediglich 20-30% (Ginsburg *et al.*, 1998; Loria *et al.*, 1999), während andere ihn mit 95% beziffern (Egan *et al.*, 2002). Für das Nicht-Hämozoin-FP werden verschiedene Möglichkeiten der Entgiftung diskutiert: Bei der peroxidativen Degradation entsteht durch Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zunächst das Ferrylintermediat. Elektronentransfer innerhalb dessen bewirkt die Öffnung des Porphyrinrings, und es entstehen letztendlich dipyrrolische Fragmente. Die GSH-abhängige Degradation findet im Cytosol statt, wohin das FP durch seine Membrangängigkeit gelangen kann. Die Reaktion ist Sauerstoff- und stark pH-abhängig (bei 7.0 maximal, bei 8.0 kaum feststellbar). Ascorbinsäure steigert den Vorgang (Zou *et al.*, 2002). Die Identität der Endprodukte ist nicht geklärt, sie unterscheiden sich jedoch von denen des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Abbaus, wenngleich auch hier der Tetrapyrrolring zerstört wird. Bei der GSH-FP-Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid, was neben dem GSH-Verbrauch als Grund für die Häm-induzierte Steigerung des Hexosemonophosphatweges (HMPS) im Erythrozyten angesehen wird (Atamna und Ginsburg, 1995). Da bei beiden Degradationsprozessen letztlich auch freies Fe(III) entsteht, welches als Promotor von Radikalbildungsprozessen wirkt, kann man die Entgiftungsfunktion der Abläufe wohl ohnehin nur als eingeschränkt betrachten, zumal auch in der Dekompartimentierung des Eisens ein Grund für Hämolyse gesehen wird (Gutteridge, 1986). Eine Puffermöglichkeit für steigende FP-Konzentrationen ergibt sich durch die Bindung von FP an verschiedene Proteine (Harwaldt *et al.*, 2002). Während die Proteinbindung zunächst als unspezifisch bezeichnet wurde (Atamna und Ginsburg, 1995), indizieren jüngere Studien Selektivität (Famin und Ginsburg, 2003). Aus der Interaktion mit FP kann allerdings auch die Hemmung entsprechender Enzymfunktionen resultieren, wie für einige Erythrozyten-Enzyme gezeigt wurde (Aldolase, 6-Phosphogluconatdehydrogenase,

Adenylatkinase, Pyrimidinnucleosidmonophosphat-Kinase etc.;  $K_i \sim 1 \mu\text{M}$ ; Zerez *et al.*, 1987). Die GSH-abhängige Abbaumöglichkeit ist jedoch trotz Proteinbindung gegeben (Famin *et al.*, 1999).

Interessanterweise hemmen die auf der Aminochinolinstruktur basierenden Antimalaria-Medikamente sowohl die Polymerisierung des FP als auch die genannten Degradationsprozesse. Gesteigert wird dagegen die Membranassoziation des FP (Ginsburg *et al.*, 1998). Insgesamt verstärken solche Medikamente also die FP-Toxizität, während die Katalase- und Peroxidase-Eigenschaften des FP beeinträchtigt werden (Loria *et al.*, 1999).

Die weitere Aufklärung des FP-Metabolismus ist damit sowohl für die Entwicklung neuer Antimalaria-Wirkstoffe von Belang als auch für die Umgehung der wachsenden Resistenz gegenüber bislang verwendeten Substanzen (Becker *et al.*, 2004).

## 1.2 Antioxidative Systeme

Aerobe Lebensbedingungen, das bedeutet ein sauerstoffabhängiger Energiestoffwechsel, sind unweigerlich mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verknüpft. Dazu zählen Radikale wie das Superoxid-Anion oder das äußerst aggressive Hydroxylradikal, aber auch nicht-radikalische Spezies wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Singulett-Sauerstoff. Diese Moleküle können die verschiedensten Biomoleküle angreifen und somit über Enzyminaktivierung (Stadtman und Levine, 2000; Szweda *et al.*, 2002), Lipidperoxidation (Sanchez-Perez *et al.*, 2005) und Veränderung von Nucleinsäuren (Marnett, 2000) die Zelle schädigen. Es existiert jedoch auch ein vielfältiges System von zellulären Verteidigungsmechanismen. Daher spricht man erst dann von oxidativem Stress, wenn die Entstehung der ROS deren Entgiftungsmöglichkeiten übersteigt (Sies und Cadenas 1985). Klassische Bestandteile des ROS-Entgiftungssystems sind Superoxid-Dismutase ( $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ), Katalase ( $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) und die Systeme basierend auf Glutathion und Thioredoxin (Nordberg und Arnér, 2001).

Die Toxizität der reaktiven Verbindungen macht sich der Säuger-Organismus bei der Abwehr von Eindringlingen zunutze: Das Immunsystem produziert in dieser Situation gezielt ROS, z. B. durch die Katalyse des Enzyms NADPH-Oxidase. Pathogene Mikroorganismen stehen daher bereits durch den Befall des Wirtes unter oxidativem Stress. Aber auch die hohe Teilungsgeschwindigkeit und deshalb enorme Stoffwechselleistung bringt für Erreger wie Pf, aber auch für Tumorzellen starke oxidative Belastung mit sich (Becker *et al.*, 2004; Pelicano *et al.*, 2004). Spezifisch für *Plasmodium* ist die Oxidantienproduktion im Zuge des Hämoglobin-Verdaus.

Die ROS-Produktion beeinträchtigt nicht nur den Parasiten: Verschiedene Manifestationen der Malaria sind mit dem oxidativen Stress des Patienten verknüpft (Becker *et al.*, 2004). Andererseits sind gerade Individuen, deren Genotyp einen erhöhten ROS-Level in den Erythrozyten bedingt (Browne *et al.*, 1998, Tavazzi *et al.*, 2001), wie Sichelzellanämie oder Thalassämie, relativ vor Malaria geschützt (Becker *et al.*, 2004). Viele der bislang verwendeten Antimalaria-Substanzen wie Chloroquin, Artemisinin (Jefford, 2001) und Methylenblau (Färber *et al.*, 1998) wirken ebenfalls über die Erhöhung des oxidativen Stress'. Die Bestandteile des parasitären ROS-Entgiftungssystems sind daher ideale Zielmoleküle für



die Medikamentenentwicklung. Da Pf wahrscheinlich weder Katalase noch eine klassische GPx besitzt (Sztajer *et al.*, 2001), gewinnen Trx- und GSH-System an Bedeutung.

## 1.2.1 Das Glutathion-System

### 1.2.1.1 Glutathion (GSH) und Glutathionreduktase (GR)

Das Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin) ist für die meisten Organismen das wichtigste niedermolekulare Thiol – seine intrazelluläre Konzentration bewegt sich im millimolaren Bereich. Es wirkt sowohl direkt als Antioxidans, z. B. über den Abbau von FPIX und die Regeneration von Ascorbat, als auch indirekt als Substrat für entgiftende Enzyme wie Glutathionperoxidase oder Glutaredoxin. Dabei wird es zum Glutathiondisulfid oxidiert; seine Regeneration erfolgt durch das Flavoenzym Glutathionreduktase nach der Reaktion



Üblicherweise beträgt das cytosolische Konzentrationsverhältnis GSH:GSSG 100:1 (Färber *et al.*, 1998).

Eine weitere Funktion von GSH ist die Bildung gemischter Proteindisulfide. Diese Glutathionylierung erfolgt vor allem an redox-aktiven Proteinen, deren katalytische Zentren zwar dadurch blockiert, aber auch vor irreversibler Oxidation geschützt werden (Ghezzi und Bonetto, 2003). Die Konjugation mit GSH wird ferner zur Entgiftung von Xenobiotika genutzt. Hier ist die Glutathion-S-Transferase (GST) das katalysierende Enzym (Harwaldt *et al.*, 2002). Schließlich arbeiten auch Glyoxalasen GSH-abhängig und entfernen so  $\alpha$ -Ketoaldehyde.

Das Flavoenzym Glutathionreduktase gehört wie die TrxR zur Enzymfamilie der Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen und ist als Homodimer aktiv; ihr fehlt jedoch das C-terminale Redoxzentrum (s. u.). Jede Untereinheit besteht aus drei Domänen, der FAD-Domäne, in welcher FAD als prosthetische Gruppe vorliegt, der NADP<sup>+</sup>-Domäne, welche NADPH bindet, und der Zwischendomäne, welche mit der FAD-Domäne der anderen Untereinheit die Glutathionbindungsstelle bildet. Verbindungen, die die Dimerisierung hemmen, verhindern über die fehlende Glutathionbindung auch die Aktivität des Enzyms (Sarma *et al.*, 2003). Zwar besitzen wohl die meisten eu- und prokaryotischen Organismen eine GR, es gibt jedoch auch Ausnahmen wie z. B. *Trypanosoma*, die statt GSH Trypanothion verwenden, *Drosophila melanogaster* und auch den Malaria-Vektor *Anopheles gambiae* (Kanzok *et al.*, 2001). Da letztere jedoch GSH als Antioxidans einsetzen, sind sie auf alternative Regenerationsmechanismen angewiesen. Einer davon ist die nicht-enzymatische Reaktion zwischen Thioredoxin und GSSG (Bauer *et al.*, 2002). Diese Interaktion stellt eine wichtige Verknüpfung zwischen GSH- und Trx-System dar. Das GSH-System ist auch bei Pf vorhanden: Derzeit sind eine GR, ein Glutaredoxin, eine GST, mehrere Glyoxalasen und mehrere Glutaredoxin-ähnliche Proteine (Glp) bekannt (Färber *et al.*, 1998; Harwaldt *et al.*, 2002; Iozef *et al.*, 2003; Deponte *et al.*, 2005). Das Plasmodien-spezifische Protein Plasmoredoxin kann sowohl von Trx als auch von GSH und Grx reduziert werden (Becker *et al.*, 2003), wodurch sich eine weitere Verbindung der beiden Systeme ergibt.

Darüber hinaus kann die Ribonukleotidreduktase von Trx wie auch Grx mit Elektronen versorgt werden, was die Systeme in die DNA-Synthese involviert.

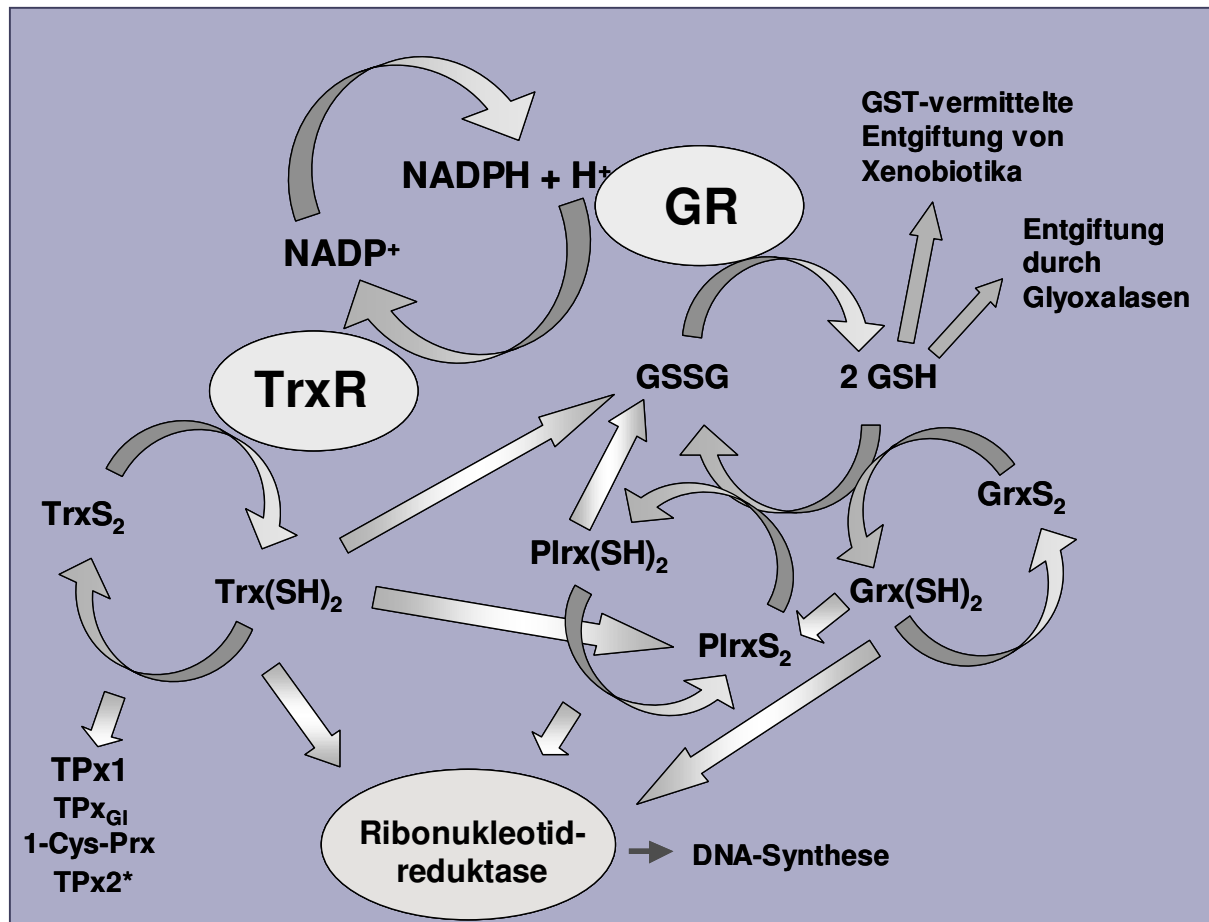


Abb. 1.5. Trx- und GSH-System von *Plasmodium falciparum*.

\* Die Substratspezifität der TPx2 ist noch nicht geklärt.

### 1.2.1.2 Glutaredoxin (Grx)

Glutaredoxine, oft auch als Thioltransferasen bezeichnet, sind kleine, ubiquitäre Oxidoreduktasen, die der Thioredoxinfamilie angehören. Sie haben für gewöhnlich ein Molekulargewicht von 10-15 kDa und klassischerweise ein Cys-Pro-Thr-Cys-Motiv im aktiven Zentrum (Rahlfs *et al.*, 2001; Rouhier *et al.*, 2004). Ihre Reduktion erfolgt im allgemeinen durch das GSH-GR-System; für den Phagen T4 ist beispielsweise jedoch auch eine Regeneration durch TrxR beschrieben (Nikkola *et al.*, 1993). Das Redoxpotential der Grx ist höher als das der Trx (*E.coli*-Grx -190 bis -230 mV vs. -270 bis -330 mV von Trx) (Rouhier *et al.*, 2004). Die typischen Glutaredoxine können sowohl einen Dithiol-Disulfid-Austausch durchführen, für den beide Cysteine der *active site* nötig sind (Bushweller *et al.*, 1992), als auch gemischte Protein-Glutathion-Disulfide reduzieren, wozu nur das N-terminale Cystein gebraucht wird. Letztgenannte Reaktion wird auch als Deglutathionylierung bezeichnet (Starke *et al.*, 2003) und wird laut Lundberg *et al.* bevorzugt durchgeführt (2001). Die möglichen *in vivo*-Funktionen von Glutaredoxinen sind daher besonders in Bezug auf Enzymregulation vielfältig (Rouhier *et al.*, 2004).

Besonderes Interesse ziehen auch Fusionsproteine auf sich, in denen eine oder mehrere Grx-Domänen mit anderen funktionellen Bereichen verknüpft sind. Beispiele sind die Grx-Prx-Fusionen aus *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza* und anderen Bakterien (Rouhier und Jacquot, 2003; Pauwels *et al.*, 2000), die Methioninsulfoxidreduktase aus *Gracilaria gracilis*, an die sich N-terminal zwei Grx-Domänen anschließen (Rouhier *et al.*, unveröffentlicht, in Rouhier *et al.*, 2004), vor allem aber die u. a. in verschiedenen Säugern vorkommende Fusion aus Grx und TrxR: Dieses Enzym katalysiert sowohl die Trx- als auch die GSSG-Reduktion und nutzt das entstandene GSH zur Reduktion der Grx-Domäne (Sun *et al.*, 2001).

Die Grx-Aktivität *in vitro* wird v. a. über die Reduktion des artefiziellen Substrates 2-Hydroxyethyl-disulfid (HEDS) definiert (Holmgren und Åslund, 1995). Allgemein bekannt sind die Fähigkeit zur (unspezifischen) Reduktion von Dehydroascorbat (Wells *et al.*, 1990) und die Funktion als Elektronendonator für die Ribonukleotid-Reduktase (Holmgren, 1976). Die Interaktion mit Peroxiredoxinen wurde erst kürzlich beschrieben (Rouhier *et al.*, 2001 und 2002; diese Arbeit). Glutaredoxine sind über die Regulation von Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Phosphatasen an der Signaltransduktion beteiligt und beeinflussen zahlreiche Stoffwechselwege durch Reduktion oder Regulation entsprechender Enzyme. Sogar die Ausübung beider Funktionen an einem Enzym (Reduktion der *active site* und Regulation durch Glutathionierung eines weiteren Cys-Restes) sind beschrieben (PAPS-Reduktase; Rouhier *et al.*, 2004). Ferner sind Grx in Prozesse wie Apoptose, Cytoskelett-Organisation und die Zusammensetzung von Fe-S-Clustern in Mitochondrien involviert (Rouhier *et al.*, 2004).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass Nullmutanten für mehrere Grx (z. B. die drei Monothiol-Grx aus *Saccharomyces cerevisiae* (Grx3-5)) nicht lebensfähig sind (Collinson *et al.*, 2002). Jedoch können andere Mehrfachdeletionen wiederum von anderen Grx kompensiert werden. Das Trx-System kann ebenfalls einen Grx-Mangel z. T. auffangen und umgekehrt, wie für *E. coli* gezeigt (Fernandes und Holmgren, 2004).

Auch für eine direkte Verbindung zwischen den beiden Proteinen existieren einige Indizien. Beispielsweise wird das ScGrx5 durch *E. coli*-Trx vergleichbar effizient reduziert wie durch GSH (Rouhier *et al.*, 2004). Umgekehrt reduziert Trx aus Pappel das entsprechende Grx (Gelhaye *et al.*, 2003). Auch die Regulation von Trx durch Grx ist denkbar, denn humanes Trx kann am Cys73 glutathioniert und dadurch inaktiviert werden. Grx könnte diese Modifizierung rückgängig machen (Casagrande *et al.*, 2002).

Grx selbst können wahrscheinlich auch durch Glutathionierung inaktiviert werden, wie Studien mit humanem Grx1 und *E. coli*-Grx3 indizieren. Der Mechanismus ist dabei die Bildung eines gemischten Disulfids mit einem Cysteinrest ausserhalb der *active site* (C83 im humanen, C65 im *E. coli*-Protein) (Lundberg *et al.*, 2001).

Für *Plasmodium falciparum* sind ein Grx und drei *Grx-like proteins* (PfGlp1-3) beschrieben (Rahlfs *et al.*, 2001; Deponte *et al.*, 2005). PfGrx stellt mit der *active site*-Sequenz CPYC ein klassisches (2-Cys-)Grx dar. Es hat mit HEDS eine spezifische Aktivität von 47 U/mg, der  $K_M$  für das artefizielle Substrat wurde mit 700  $\mu\text{M}$  gemessen, der für GSH liegt  $> 4 \text{ mM}$ . Die Affinität der Ribonucleotidreduktase (aus *T. brucei*) für das Protein ist vergleichbar mit der für das *E. coli*-Homolog ( $K_M = 0.2\text{-}0.5 \mu\text{M}$  vs.  $0.4 \mu\text{M}$ ). Optimale Aktivität zeigt es bei pH

8.6, und Temperaturen bis 60°C haben ihm nichts an. Die Aktivität wurde in verschiedenen Parasitenstämmen nachgewiesen (Rahlfs *et al.*, 2001). PfGrx kann außerdem als Elektronendonator für das *Plasmodien*-spezifische Protein Plrx dienen (Becker *et al.*, 2003).

Die Glp1-3 enthalten im aktiven Zentrum das sog. PICOT (Proteinkinase C-interacting cousin of thioredoxin)-Motiv, CFGS, sind also PICOT-HD (*homology domain*)-haltige Proteine (Isakov *et al.*, 2000; Deponte *et al.*, 2005). Während typische Grx-Aktivitäten für Glp1 und 2 nicht gefunden wurden, kann Glp1 jedoch, wie das ScGrx5, Ni<sup>2+</sup> reduzieren. Es wird daher eine Funktion im Fe-S-Cluster-Stoffwechsel in Betracht gezogen (Deponte *et al.*, 2005).

## 1.2.2 Das Thioredoxin-System

### 1.2.2.1 Thioredoxinreduktase (TrxR)

Wie aus Abb. 1.5. ersichtlich, stellen die TrxR und ihr Substrat Thioredoxin (Trx) die Grundbausteine des danach benannten Systems dar.

Säuger-TrxR gehören zur Familie der Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen, die alle FAD als prosthetische Gruppe nutzen und als Homodimere aktiv sind. Weitere Mitglieder dieser Familie sind Glutathionreduktase, Trypanothionreduktase, (Dihydro-)Liponamid-dehydrogenase und Quecksilberionen-Reduktase (Gromer *et al.*, 1999). Genannte Enzyme zeigen große Ähnlichkeiten hinsichtlich Struktur und Mechanismus. Die bestehenden Unterschiede führen bei den TrxR zu einer Aufteilung in große (Säuger-, Pf-; M<sub>w</sub> etwa 55 kDa pro UE) und kleine (Bakterien-, Pflanzen-, Pilz-; M<sub>w</sub> etwa 35 kDa pro UE) Vertreter.

Der grundsätzliche Mechanismus ist wie folgt: Von NADPH wird ein Reduktionsäquivalent zunächst auf das Flavin und von dort auf das *active site*-Disulfid übertragen (Abb. 1.6). Es entsteht im Falle der großen TrxR (und auch der GR und LipDH) ein *Charge-Transfer* (CT)-Komplex zwischen Thiolat (C93 in PfTrxR) und Flavin, der sich durch ein Absorptionsmaximum bei 540 nm auszeichnet. In den kleinen TrxR dagegen wird der CT-Komplex nicht stabilisiert, und reduzierte Enzyme sind daher ein Gemisch aus FAD-Dithiol-Formen und solchen mit reduziertem Flavin und Disulfid (Williams *et al.*, 2000).

Die genannte *active site* beinhaltet das Motiv CXXXXC; in der PfTrxR befinden sich die Cysteine in den Positionen 88 und 93. Wie in hTrxR und hGR gehören sie zur FAD-Bindungsdomäne. Im Enzym aus *E. coli* sind sie dagegen in die NADPH-Bindungsdomäne eingebettet und nur durch zwei AS-Reste getrennt (Müller *et al.*, 1996). Die eigentliche Besonderheit von Säuger- und auch PfTrxR liegt jedoch im C-Terminus: Dort befindet sich, direkt benachbart dem letzten AS-Rest (Gly) ein zusätzliches, redoxaktives Dithiol/Disulfid. Im *Plasmodium*-Enzym ist dies das C535XXXXC540, in der hTrxR das SeCys496-Cys497-Element. Das Selenocystein in diesem peripheren Redoxzentrum ist ein Markenzeichen der Säuger-TrxR (Becker *et al.*, 2000). Die Funktionalität der Gruppierung, ebenso wie die Bedeutung des Selens in den Säugerformen wurde anhand entsprechender Mutanten demonstriert (Williams *et al.*, 2000; Gromer *et al.*, 1999; Brandt und Wessjohann, 2005).

Zwar sind die K<sub>M</sub>-Werte der humanen SeCys→Cys-Mutante dem Wildtyp ähnlich; der thermodynamische Vorteil von Selenocystein gegenüber Cystein resultiert jedoch in einer 1000x schnelleren Umsetzungsgeschwindigkeit.

Die Beteiligung des C-terminalen Motivs am Reaktionsmechanismus wurde ebenfalls durch Mutagenese-Experimente deutlich. Das *active site*-Dithiol der einen UE gibt seine Elektronen an das periphere Disulfid der benachbarten UE weiter. Auf diese Weise gelangen die Reduktionsäquivalente aus dem apolaren Inneren des Enzyms über das als Shuttle fungierende periphere Dithiol an die Oberfläche und werden somit für das Substrat zugänglich (Williams *et al.*, 2000).

In niedrigeren Spezies, denen der C-terminale Arm fehlt (kleine TrxR), wird der Transfer durch Rotation der Domänen erreicht. Im Falle von GR und LipDH dagegen sind die Substrate klein genug, um selber in die Nähe des *active site*-Dithiols zu gelangen (Williams *et al.*, 2000).

In Säugern kennt man drei verschiedene TrxR-Gene und -Proteine: die cytosolische TrxR1, die der TrxR1 eng verwandte TrxR2 und die entwicklungsgeschichtlich etwas entferntere TrxR3, die aber dennoch über 50% Identität zu den Enzymen 1 und 2 aufweist. TrxR3 besitzt ein mitochondriales Signalpeptid und wird auch in der entsprechenden Fraktion gefunden (Gromer *et al.*, 2000).

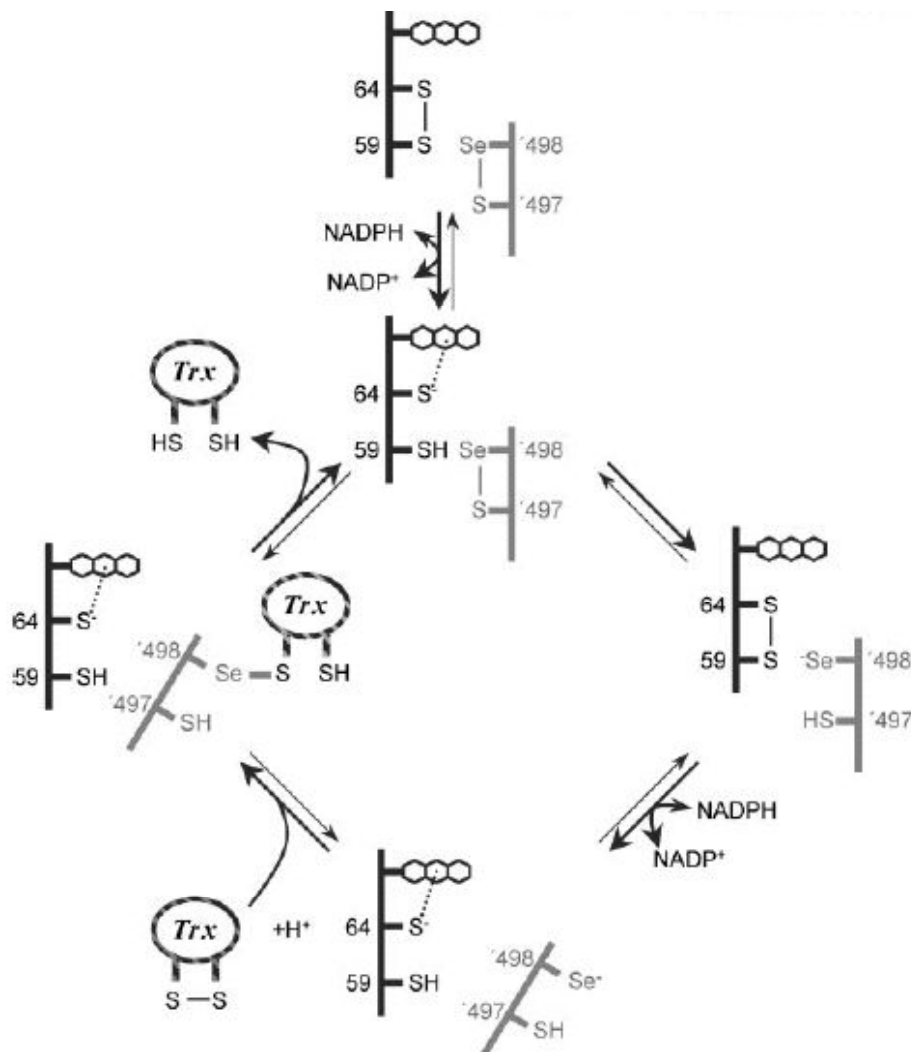


Abb. 1.6. Reaktionsmechanismus der hTrxR. Aus: Gromer *et al.*, 2004.

TrxR-Aktivität im Allgemeinen findet sich in allen subzellulären Kompartimenten. Als Richtwert kann eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in der Zelle angenommen werden. Dagegen ist die Plasmakonzentration mit etwa 160 pM relativ gering (Gromer *et al.*, 2004). Die cytosolische TrxR findet sich jedoch angereichert unter und sogar assoziiert mit der Plasmamembran. Es existieren Hinweise auf eine Transmembranaktivität des Enzyms. Damit wäre sichergestellt, dass sezerniertes Thioredoxin den reduzierten Zustand erlangt, den es benötigt, um z. B. als autokriner Wachstumsfaktor zu fungieren (Gromer *et al.*, 2000). Über die Oxidation durch ROS wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  fungiert die cytosolische TrxR wahrscheinlich auch als eine Art Redoxsensor (Gromer *et al.*, 2000).

Säuger-TrxR zeichnen sich durch ein ungewöhnlich breites Substratspektrum aus. So werden durch hTrx neben Trx und dem artefiziellen Substrat Dithiobisnitrobenzoat (DTNB) auch Dehydroascorbat (May *et al.*, 1997), das Monodehydroascorbat-Radikal (May *et al.*, 1998), Ubichinon (Xia *et al.*, 2003), S-Nitrosoglutathion (Transportform von NO) (Nikitovic und Holmgren, 1996; Becker *et al.*, 1998), Liponamid bzw. Liponsäure (Arnér *et al.*, 1996) und Lipidhydroperoxide (Björnstedt *et al.*, 1995) reduziert. Diese Aufzählung ist bei weitem nicht vollständig (siehe auch Gromer *et al.*, 2004). Zu den Substraten gehören auch andere Proteindisulfide: Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer und M. Parkinson auftretenden Mikrotubuli-assoziierten Proteine Tau und *microtubule-associated protein 2* von der TrxR umgesetzt werden (Landino *et al.*, 2004b). Die mitochondriale TrxR kann NADP-, aber auch NADH-abhängig das Cytochrom c der Atmungskette reduzieren (Nalvarte *et al.*, 2004).

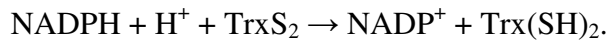
Besonderes Interesse ziehen derzeit Fusionsproteine auf sich: In *Schistosoma mansoni* und in Maus wurde ein Selenoenzym identifiziert, das sowohl TrxR- als auch GR- und Grx-Aktivität zeigt (Sun *et al.*, 2001a) und eine Fusion aus TrxR- und Grx-Domäne darstellt. Kürzlich wurde eine Thioredoxin-Glutathion-Reduktase auch in Plathelminthen identifiziert (Salinas *et al.*, 2004). Ein Fusionsprotein aus TrxR und Trx ist in Reis-Chloroplasten nachgewiesen (Serrato *et al.*, 2004).

Gereinigte TrxR aus humaner Plazenta hat einen  $K_M$  für NADPH von 18  $\mu\text{M}$ , der  $K_M$  für *E. coli*-Trx beträgt 25  $\mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 3330 \text{ min}^{-1}$  (Gromer *et al.*, 1998). Kinetische Analysen lassen vermuten, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Reaktionsmechanismus der Elektronentransfer zwischen *active site*-Dithiol und dem peripheren Redoxzentrum ist. Interessanterweise ist PfTrx1 für die hTrxR ein besseres Substrat ( $K_M = 2 \mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}} = 3300 \text{ min}^{-1}$ ) als für PfTrxR ( $K_M = 10.4 \mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}} = 3100 \text{ min}^{-1}$ ), was daraufhin deutet, dass der Parasit sich das Wirtszellenzym zunutze macht (Kanzok *et al.*, 2000).

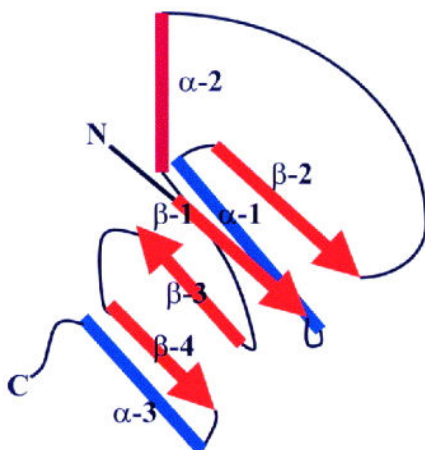
### 1.2.2.2 Thioredoxin

Thioredoxine sind von ähnlicher Größe wie Glutaredoxine (um 12 kDa) und besitzen die *active site*-Sequenz (W)CGPC(K). Der  $\text{pK}_a$ -Wert des ersten Cysteinrests in diesem Motiv ist um 1-2 Einheiten niedriger als der einer freien SH-Gruppe (8.5); bei neutralem pH liegt deshalb das Thiolat-Anion vor, was die Reaktivität des Restes erhöht (Jeong *et al.*, 2004). Eine weitere wichtige Determinante der Aktivität von Trx als Disulfidreduktase ist das Redoxpotential (um -270 bis -290 mV; Jeong *et al.*, 2004; Jacquot *et al.*, 2002). Das erste der

beiden redox-aktiven Cysteine (C30 in PfTrx1) ist relativ exponiert, und sein Thiolat-Anion kann das Disulfid eines Substratproteins nukleophil angreifen. Dieses gemischte Disulfid wird dann durch das weiter C-terminal gelegene Cystein (C33 in PfTrx1) gelöst (Gromer *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2004). Das intramolekulare Disulfid wird klassischerweise von der TrxR NADPH-abhängig reduziert:



In Säuger-Proteinen finden sich neben den beiden genannten weitere Cysteinreste (C62, 69 und 73 im hTrx1), die in bakteriellen Vertretern fehlen (Powis und Montfort, 2001). Thioredoxine sind globuläre Proteine mit einer ausgeprägten Sekundär- und Tertiärstruktur; ihre Faltungsweise findet sich auch bei verwandten Proteinen und wird als *thioredoxin fold* bezeichnet (Holmgren, 1995). 5  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen bilden dabei einen hydrophoben Kern, der von 4 oberflächlichen  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Das aktive Zentrum verbindet das zweite Faltblatt mit der zweiten Helix (Powis und Montfort, 2001), wobei das zweite Cystein in die  $\alpha$ 2-Struktureinheit integriert ist (Jacquot *et al.*, 2002). Eine wichtige Rolle für die Effizienz als Disulfidreduktase spielt das Tryptophan der *active site*, ebenso wie ein strukturell verborgener, konservierter Asparaginrest (Jacquot *et al.*, 2002; Goyer *et al.*, 1999).



**Abb. 1.7.** Schematische Darstellung des *thioredoxin fold*. Aus: Sheehan *et al.*, 2001.

Mit dieser Struktur geht oft eine hohe Hitzestabilität einher (Gleason und Holmgren, 1988).

Das humane Trx1 bildet, besonders unter oxidierenden Bedingungen oder in hohen Konzentrationen, Dimere, in denen Cys73-Cys73' als Disulfid vorliegen (Weichsel *et al.*, 1996). Die Redoxregulation von Trx ist jedoch je nach Organismus unterschiedlich, so zeigt das *Drosophila melanogaster*-Trx keine redoxabhängige Dimerisierung (Wahl *et al.*, 2005).

Für das C73 ist außerdem Glutathionylierung beschrieben, die einer vorübergehenden Inaktivierung gleichkommt (Casagrande *et al.*, 2002).

Die Vielfalt der Funktionen von Thioredoxinen wird bereits daran deutlich, dass zahlreiche Proteine, wie der *adult T-cell leukemia derived factor* (ADF), der *early pregnancy factor* (EPF) und der *Interleukin-2 receptor-inducing factor* zunächst im Zusammenhang mit ihrer Funktion entdeckt wurden, sich aber erst später als mit dem klassischen Trx identisch herausstellten (Gromer *et al.*, 2004). Das Trx1 aus *Drosophila melanogaster* ist als *deadhead gene product* in die Larvenentwicklung involviert (Bauer *et al.*, 2002).

Die klassische Funktion des Trx liegt im Prozess der DNA-Synthese: Hier katalysiert die Ribonukleotidreduktase (RiboR) die Umwandlung von Nukleotiden in Desoxynukleotide. Die dazu nötigen Reduktionsäquivalente kann sie u. a. von Trx oder Grx erhalten (Holmgren, 1989). Eine weitere Aufgabe hat Trx bei der Bekämpfung von oxidativem Stress: Es dient als

Elektronendonator für zahlreiche Prx-Proteine, die Hydroperoxide reduzieren, und kann auch selbst mit Peroxiden reagieren (u. a. diese Arbeit).

Während für die Aktivität von RiboR, Prx und auch der Methioninsulfoxid-Reduktase das Trx in den katalytischen Zyklus eingebunden ist, steht bei Interaktionen mit anderen Targetproteinen deren Aktivierung / Inaktivierung durch Reduktion oder Oxidation im Vordergrund. Bei oxidativem Stress verringert sich der Anteil des reduzierten Trx in der Zelle (unter physiologischen Bedingungen etwa 89%) (Gitler *et al.*, 2002), und Trx kann diese Information über Interaktion mit anderen Proteinen weitergeben. Eine solche Redox-Regulation kann (In-)Aktivierung von Enzymen oder auch Transkriptionsfaktoren bedeuten.

So wird beispielsweise die DNA-Bindungsfähigkeit einer Form von NF- $\kappa$ B, der seinerseits weit über 100 Gene kontrolliert (Gromer *et al.*, 2004), durch Trx-vermittelte Reduktion des Cys62 gesteigert. Trx kann jedoch auch die Trennung des Faktors von seinem Inhibitor I- $\kappa$ B und somit die Translokation in den Nucleus verhindern (Hirota *et al.*, 1999). Die Wirkung von Trx hängt dabei von seiner Lokalisation (Nucleus oder Cytosol) ab. Über die Oxidantien-induzierte Expression steigert Trx im Knochenstoffwechsel die Osteoklasten-Differenzierung, während Antioxidantien wie GPx und Prx diese verringern (Lean *et al.*, 2004). Bei der Produktion von Schilddrüsenhormonen wirkt Trx als Aktivator des Enzyms Deiodinase mit (Das *et al.*, 1988). Auch das oxidativ inaktivierte Glycolyseenzym Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase kann durch Trx reaktiviert werden (Powis und Montfort, 2001). Reduktionszustand und Konzentration von Trx beeinflussen über die Interaktion mit p53 das Zustandekommen von Apoptose (Gromer *et al.*, 2004).

Trx ist jedoch nicht nur intrazellulär zu finden. Es kann sezerniert werden und als autokriner Mediator wirken (Gromer *et al.*, 2004). Weitere mögliche Plasma-Funktionen von Trx sind die Reduktion von Vitamin K und der GPx (Preusch, 1992; Björnstedt *et al.*, 1994).

Es gibt auch Beispiele für Trx-Funktionen, die nicht über die Redoxaktivität des Proteins zustande kommen. Hier ist die Bedeutung von Trx als Untereinheit der T7-DNA-Polymerase und des Hefe-Proteins LMA1 zu nennen (Ferrari und Sölling, 1999). Auch die Regulation der ASK-1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) geschieht ohne Veränderung des Redoxzustandes (Jeong *et al.*, 2004).

Über die zahlreichen Funktionen klassischer Trx hinaus werden *thioredoxin fold* und auch das Trx-Motiv in abgewandelter Form in einigen anderen Proteinen verwendet. Prominentestes Beispiel ist die Proteindisulfidisomerase, deren *active site*-Motiv CGHC lautet. Sie zeigt sogar die für die Einstufung als Trx naheliegendste Eigenschaft: die Reduktion durch TrxR (Lundström und Holmgren, 1990). Andere Trx-Charakteristika, wie die Reduktion der Ribonukleotidreduktase, sind jedoch nicht gegeben. Trotz großer Ähnlichkeiten auch z. B. zu Grx sind doch die meisten Trx-Interaktionen mit Targetproteinen spezifisch (Jeong *et al.*, 2004).

Generell gilt Trx als ubiquitäres Protein. Die Verbreitung und Vielfalt an Varianten unterstreicht die Bedeutung von Trx. Für das einfache Pflanzenmodell *Arabidopsis thaliana* wird mit über 20 Trx-Genen gerechnet (Jacquot *et al.*, 2002). Im Säugerorganismus wurde Trx in zahlreichen Geweben mit durchschnittlichen Konzentrationen von 1-20  $\mu$ M festgestellt (Holmgren und Luthman, 1978; Gromer *et al.*, 2004).



Die subzelluläre Trx-Lokalisation ist ebenfalls breit gefächert: Trx bzw. *Trx-like proteins* werden in Cytosol, Mitochondrien, ER, Golgi-Apparat und Chloroplast gefunden (Cunnea *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2004; Marchand *et al.*, 2004; Gromer *et al.*, 2004). Durch Peroxid-Behandlung oder UV-Bestrahlung kann u. a. die Translokation cytosolischen Trx' in den Nucleus ausgelöst werden. Die physiologischen Ursachen und der Mechanismus dieses Vorgangs sind noch unklar (Powis und Montfort, 2001). Es ist auch ein direkt für den Zellkern bestimmtes Trx-Protein beschrieben (Nucleoredoxin, 48 kDa; Kurooka *et al.*, 1997). Für Säuger-Trx1 wurde darüber hinaus die Assoziation mit der Zellmembran beobachtet (Powis und Montfort, 2001; Matsuo *et al.*, 2004). Die Primärstrukturen der Trx-Proteine sind nicht sehr verwandt: Die Säuger-Isoformen zeigen durchschnittlich Identitäten von 25-35% (Jeong *et al.*, 2004).

Für Pf war bislang nur ein Trx charakterisiert (Kanzok *et al.*, 2001), es war jedoch bekannt, dass sich ähnliche, unvollständige Sequenzen im Pf-Genom befinden. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wird das erste charakterisierte PfTrx hier als Trx1 bezeichnet.

### Die Rolle des Trx-Systems bei Erkrankungen

Das Trx-System ist in zahlreiche Krankheitsbilder involviert. Pathogene Organismen sowie Tumorzellen benötigen erhöhte Aktivität des Trx-Systems für ihre intensive DNA-Synthese und zum Schutz vor dem Immunsystem des Wirts (Gromer *et al.*, 2004). *In vitro* wurde die Interaktion von Trx mit Immunglobulinen und somit deren Inaktivierung beobachtet (Magnusson *et al.*, 1997). Tumorzellen sezernieren zudem Trx als autokrinen Wachstumsfaktor (Rubartelli *et al.*, 1992). Erhöhte Trx-Plasma-Konzentrationen bei verschiedenen viralen Erkrankungen korrelieren z. T. mit der Prognose. Das Trx-System spielt eine Rolle bei neurodegenerativen (M. Alzheimer, M. Parkinson) (Landino *et al.*, 2004a) und chronisch entzündlichen Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, Sjögren's Syndrom) (Saito *et al.*, 1996), und auch Gefäßerkrankungen als Folgeerscheinungen von Diabetes mellitus können mit Trx in Verbindung gebracht werden: Hyperglykämie bewirkt über die Induktion eines Inhibitors (Txnip = *Trx-interacting protein*) eine Hemmung der ROS-Scavenger-Funktion des Trx (Schulze *et al.*, 2004).

Aufgrund dieser Zusammenhänge stellen die Komponenten des Trx-Systems interessante Zielmoleküle zur Medikamentenentwicklung dar. Organische Goldverbindungen wie Auranofin, die zur Behandlung rheumatoider Arthritis eingesetzt werden, aber auch antineoplastisch wirken, hemmen die humane, reduzierte TrxR im nanomolaren Bereich. Angriffspunkt der Goldverbindungen ist wahrscheinlich der Selenocysteinrest. (Gromer *et al.*, 1998). Cytostatika der Gruppe der Nitrosoharnstoffe (z. B. Carmustin) wirken ebenfalls hemmend auf die hTrxR; wiederum ist nur die reduzierte Form sensitiv. Da die Substanzen dieser Klasse allgemein mit Thiolen bzw. Selenolen reagieren, sind auch andere Enzyme wie die GR von der Hemmung betroffen. Somit entfallen zwei Reduktionsmöglichkeiten für die RiboR (Gromer *et al.*, 2004; Gromer *et al.*, 1997).

In die Reihe der TrxR-Inhibitoren mit Antitumorwirkung gehören auch Terpyridin-Platin(II)-Komplexe, Organotellurverbindungen, Phosphole und Naphtazarin und -derivate (Irmeler *et al.*, 2002) u. a. (siehe auch Gromer *et al.*, 2004). Bei einigen dieser Verbindungen ist die

Hemmung aus einer kompetitiven und einer irreversiblen, kovalenten Komponente zusammengesetzt (Becker *et al.* 2001; Gromer *et al.*, 2004).

Die Unterschiede zwischen den humanen TrxR und den bakteriellen Enzymen, aber auch der PfTrxR machen das Enzym zu einem interessanten Zielmolekül für neue Antibiotika und Antimalaria-Medikamente, insbesondere da die Essentialität der TrxR für den Parasit kürzlich anhand von *knock out*-Studien gezeigt wurde (Krnajski *et al.*, 2002).

### 1.2.2.3 Peroxiredoxine (Prx)

Peroxidasen, in denen Häm als prosthetische Gruppe fungiert, sind schon seit langem als effektive Katalysatoren der Reduktion von Hydroperoxiden bekannt (Brill, 1966). Auch die Glutathionperoxidase wurde bereits 1957 identifiziert (Mills, 1957), ihre überraschende Selenabhängigkeit jedoch erst deutlich später (Rotruck, 1972). 1988 wurde dann in Hefe das erste *thiol-specific antioxidant* (TSA) entdeckt, das weder Selen noch eine prosthetische Gruppe enthält und sich letztlich als Thioredoxin-abhängige Peroxidase herausstellte (Kim 1988; Chae *et al.*, 1994).

TSA-ähnliche Proteine können mittlerweile als ubiquitär bezeichnet werden, da sie in den verschiedensten Organismen (Eu- und Archaeobakterien, Hefe, Protozoen, Säuger, Pflanzen) nachgewiesen wurden. Da ihre Funktionen vielfältig, sehr unterschiedlich und noch weitgehend unbekannt sind, werden sie unter dem Begriff Peroxiredoxine (Prx) zusammengefasst (Chae and Rhee, 1994). Die katalytische Gemeinsamkeit der Prx ist die Entgiftung von Peroxiden auf Kosten von Thiolen. Peroxiredoxine sind also nicht gleichzusetzen mit Peroxidasen, vielmehr stellen sie eine Untergruppe letzterer dar. Als Synonyme für Prx werden die Begriffe Thioredoxin-Peroxidasen (TPx) und Alkylhydroperoxid-Reduktase-C22-Proteine (AhpC-Proteine des AhpR-Systems) gebraucht (Wood *et al.*, 2003). Die Benennung Thioredoxin-Peroxidase ist jedoch nicht für alle Prx zutreffend; außerdem steht die Abkürzung TPx mitunter auch für Thiolabhängige Peroxidasen (Cha *et al.*, 1995).

Die ubiquitäre Verbreitung der Prx setzt sich auch auf subzellulärer Ebene fort: Wenngleich vorwiegende Lokalisation das Cytosol ist, so finden sich doch auch Peroxidasen mit mitochondrialer (Pedrajas *et al.*, 2000), plastidärer (Baier und Dietz, 1997) und peroxisomaler Bestimmung (Immenschuh *et al.*, 2003), des weiteren kommen sie membran- und kernassoziiert vor (Cha *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2003), in einem Fall (Prx IV) wird sogar von einem Export berichtet (Okado-Matsumoto *et al.*, 2000).

Nicht nur das Spektrum ihres Vorkommens ist breit, sie werden auch in großer Menge produziert: In Säugerzellen machen sie 0.1 – 0.8% des löslichen Proteins aus, in Erythrozyten sind Prx sogar die zweit- oder dritthäufigsten Proteine (Moore *et al.*, 1991).

Nichtsdestotrotz wird ihre enzymatische Aktivität als vergleichsweise gering (etwa  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ggü. hämhaltigen Peroxidasen mit  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (u. a. Brill, 1966) und Glutathionperoxidase mit  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Flohé *et al.*, 1972) angesehen, und ihr Beitrag zur antioxidativen Verteidigung wird generell nicht als ihre Hauptfunktion betrachtet (Hofmann *et al.*, 2002). Die Funktion der Säuger-Prx wird vielmehr in der Redoxregulation von Stoffwechselprozessen vermutet, dagegen ist für pathogene Mikroorganismen wie Trypanosomen oder Plasmodien, die keine

häm- oder selenhaltigen Peroxidasen besitzen, die antioxidative Bedeutung der Prx zum Schutz gegen den *oxidative burst* des Immunsystems sehr wahrscheinlich (Flohé *et al.*, 2003).

### 1.2.2.3.1 Einteilung

Ursprünglich erfolgte die Einteilung der Prx aufgrund der Anzahl an katalytisch bedeutsamen Cystein-Resten in 2-Cys- und 1-Cys-Proteine (Chae *et al.*, 1994). Diese Einteilung soll im Rahmen dieser Arbeit beibehalten und erweitert werden. Parallel dazu erscheint auch die Einteilung basierend auf Sequenzhomologie korrekt, wie im Folgenden noch erläutert wird.

Allen Prx gemeinsam ist die Fähigkeit zur Entgiftung von Hydroperoxiden zulasten von DTT als Reduktans. Bei allen gleich ist höchstwahrscheinlich auch der erste Reaktionsschritt: der Angriff des Peroxids auf das sog. *peroxidatic* Cystein ( $C_P$ ), das ebenfalls allen Prx innewohnt und meist in ein charakteristisches VCP-Motiv eingebettet ist, und dessen Oxidation zur Sulfensäure (Cys-SOH) (Wood *et al.*, 2003).

1-Cys-Prx haben außer dem  $C_P$  kein weiteres, konserviertes und katalytisch aktives Cystein. Dennoch können in der Sequenz eines 1-Cys-Prx mehrere Cysteine enthalten sein; so hat z. B. hORF6, einer der am besten charakterisierten Vertreter dieser Gruppe einen zweiten Cysteinrest an Position 91 (Choi *et al.*, 1998; Montemartini *et al.*, 1999); das 1-Cys-Prx aus *Plasmodium falciparum* besitzt sogar 7 zusätzliche Cys-Reste (Kawazu *et al.*, 2000). Zu den 1-Cys-Prx gehören auch die BCP (*Bacterioferritin co-migratory protein*) (Jeong *et al.*, 2000) und ihre Homologe (auch als PrxQ bezeichnet; Kong *et al.*, 2000).

In der Klasse der 2-Cys-Prx machen Unterschiede bezüglich der Regeneration des peroxidativen und der Lokalisation des zweiten, sog. *resolving* Cysteins ( $C_R$ ) eine weitere Teilung sinnvoll. Wood *et al.* unterscheiden hier zwischen typischen und atypischen Proteinen (2003).

Charakteristisch für die typischen Prx ist neben dem  $C_P$  (um Rest 50 herum) die Position des zweiten, konservierten Cysteins (um Rest 170), das ebenfalls als VCP-Motiv vorliegt. Zu den typischen 2-Cys-Prx gehören u. a. die bakteriellen AhpC-Proteine (z. B. aus *Salmonella typhimurium*; Ellis und Poole, 1997), das TSA aus *Saccharomyces cerevisiae* (Chae *et al.*, 1993), die tryparedoxin-abhängigen TXNPx der Kinetoplastiden (z. B. aus *Crithidia fasciculata*; Nogoceke *et al.*, 1997), die Prx einiger Pflanzen (z. B. BAS1 aus *Arabidopsis thaliana* (Baier und Dietz, 1997) und die Proteine der Säuger-Klassen I-IV (s. u.).

Der Begriff der atypischen 2-Cys-Prx wird (lediglich) von Wood *et al.* verwendet (2003). Das zweite in den Elektronentransfer direkt involvierte Cystein befindet sich hier um Position 152 herum (hPrxV-Nummerierung). Der Sequenz folgend ist dieses jedoch das dritte Cystein, da ein weiteres in Position 73 (hPrxV) lokalisiert ist. Atypische 2-Cys-Proteine im Sinne der hier angewendeten funktionellen Definition wurden bisher nur in Säugern identifiziert.

Die unterschiedliche Lokalisation des *resolving* Cysteins bei den typischen und atypischen 2-Cys-Prx ist mitverantwortlich für Differenzen bezüglich des Reaktionsmechanismus', des Oligomerisierungsverhaltens und des Elektronendonors (s. u.).

Für die Säuger-Prx ist aufgrund von Sequenzhomologien ferner die Einteilung in sechs Klassen gebräuchlich (I-VI) (Hofmann *et al.*, 2002). Zu den typischen 2-Cys-Prx gehören

dabei die Klassen I – IV; die atypischen 2-Cys-Proteine bilden Klasse V, die 1-Cys-Prx Klasse VI.

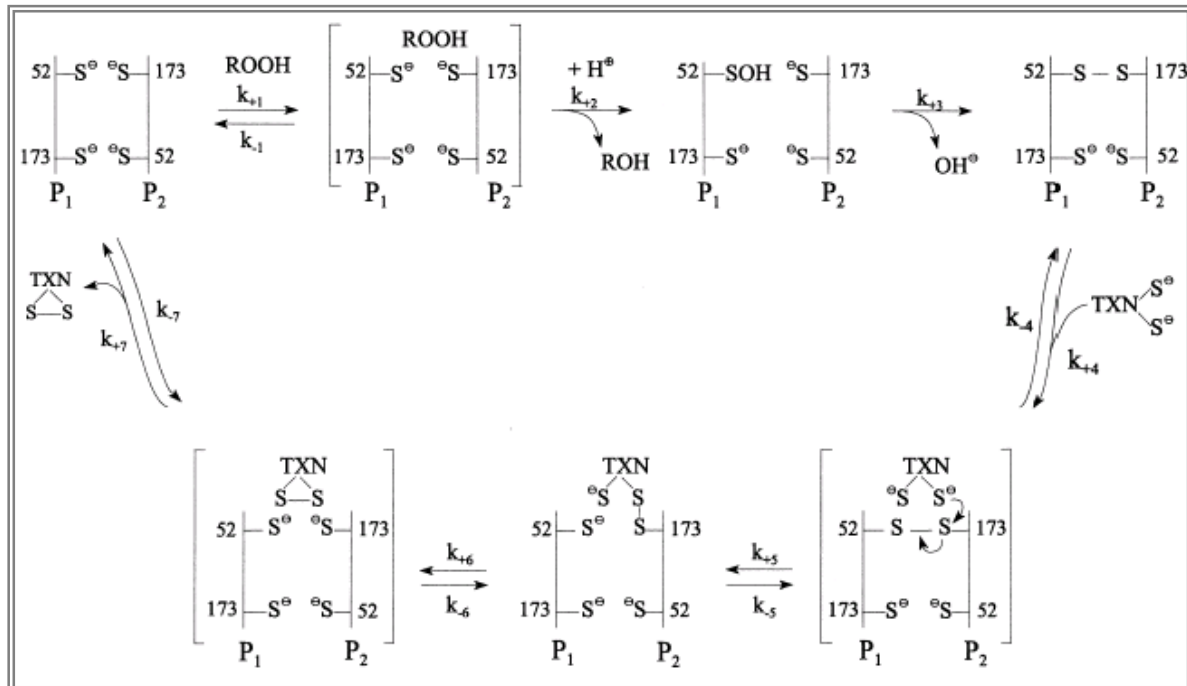
Hofmann und Kollegen erweitern, wiederum unter Anwendung der sequenziellen Ähnlichkeiten, die Säuger-Klassen um die Nicht-Säuger-Proteine, was zur Folge hat, dass die Klasse V 2-Cys- sowie 1-Cys-Vertreter enthält. Anders formuliert finden sich in Pflanzen, Bakterien und niederen Eukaryoten ebenfalls Proteine vom Prx V-Typ, diese besitzen jedoch nicht das (sequenziell dritte) C152 und stellen funktionell wahrscheinlich 1-Cys-Prx dar (Rouhier *et al.*, 2002; diese Arbeit).

Das Molekulargewicht der Prx liegt zwischen 17 und 30 kDa (Chae *et al.*, 1994; Krnajski *et al.*, 2001; Pedrajas *et al.*, 2000; Rouhier *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2000), wobei die PrxQ und die Proteine vom V-Typ mit etwa 160 AS tendenziell kleiner sind als die der anderen Klassen, deren AS-Sequenzen etwa 190 AS umfassen.

#### 1.2.2.3.2 Mechanismus und Kinetik

Peroxiredoxine besitzen keine prosthetische Gruppe; einzige redox-aktive Reste sind Cysteinreste, die lediglich in Ausnahmefällen (Andreesen *et al.*, 1999) durch Selenocystein ersetzt sind. Ihrer Sequenz nach bilden sie eine eigene Proteinfamilie, sind also nicht mit anderen Peroxidasefamilien verwandt. Auch innerhalb der Peroxiredoxinfamilie sind nur wenige Reste konserviert, so z. B. das bereits erwähnte VCP-Motiv in der N-terminalen Domäne. In allen bisher dazu durchgeführten Untersuchungen führte die Deletion dieses Cysteins zum völligen Aktivitätsverlust bzgl. Hydroperoxiden (Chae *et al.*, 1993; Ellis und Poole, 1997; Jeong *et al.*, 1999; Montemartini *et al.*, 1999). Daher (unterstützt auch durch die Struktureigenschaften um die Cysteinreste) ist davon auszugehen, dass der Angriff eines Hydroperoxids auf dieses Cystein erfolgt, was zur Bildung eines Sulfensäure-Intermediates (Cys-SOH) führt (Choi *et al.*, 1998). Der pK-Wert der SOH-Gruppe in ihrer Proteinumgebung ist nicht bekannt, aber aufgrund anderer Sulfensäureformen mit bekannten pK's kann die Dissoziation zum Sulfenat als gesichert gelten und damit auch dessen Reaktionsmöglichkeit mit jeder anderen SH-Gruppe (Hofmann *et al.*, 2002). Unter Wasserabspaltung wird daher nun mit einem verfügbaren Thiol eine Disulfidbrücke gebildet. Im Falle der typischen 2-Cys-Prx reagiert die proximal entstandene Sulfensäure zunächst mit dem distalen Cystein einer zweiten Untereinheit des Enzyms. Eine funktionelle Einheit besteht bei dieser Prx-Gruppe somit aus zwei Enzymmolekülen. Die antiparallele Disulfidbildung (d. h. N-terminales Cys der einen mit C-terminalem Cys der anderen UE) wurde nachgewiesen (Montemartini *et al.*, 1999). Übereinstimmend mit diesem Mechanismus wurde des öfteren beobachtet, dass Prx auf nicht-reduzierenden SDS-Gelen nach der Behandlung mit Hydroperoxiden als Dimere erscheinen (Chae *et al.*, 1994b; Ellis und Poole, 1997b)

Im weiteren Verlauf der Reaktion wird dann durch Thiole zunächst das proximale Cystein der ersten UE, dann das distale Cystein der zweiten UE regeneriert (Hofmann *et al.*, 2002).



**Abb. 1.8.** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der TXNPx aus *Crithidia fasciculata*. Aus Montemartini *et al.*, 1999.

1-Cys-Proteine besitzen keinen als *resolving cysteine* fungierenden Cysteinrest. Die Regeneration des peroxidativen Cysteins wird hier direkt durch ein externes Thiol erreicht. Die atypischen 2-Cys-Prx folgen einer dritten Variante des Reaktionsmechanismus': Auch hier wird das proximale Cystein zuerst oxidiert, reagiert aber dann mit dem distalen Cystein derselben Untereinheit zur Disulfidbrücke (Seo *et al.*, 2000; Declerq *et al.*, 2001) (s. u.). In allen drei Fällen folgt die Kinetik einem Ping-Pong-Mechanismus, der charakteristisch ist für Peroxidasen allgemein und bedeutet, dass die Substrate nacheinander mit dem Enzym reagieren und zu keinem Zeitpunkt der Reaktion ein Enzym-Substrat1-Substrat2-Komplex vorliegt.

Beschrieben werden kann die Kinetik der Prx durch die Dalziel-Gleichung

$$\frac{[E]_0}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{[A]} + \frac{\phi_2}{[B]} + \frac{\phi_{1,2}}{[A][B]} \quad (1).$$

Die  $\Phi$ -Werte geben die Reziprokwerte der einzelnen Dissoziationskonstanten an. Durch den Wegfall des Terms  $\Phi_{1,2}/[A][B]$  wird Gleichung (1) vereinfacht zu

$$\frac{[E]_0}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{[A]} + \frac{\phi_2}{[B]} \quad (2).$$

Eine weitere Vereinfachung ergibt sich daraus, dass  $\Phi_0$ , der den Reziprokwert von  $k_{cat}$  darstellt, 0 ist (d.h.  $k_{cat}$ , die prinzipiell einen der Substrat-unabhängigen Schritte beschreibt (Budde *et al.*, 2003), geht gegen unendlich / hat keinen definierten Wert). Aus Gleichung (2) wird nun ersichtlich, dass die Komplexbildungen mit Hydroperoxid (dargestellt durch den

Term  $\Phi_1/[A]$ ;  $\Phi_1 = \text{Reziprokwert von } k'_1$ ) bzw. mit reduzierendem Thiol ( $\Phi_2/[B]$ ;  $\Phi_2 = \text{Reziprokwert von } k'_2$ ) die geschwindigkeitsbestimmenden (langsamsten) Schritte der Reaktion sind. Dies erklärt, warum die Messung oder Extrapolierung einer Maximalgeschwindigkeit bei diesen Enzymen nicht möglich ist. In einer üblichen Michaelis-Menten-Kinetik dagegen ist  $k_{\text{cat}}$  geschwindigkeitsbestimmend und hat somit einen reellen Wert.

Allgemein wird sich ein Wechsel zur Sättigungskinetik immer dann ergeben, wenn (z. B. durch eine Mutation) der Zerfall eines Enzym-Substrat-Komplexes verlangsamt und damit geschwindigkeitsbestimmend wird. In diesem Fall nimmt der substratunabhängige Term  $\Phi_0$  einen konkreten Wert an. Für CfTXNPx wurde gezeigt, dass der Austausch des distalen Cysteins (173) gegen Serin einen solchen Wechsel zur M.-M.-Kinetik bewirkt, da die Mutation zwar nicht die Affinität von Tryparedoxin zur Peroxidase verändert, wohl aber die Reaktion des Komplexes, da die Interaktion von TXN mit dem proximalen Cys ineffizient ist (Montemartini *et al.*, 1999). Unter physiologischen Bedingungen kann eher die Entgiftung des Peroxids als geschwindigkeitsbestimmend gesehen werden, da die Geschwindigkeitskonstante der reduktiven Teilreaktion oft höher ist als die der oxidativen, und da in den meisten Situationen *in vivo* auch die Konzentration der reduzierenden Substrate höher sein wird als die der Hydroperoxide (Hofmann *et al.*, 2002).

Es muss jedoch erwähnt werden, dass für einige Prx durchaus eine Kinetik nach M.-M. gemessen wurde (Rouhier *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2000; Akerman and Müller, 2003). Darüber hinaus wurden für einige Prx Abweichungen von der nach Dalziel erwarteten Kinetik festgestellt, die möglicherweise durch negative Kooperativität zu erklären sind (Budde *et al.*, 2003). Voraussetzung für Kooperativität ist u. a. eine oligomere Struktur des Proteins.

### 1.2.2.3.3 Struktur und Oligomerisierung

Bisher wurden die Kristallstrukturen von 11 Prx gelöst; dazu gehören mehrere typische 2-Cys-Enzyme (Prx I, Hirotsu *et al.*, 1999; Prx II, Schröder *et al.*, 2000; TryP, Alphey *et al.*, 2000 und AhpC, Wood *et al.*, 2002), einige Proteine vom Prx V-Typ (hPrx V, Declercq *et al.*, 2001; *Populus trichocarpa* GrxPrx, Echalié *et al.*, 2002; *Haemophilus influenzae* Hybrid-GrxPx, Kim *et al.*, 2003) und das humane Prx VI (hORF6, Choi *et al.*, 1998). Die Struktur dieser Prx ist ähnlich: Sie enthält den charakteristischen *thioredoxin fold* mit wenigen dazwischen liegenden zusätzlichen Sekundärstrukturelementen. Der auffallendste Unterschied betrifft die Oligomerisierung (Wood *et al.*, 2003).

Die „katalytische Triade“, drei essentielle AS-Reste in der GPx (Maiorino *et al.*, 1995), besteht auch für die Prx-Familie (C52, T49, R128 für TXNPx aus *Leishmania donovani* (Flohé *et al.*, 2002b). Durch diese Triade wird mittels H-Brücken oder basischen Resten die Deprotonierung des Thiols und damit dessen Reaktivität mit einer Hydroperoxygruppe sichergestellt (Choi *et al.*, 1998; Montemartini *et al.*, 1999).

Ein weiterer, in allen Prx-Klassen konservierter Rest, ist das Prolin um Position 44 (PrxII-Nummerierung). Dessen Pyrrolidinring begrenzt die Zugänglichkeit für Solvens und auch für Peroxid und schützt so das Sulfensäure-Intermediat des peroxidativen Cysteins vor weiterer Oxidation (Wood *et al.*, 2003).

In beiden Arten der 2-Cys-Prx ist im reduzierten Zustand der Abstand zwischen den Disulfidbildenden Cysteinresten zu groß um eine Verbrückung zu ermöglichen. Es wird angenommen, dass die Oxidation des C<sub>P</sub> eine drastische Konformationsänderung zugunsten der Disulfidbildung induziert (Declercq *et al.*, 2001). Nachgewiesenermaßen kommt das C<sub>P</sub>, welches im reduzierten Zustand dem Solvens exponiert ist, durch die Oxidation in einer Mulde zu liegen, während das C<sub>R</sub> zugänglich wird. Das C<sub>R</sub> kann nun auch durch sperrige reduzierende Substrate angegriffen werden (Hofmann *et al.*, 2002). Dieser Reaktionsmechanismus bietet auch eine Erklärungsmöglichkeit dafür, dass 1-Cys-Prx in aller Regel nicht mit höhermolekularen Thiolen reagieren.

Die versteckte Position des oxidierten C<sub>P</sub> hat den Vorteil, dass eine Überoxidation (die einen Abbruch des katalytischen Zyklus' bedeuten würde) erschwert wird. Die Disulfidbildung zwischen N-terminalem Cystein der einen und C-terminalem Cystein der anderen UE bringt außerdem ein weniger reaktives Intermediat hervor. Dadurch wird die Möglichkeit zur Reduktion auf starke Elektronendonoren wie Tryparedoxin oder Thioredoxin beschränkt (Montemartini *et al.*, 1999).

Wenn auch bei den typischen 2-Cys-Prx das Dimer theoretisch eine funktionelle Einheit bildet, so scheinen doch bevorzugt höhere Aggregate, in erster Linie Dekamere, aufzutreten. Für verschiedene Prx konnte inzwischen eine Ringstruktur aus 5 invertierten Dimeren nachgewiesen werden (z.B. Alphey *et al.*, 2000). Dabei ist es möglich, dass alle 10 Reaktionszentren gleichzeitig aktiv sind (Hofmann *et al.*, 2002). Vergleiche verschiedener Kristallstrukturen ergaben, dass das Dekamer in erster Linie aus reduzierten Enzymuntereinheiten gebildet wird, wobei die Assoziationen auf hydrophobe Wechselwirkungen und H-Brücken zurückgehen (Hirotzu *et al.*, 1999; Alphey *et al.*, 2000). Die Oxidation und Ausbildung von Disulfidbrücken führt zur Schwächung der Interaktionen und schließlich dem Auseinanderbrechen des Dekamers in Dimere.

Primärer Faktor für die Stabilisierung dekamerer Formen ist also der reduzierte Zustand; interessanterweise resultiert jedoch auch die Überoxidation des peroxidativen Cysteins im Erythrozyten-PrxII zur Sulfinsäure in der Aufrechterhaltung des Dekameraggregates, da die Bildung von Disulfidbrücken nicht mehr stattfinden kann (Schröder *et al.*, 2000). Die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung liegt darin, dass das überoxidierte Dekamer mit der Erythrozytenmembran assoziiert und über eine dortige Akkumulation als Redoxsensor der roten Blutzelle oxidativen Stress anzeigen könnte. Die Oligomerisierung würde damit neben der Regulation der klassischen Enzymaktivität eine distinkte Funktion besitzen (Choi *et al.*, 2001).

Die Oxidation zur Sulfinsäureform kann darüber hinaus sogar zur weiteren Aggregation zu Dekamerstapeln führen (Kato *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 2002).

Neben der Redoxabhängigkeit der Oligomerisierung sind als weitere Parameter, die die Aggregation typischer 2-Cys-Prx fördern, hohe oder niedrige Ionenstärke, niedriger pH-Wert und hohe Mg- oder Ca-Konzentrationen zu nennen (Kitano *et al.*, 1999; Kristensen *et al.*, 1999; Chauhan und Mande, 2001; Kato *et al.*, 1985; Allen und Cadman, 1979).

Auch 1-Cys-Prx können dimere Strukturen bilden, wie anhand der Kristallstruktur für das humane Protein (hORF6) nachgewiesen wurde (Choi *et al.*, 1998). Zur Kristallisation musste das C91 deletiert werden, und das C47 liegt als Sulfensäure vor - somit entfällt die

Erklärungsmöglichkeit eines Disulfids. Da unter denaturierenden Bedingungen reduzierend wie nicht-reduzierend das Monomer vorliegt (Kang *et al.*, 1998a), kommen zur Erklärung des Dimers nur nicht-kovalente Wechselwirkungen in Frage.

Prx vom Typ V bilden keine Disulfid-verbrückten Dimere als Katalyse-Intermediate, dennoch wurden für einige Vertreter Dimere beobachtet (Seo *et al.*, 2000; Baker und Poole, 2003; Bréhélin *et al.*, 2003; diese Arbeit).

#### 1.2.2.3.4 Reduzierende Substrate

Die katalytische Gemeinsamkeit der Peroxiredoxine ist die Reduktion von Hydroperoxiden auf Kosten von Thiolen (Hofmann *et al.*, 2002). Verbreitetstes Reduktionsmittel für Prx *in vitro* ist wohl DTT. Die Peroxidaseaktivität mit diesem niedermolekularen Thiol im Glutaminsynthetase-Protektions-Assay dient meist als Grundlage für die weitere Charakterisierung (MtAhpC, Chauhan und Mande, 2001; Pf1-Cys-Prx, Kawazu *et al.*, 2000; *Arabidopsis thaliana* TypII-Prx, Bréhélin *et al.*, 2003; Flohé *et al.*, 2003). Es gibt jedoch Prx, für die außer DTT noch kein weiteres Reduktionsmittel gefunden wurde (AtPRXIII, Bréhélin *et al.*, 2003). Und selbst für Proteine, die ihre Peroxidase-Funktion mit verschiedenen Elektronendonoren ausführen, kann zumeist nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob einer oder mehrere davon auch physiologisch als solche relevant sind.

Charakteristisch für potentielle Reduktionsmittel ist die Thiolgruppe. In keinem der vorliegenden Fälle (u. a. humanes Prx V, Knoop *et al.*, 1999; *Brassica campestris*-TypII-Prx, Choi *et al.*, 1999) konnte die allgemeine antioxidative Aktivität auch mit Ascorbat beobachtet werden.

Aufgrund der schlechten Zugänglichkeit des peroxidativen Cysteins sind für 1-Cys-Prx meistens lediglich niedermolekulare Thiole wie DTT oder GSH geeignet (Fisher *et al.*, 1999; Kawazu *et al.*, 2000). Es gibt jedoch Ausnahmen, wo Aktivität auch mit proteingebundenen Thiolen festgestellt wurde, wie z. B. das 1-Cys Prx aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches Thioredoxin-abhängig funktioniert (Pedrajas *et al.*, 2000). Für das bovine 1-Cys-Prx ist die Regeneration durch Dihydroliponsäure und H<sub>2</sub>S möglich, wohingegen mit  $\beta$ -Mercaptoethanol keine Peroxidaseaktivität feststellbar war (Peshenko und Shichi, 2001). Bryk *et al.* beschreiben ein Liponsäure-abhängiges Peroxidase-System in *Mycobacterium tuberculosis* (2002), und auch das *organic hydroperoxide resistance*-Protein (Ohr) aus *Xylella fastidiosa* akzeptiert diesen Elektronendonator, weshalb die Bezeichnung Dihydroliponsäure-Peroxidase vorgeschlagen wird (Cussiol *et al.*, 2003).

Wie aus dem häufig benutzten Synonym Thioredoxinperoxidase ableitbar, sind zahlreiche Peroxiredoxine durch die Thiolgruppen von Thioredoxinen regenerierbar; so z. B. PfTPx1 (Rahlfs und Becker, 2001), *Helicobacter pylori* AhpC, TPx aus *E. coli*, *S. cerevisiae*-TSA und die humanen PrxI-III (Baker *et al.*, 2001; Cha *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1988; Flohé *et al.*, 2003) als typische 2-Cys-Prx und humanes Prx V (Seo *et al.*, 2000) als Vertreter der atypischen 2-Cys-Prx, aber auch *Populus trichocarpa*-Grx-Prx (Rouhier *et al.*, 2001), *E. coli*-Bcp und PrxQ aus *Sedum lineare* (Jeong *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000).

Die Kinetoplastiden, zu denen u. a. die Pathogene *Trypanosoma*, *Leishmania* und *Crithidia* gehören, besitzen eine spezielle Regenerationskette für Peroxiredoxine. Über die Trypanothionreduktase und Trypanothion (N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-Bis-(glutathionyl)-spermidin), welches hier



anstelle von GSH das dominierende niedermolekulare Thiol ist, werden Elektronen von NADPH auf Tryparedoxin übertragen, einem Trx-ähnlichen Protein mit der *active site* WCPPCR (Flohé *et al.*, 2002). Letzteres reduziert dann die entsprechende Tryparedoxinperoxidase.

Die meisten bakteriellen AhpC-Proteine werden durch AhpF regeneriert, und auch in diesen findet sich, wie in Trx und TXN, das CXXC-Motiv (Flohé *et al.*, 2003).

Die grundsätzlichen Eigenschaften, die ein Donor-Substrat ausmachen, sind noch nicht geklärt. Es ist wahrscheinlich, dass weitere, vom CXXC-Motiv entfernte AS-Reste für die Interaktion mit dem Prx eine Rolle spielen (Hofmann *et al.*, 2002).

In jüngerer Zeit wurden einige Prx identifiziert, die mit Glutaredoxin als Elektronendonoren arbeiten. Diese Peroxiredoxine gehören zur Gruppe der TypV-Prx und umfassen bislang pflanzliche Proteine (*Populus trichocarpa* GrxPrx, Rouhier *et al.*, 2001; *Arabidopsis thaliana* PRXII-B, Bréhélin *et al.*, 2003) und bakterielle chimäre Enzyme, die Fusionsproteine aus Grx- und Prx-Domäne darstellen (*Haemophilus influenzae*, Pauwels *et al.*, 2003; *Neisseria meningitidis*, Rouhier und Jacquot, 2003; *Chromatium gracile*, Vergauwen *et al.*, 2001).

Der wohl unerwartetste Elektronendonator ist Cyclophilin A. Dieses Cyclosporin-bindende Protein wurde bislang nur mit den humanen Prx II und VI erfolgreich getestet (Lee *et al.*, 2001); die Autoren sehen in ihm jedoch ein generelles Donor-Substrat für Prx.

#### 1.2.2.3.5 Oxidierende Substrate

Am häufigsten erfolgreich getestet werden wohl Wasserstoffperoxid und tert.-Butyl-Hydroperoxid. Daneben sind die Hydroperoxide von Cumen, Phosphatidylcholin und Linolensäure gebräuchlich. Als molekulare Grundlage der Substratspezifität wird für verschiedene Prx aus *Leishmania* eine 9 Aminosäuren umfassende C-terminale Extension postuliert (Barr und Gedamu 2001 und 2003).

Für das *Leishmania chagasi*-Pxn1 wird neben der Umsetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Alkylhydroperoxiden auch die Reduktion des Hydroxylradikals berichtet (Barr und Gedamu, 2001).

Das humane 1-Cys-Prx zeigt neben der Peroxidreduktion auch Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität, (Kang *et al.*, 1998a).

Für zahlreiche Peroxiredoxine konnte darüber hinaus die Entgiftung reaktiver Stickstoff-Spezies, v. a. von Peroxynitrit, gezeigt werden. (Bryk *et al.*, 2000; Barr und Gedamu, 2003; Wong *et al.*, 2002; Peshenko und Shichi, 2001; Flohé *et al.*, 2003). Dabei sind die Reaktionskonstanten für Peroxynitrit in derselben Größenordnung wie für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.51 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> für *Salmonella typhimurium*-AhpC, Bryk *et al.*, 2000). Kürzlich konnte Peroxynitrit-Reduktase-Aktivität auch für PfTPx1 nachgewiesen werden (Manuskript in Bearbeitung).

Für das LcPxn1 wurde außerdem die direkte Entgiftung von NO beobachtet (Barr und Gedamu, 2003).

### 1.2.2.3.6 Regulation und physiologische Funktion

Die Entdeckung der Prx geschah häufig in Zusammenhang mit den verschiedensten Zellfunktionen, darunter Proliferation, Differenzierung, natürliche Killerzellaktivität, Osteoregulation und Antwort auf oxidativen Stress (Kang *et al.*, 1998b). Dies allein ist schon Hinweis darauf, dass die Peroxidase-Aktivität der Prx entweder nicht ihre einzige Enzymaktivität ist, oder aber, dass sich die Peroxidase-Funktion der Prx auf alle diese Vorgänge auswirkt.  $H_2O_2$  kann mittlerweile nicht mehr nur als toxisches Atmungsnebenprodukt angesehen werden; es ist vielmehr auch Bestandteil der Rezeptor-vermittelten Signalübertragung (Kang *et al.*, 1998b). Da es schnell produziert wird, sehr reaktiv ist und durch antioxidative Enzyme gut kontrolliert werden kann, stellt es ein effektives Signalmolekül dar (Wood *et al.*, 2003). In Säugerzellen verursacht eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli, wie z. B. PDGF, EGF und TNF- $\alpha$ , einen vorübergehenden Anstieg der  $H_2O_2$ -Konzentration. Die transiente Natur dieses Anstiegs führte zu der Annahme, dass neben der Produktion auch die schnelle Entfernung für den Signalvorgang wichtig ist. Tatsächlich wurde für Säuger-Prx I und II gezeigt, dass sie das als Folge der Stimulation durch PDGF, EGF oder TNF- $\alpha$  gebildete  $H_2O_2$  abbauen und damit den weiteren Ablauf der Signalkaskade, im Falle von TNF- $\alpha$  z. B. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, unterbinden können (Kang *et al.*, 1998b). Neben NF- $\kappa$ B werden mit c-Abl, Caspasen und AP-1 durch Prx weitere Komponenten von Signalkaskaden beeinflusst, die in Zusammenhang mit Zellwachstum und Apoptose stehen (Butterfield *et al.*, 1999). Antiapoptotische Aktivitäten sind für Prx I (= Pag; Ichimiya *et al.*, 1997; Wen und Van Etten, 1997), Prx II (= NK-enhancing factor; Zhang *et al.*, 1997), Hefe-TSA (Kowaltowski *et al.*, 1998) und Prx V (Zhou *et al.*, 2000) beschrieben. PrxV und Hefe-TSA (ebenso wie Katalase) verhindern dabei die ROS-vermittelte unspezifische Permeabilisierung der mitochondrialen Membran (*membrane permeability transition*; MPT), die eines der zentralen Ereignisse in p53-induzierter Apoptose darstellt (Li *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Kowaltowski *et al.*, 1998).

Der Effekt von PrxI über die Interaktion mit dem Onkoprotein c-Abl war interessanterweise auch mit N-terminal verkürztem Prx beobachtbar, dem das peroxidative Cystein fehlte, die Interaktion mit c-Abl steht also nicht in Zusammenhang mit der antioxidativen Aktivität von PrxI (Wen und Van Etten, 1997). Prx sind möglicherweise auch an der Regulation der TSH-induzierten  $H_2O_2$ -Produktion beteiligt (Kim *et al.*, 2000). Über die Peroxynitrit-Reduktase-Aktivität könnten Prx zur Widerstandsfähigkeit gegenüber nitrosativem Stress beitragen und wiederum die Signaltransduktion beeinflussen, da auch Peroxynitrit und seine Vorläufer als Signalmoleküle fungieren.

Bei der Unterscheidung von Peroxid-vermittelter Signaltransduktion und oxidativem Stress könnte die Sensitivität der Prx für Überoxidation eine Rolle spielen (Claiborne *et al.*, 1999). Dabei scheint die Empfindlichkeit für diese Inaktivierung in den Organismen selektiert worden zu sein, in denen  $H_2O_2$  als Signalmolekül dient; die bakteriellen Prx erweisen sich nämlich hier als robuster. Während die Oxidationsempfindlichkeit der meisten eukaryotischen Prx auf bestimmte Struktur motive (GGLG-Motiv; C-terminale Extension) zurückzuführen ist, sind einige Proteine parasitischer Protozoen wie Kinetoplastiden, Giardien und auch Plasmodien ihrer Sequenz nach nicht eindeutig zuzuordnen, und es ist kein Zusammenhang zur Oxidationsempfindlichkeit bekannt (Wood *et al.*, 2003).

Mit der Annahme dieses Regulationsweges geht folgende Vorstellung für die Funktionsweise der Peroxiredoxine einher: In der ruhenden Zelle halten sie durch ihre starke Präsenz und hohe Affinität für Peroxide ( $K_M$  für  $H_2O_2 < 10 \mu M$  vgl. mit 25 mM der Katalase; Lee *et al.*, 2001) die Konzentration letzterer sehr gering; es findet keine Signalvermittlung statt. Ein vorübergehender „Peroxid-burst“ verursacht dagegen Peroxidkonzentrationen, die die Prx schnell inaktivieren (Wood *et al.*, 2003); es kommt zur Signalweiterleitung über die Peroxide. Das Verhältnis von aktivem zu inaktivem Prx könnte dann entscheidend dafür sein, ob eine Zelle Cytokin-induzierter Apoptose unterliegt (Rabilloud *et al.*, 2002).

In dieser Phase sorgen Enzyme wie GPx und Katalase mit ihrer niedrigeren Affinität aber höheren Umsatzrate dafür, den Peroxidüberschuss wieder zu entfernen. Nach Wood *et al.* (2003) stellt die Sensitivität der Prx gegen Überoxidation eine irreversible Ermöglichung der Signalübermittlung durch  $H_2O_2$  dar. Untersuchungen an Prx1 in Mausmakrophagen deuten jedoch darauf hin, dass für die Sulfinsäureform des Cysteins, ähnlich wie für Methioninsulfoxid, ein reduzierendes Enzym existiert und dass nur ein kleiner Teil des Peroxiredoxins durch höhere  $H_2O_2$ -Konzentrationen irreversibel verändert wird (Woo *et al.*, 2003).

Neben Überoxidation kommen für die Regulation der Prx C-terminale Proteolyse und Phosphorylierung in Betracht. Für die C-terminale Verkürzung ist der Lysinrest 191 von Bedeutung, der in fast allen untersuchten Säuger-Prx konserviert ist (Koo *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung am T90 wurde für Säuger-Prx I, II, III und IV als aktivitätssenkend nachgewiesen (Chang *et al.*, 2002). Die Aktivierung von Prx wird durch Cyclophilin A beobachtet (Lee *et al.*, 2001).

Wie durch die Vielfalt der möglichen Prx-Funktionen angedeutet, unterstreichen Untersuchungen der fünf bekannten Prx in *Saccharomyces cerevisiae* die Komplementierung der verschiedenen Prx-Formen eines Organismus, sowohl bezüglich biochemischer Interaktionen als auch der subzellulären Lokalisation (Park *et al.*, 2000).

#### 1.2.2.3.7 Situation in *Plasmodium falciparum*

Für *Plasmodium falciparum* waren bislang vier verschiedene Peroxiredoxine beschrieben (Rahlfs *et al.*, 2002). Zwei davon gehören zu den typischen 2-Cys-Prx; für TPx2 konnte jedoch bisher nur leichte antioxidative Aktivität festgestellt werden (GS-protection assay) und ein möglicher physiologischer Elektronendonator wurde noch nicht identifiziert. TPx1 ist mit PfTrx1 aktiv und setzt verschiedene Peroxide um (Rahlfs und Becker, 2001). Das dritte plasmodiale Prx gehört zur Gruppe der 1-Cys-Prx, wenngleich in seiner Sequenz noch weitere nicht-konservierte Cysteinreste vorhanden sind. Kawazu *et al.* fanden Peroxidase-Aktivität mit  $H_2O_2$  und DTT bzw. GSH als Elektronendonoren (2000). Ein zu 92% identisches Protein wurde aus einem anderen Pf-Stamm kloniert und als Trx-abhängig charakterisiert (Krnajski *et al.*, 2001).

Das vierte Pf-Prx ähnelt in seiner Sequenz eher einer Glutathionperoxidase und wurde daher zunächst so bezeichnet (Gamain *et al.*, 1996). Aufgrund der wesentlich höheren Aktivität mit Trx führten Sztajer *et al.* die Benennung TPx<sub>GI</sub> ein (2001).

Da Pf wahrscheinlich weder Katalase noch Glutathionperoxidase besitzt, ist die Peroxidase-Aktivität der Peroxiredoxine für diesen Organismus womöglich von größerer Bedeutung als

aufgrund der geringen Effizienz für andere Organismen vermutet (Hofmann *et al.*, 2002). Darüber hinaus liegt die Effizienz der PfTPx1 mit  $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  höher als durchschnittlich für Prx angenommen ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

*Knock-out*-Studien zeigen, dass TPx1 für das Überleben der Parasiten zwar nicht notwendig ist, was möglicherweise durch die Komplementation der anderen Prx erklärt werden kann, aber doch eine wichtige Rolle für die Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem und nitrosativem Stress spielt und *in vivo* an der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entgiftung beteiligt ist (Komaki-Yasuda *et al.*, 2003). Neben der hier beobachteten Hypersensitivität der *knock-outs*, die sich verzögert am dritten Tag nach Zugabe des Stressors zeigte, ist umgekehrt auch eine *Upregulation* der TPx1-Expression als Antwort auf Peroxidstress beschrieben (Akerman und Müller, 2003).

### 1.3 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit sollte, unter Anwendung molekularbiologischer und biochemischer Methoden, die Bekämpfung der Malaria unterstützt werden. Aufgrund der Bedeutung für den Erreger sollten antioxidative Strategien von *Plasmodium falciparum* näher erforscht werden. Auf der Grundlage des bislang bekannten Thioredoxin-Systems (Kanzok *et al.*, 2001; Rahlfs *et al.*, 2002) galt es, weitere Thioredoxin- und Thioredoxinreduktase-Formen zu identifizieren, zu klonieren, und, soweit möglich, zu charakterisieren. Ferner sollte die Peroxidentgiftung des Organismus eingehender untersucht werden. Dazu sollte die Reaktionsfähigkeit bekannter Redoxproteine mit Hydroperoxiden getestet, Mechanismus und Eigenschaften der PfTPx1 (Rahlfs und Becker, 2001) näher untersucht und insbesondere ein TypV-Peroxiredoxin (AOP) aus Pf identifiziert und charakterisiert werden.

Die Interaktionen der verschiedenen antioxidativen Systeme (Trx-, Grx-), Proteine (Plrx, TPx1, AOP) und Verbindungen (Liponsäure, Ascorbat), deren Komplexität sich bereits abzeichnete (Kanzok *et al.*, 2001; Becker, 2003; Gromer *et al.*, 2004), sollte näher beleuchtet werden.

Im Hinblick auf Zielmoleküle für die rationale Medikamentenentwicklung sollte ein Beitrag zur Strukturaufklärung genannter Proteine geleistet werden. Dazu sollten Trx1 und TrxR ohne Hexahistidintag und z. T. in verkürzter Form kloniert, die Reinigung etabliert und, sofern möglich, kristallisiert werden. Ferner sollte die Kristallisierung des neu identifizierten Prx (AOP) vorgenommen werden.

Mutmaßliche Inhibitoren der TrxR sollten vergleichend an PfTrxR und humaner TrxR getestet und die antiplasmodiale Wirkung an Parasitenkulturen bestätigt werden.

Um schließlich zum Verständnis der FPIX (FerriprotoporphyrinIX)-Toxizität und der Wirkung gängiger Malariawirkstoffe, wie Chloroquin, beitragen zu können, sollte der Effekt von FPIX auf einige Redoxproteine des Parasiten (GR, TrxR, Grx) untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad p. a. oder höher auf. Alle nicht einzeln aufgeführten Stoffe kamen von Roth (Medien etc.) oder Sigma.

Agar	Invitrogen, Carlsbad, USA
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Cystatin	Sigma, St. Louis
Dehydroascorbinsäure	Sigma, St. Louis
1,4-Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
dNTP	MBI Fermentas
DTNB	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FPIX	Sigma, St. Louis / Frontier Scientific Inc., Logan, USA
Glutathion, reduziert	Sigma, St. Louis
Glutathiondisulfid	Sigma, St. Louis
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, England
Hypoxanthin	GIBCO - Life Technologies, Groningen, Holland
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Liponamid	Sigma, St. Louis
Liponsäure	Sigma, St. Louis
NADH, NADPH, NADP <sup>+</sup>	BioMol, Hamburg
Pepstatin	Sigma, St. Louis
Pepton	GIBCO - Life Technologies, Groningen, Holland
PMSF	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese™ 30%ige Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
QualexGold™-Agarose	Thermo (Hybaid), Woburn (USA)
tBOOH	Fluka, Wiesbaden
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Boehringer Bioproducts, Ingelheim
Trypton	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck

### 2.1.2 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blot-Anlage LKB Multiphor II	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Bosch Feinwaage PE626	Gebr. Bosch, Junginger
FPLC-Anlage mit Aekta Unicorn Software	Aekta über Amersham, Freiburg
Gelkammern (Agarose)	Peqlab, Erlangen
Inkubator (Cytoperm)	Heraeus Instruments, Hanau
Magnetrührer IKA	Roth, Karlsruhe
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Microliter™ Syringe	Hamilton, Bonaduz (CH)
Mikroskope	Carl Zeiss (Axiostar)/Nikon (C-DSS230)
Miniprotean II Dual Slab Cell	BioRad, München
Minischüttler (Vortex)	Roth, Karlsruhe
pH-Meter (Φ350 pH/Temp/mV-Meter)	Beckman Instruments, Fullerton, USA
PCR-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage	Scaltec Instruments, Göttingen
Quarzküvetten (1 ml)	Hellma, Mühlheim
Schüttler (Orbital Shaker)	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Spannungsgeber	BioRad, München
Spektrophotometer U-2001	Hitachi, Japan
Spektrophotometer DU® 650	Beckmann, München
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mini-Spin	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Bandelin Electronics, Berlin
Ultrazentrifuge Optima™ TLX	Beckman Instruments, Fullerton, USA
Vakuumzentrifuge SpeedVac	Savant über Thermo Life Sciences
Variopipetten (Research, Reference)	Eppendorf, Hamburg
Variopipetten	Gilson, Middleton (USA)
Wärmeschrank	Mytron über Thermo, Egelsbach
Wasserbad	JuLabo über MAGV
Wippe Duomax 1030	Heidolph Instruments, Kelheim
Zentrifuge Sorvall RC5B	Sorvall, Asheville (USA) über Kendro
Zentrifugenbecher (500 ml)	Nalgene, Rochester (USA)

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Centricon (3k, 10k, 30k)	Amicon Inc., Beverly (USA)
Centriprep (3k, 10k, 30k)	Amicon Inc., Beverly (USA)
Deckgläschen, rund	Menzel, LHD, Heidelberg
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Kremsmünster (A)

Linbro Zellkulturplatten	Flow Laboratories, McLean (USA)
Microcon (3k, 10k, 30k)	Amicon Inc., Beverly (USA)
Mikroglaskapillaren	Brand, Wertheim
Nitrozellulosemembran HyBond N	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Petrischalen (7.5, 15 cm Durchmesser)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen für Gilson	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
24well-Platten	Greiner, Kremsmünster (A)
UVetten <sup>TM</sup>	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.4 Material zur Säulenchromatographie

2',5'-ADP Sepharose 4B	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Amylose	New England Biolabs, Beverly, USA

### 2.1.5 Größenstandards

#### 2.1.5.1 DNA-Marker

GeneRuler <sup>TM</sup> 100 bp bzw. 1 kb	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
--	-----------------------------

#### 2.1.5.2 Protein-Marker

Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
LMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
6xHis Protein Ladder	Qiagen, Hilden

### 2.1.6 Molekularbiologische Reagenziensätze

QIAGEN Gelextraktions-Kit (QIAquick)	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid-Isolierungs-Kit (QIAprep)	Qiagen, Hilden
QIAGEN PCR-Aufreinigungs-Kit (QIAquick)	Qiagen, Hilden
Ready-to-go <sup>TM</sup> -T <sub>4</sub> -DNA-Ligationskit	Amersham, Freiburg
Quick Ligation <sup>TM</sup> Kit	New England Biolabs, Beverly, USA
6x loading dye (Agarosegele)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.7 Proteinbiochemische Reagenziensätze

ECL-Kit	Perkin-Elmer, Wellesley, USA
Silberfärbungs-Kit	Merck, Darmstadt

## 2.1.8 Material zur Kristallisation

CrystalScreen™

Hampton Research, Aliso Viejo (USA)

AdditIIIe Screen 2

Hampton Research, Aliso Viejo (USA)

Silikonöl

Boehringer Bioproducts, Ingelheim

## 2.1.9 Plasmide

pBUF1b <sup>1</sup>	Carbenicillin (Amp); Tac-Promotor; <i>lacZ</i> -Gen; <i>malE</i> -Gen; <i>lac</i> -Repressor-Gen
pET16b <sup>2</sup>	Carbenicillin (Amp); T7 <i>lac</i> -Promotor; <i>lac</i> -Repressor-Gen; N-terminaler His-tag
pQE30 <sup>3</sup>	Carbenicillin (Amp); T5-Promotor / <i>lac</i> -Operator; N-terminaler His-tag
pREP4 <sup>3</sup>	Kanamycin; <i>lac</i> -Repressor-Gen
pRSETA <sup>4</sup>	Carbenicillin (Amp); T7-Promotor; <i>lac</i> -Repressor-Gen; <i>lacZ</i> -Gen; N-terminaler His-tag
pBluescript II SK(+) <sup>5</sup>	Carbenicillin (Amp); <i>lac</i> -, T7-, (T3-)Promotor; <i>lacZ</i> -Gen
RIG-Plasmid <sup>6</sup>	Chloramphenicol; tRNAs für R, I und G (AGA, AGG,ATA,GGA)

**Tabelle 2.1. Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Vektoren.**

<sup>1</sup> freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. F. Bernhard; <sup>2</sup> Vektor mit zu exprimierender Insert-Sequenz dankenswerterweise erhalten von Prof. Dr. R.-H. Schirmer; <sup>3</sup> Qiagen GmbH, Hilden; <sup>4</sup> Invitrogen, Carlsbad, USA; <sup>5</sup> Stratagene LaJolla, USA; <sup>6</sup>freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Wim Hol (Baca und Hol 2000).

## 2.1.10 Enzyme

PfGR (heterolog exprimiert und gereinigt nach Färber *et al.* (1998)) wurde freundlicherweise von Prof. R.-H. Schirmer, Biochemiezentrum Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Im eigenen Labor routinemäßig heterolog exprimiert und gereinigt:

PfGrx1	heterologe Expression und Reinigung gemäß Rahlfs <i>et al.</i> , 2001
PfPlrx	heterologe Expression und Reinigung gemäß Becker <i>et al.</i> , 2003
PfTrx	heterologe Expression und Reinigung gemäß Kanzok <i>et al.</i> , 2000
PfTrxR	heterologe Expression und Reinigung gemäß Kanzok <i>et al.</i> , 2000

Kommerziell erworben:

*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

DNase 1

Roche, Grenzach-Wyhlen

*DpnI*

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

LipDH

Sigma, St. Louis



Lysozym	Roth, Karlsruhe
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA
<i>Shrimps Alkaline Phosphatase</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot / Promega Corporation, Madison, USA
TEV-Protease, rekombinant	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg / MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Für sämtliche kommerziell erworbene Enzyme wurde, sofern nicht anders beschrieben, der vom Hersteller mitgelieferte, empfohlene Puffer verwendet; gleiches gilt für verwendete Additiva.

### 2.1.11 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> - Stamm	Genotyp	Referenz, Hersteller
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsd-R17, supE44, relA1, lac, [F', pro AB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10, (Tc<sup>r</sup>)</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987) Stratagene, LaJolla, USA
M15 [pREP4]	<i>nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, rif<sup>S</sup>, Km<sup>R</sup>, lac<sup>-</sup>, ara<sup>-</sup>, gal<sup>-</sup>, mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup></i>	(Villarejo und Zabin, 1974) Qiagen, Hilden
BL21	<i>F' ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>	(Wood, 1966) Stratagene, LaJolla, USA
NovaBlue	<i>endA1, hsdR17 (r<sub>K12</sub><sup>-</sup>m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1, gyrA96, relA1 lac[F' proA+B+ lacI<sup>q</sup>ZΔM15 ::Tn10(Tc<sup>r</sup>)</i>	Novagene, Merck KGaA, Darmstadt
SG13009 [pREP4]	<i>nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, rif<sup>S</sup>, thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup>, ara<sup>+</sup>, gal<sup>+</sup>, mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup>, lon<sup>+</sup></i>	(Gottesman <i>et al.</i> , 1981), Qiagen, Hilden
C41 (BL21-Abkömmling)	<i>dcm, ompT, hsdS, (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal λ</i> und mindestens eine weitere, nicht charakterisierte Mutation	(Miroux und Walker, 1996) Avidis, Saint Beaulire, Frankreich
C43 (C41-Abkömmling)	<i>dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal λ</i> und mindestens zwei weitere, nicht charakterisierte Mutationen	(Miroux und Walker, 1996) Avidis, Saint Beaulire, Frankreich

**Tabelle 2.2. Genotypen der verwendeten Bakterienstämme mit Referenzen.**

## 2.1.12 Lösungen

### 2.1.12.1 Stammlösungen

APS:	10% (w/v) in Wasser gelöst, Lagerung bei -20°C
Ascorbinsäure:	50 mM in TrxR-Puffer, täglich frisch, kurzzeitig bei 4°C gelagert
Carbenicillin:	50 µg/ml in 50% Ethanol, bei -20°C gelagert
Chloramphenicol:	25 µg/ml in 100% Ethanol, bei -20°C gelagert
CuOOH:	1 M und 4 mM in DMSO, täglich frisch
Cystatin:	40 µM in US-Puffer, bei -20°C gelagert
DHA:	25 mM in TrxR-Puffer, täglich frisch, kurzzeitig bei 4°C gelagert
DTNB:	100 mM in DMSO, bei -20°C gelagert
DTT:	200 mM in H <sub>2</sub> O, bei -20°C gelagert
Glucose:	40% in <i>aq.dest.</i> , sterilfiltriert, bei 4°C gelagert
GSH:	100 mM in H <sub>2</sub> O, bei -20°C gelagert
GSSG:	20 mM in GR -Puffer, bei -20°C gelagert
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	1 M und 4 mM im jeweiligen Puffer, täglich frisch, kurzzeitig bei 4°C gelagert
HEDS:	7.35 mM, in GR-Puffer, frisch angesetzt
IPTG:	1 M in <i>aq.dest.</i> , sterilfiltriert, bei -20°C gelagert
Kanamycin:	25 µg/ml in <i>aq.dest.</i> , sterilfiltriert, bei -20°C gelagert
Liponsäure/-amid:	5 mM in DMSO, täglich frisch
NADH, NADPH:	4 mM im jeweiligen Puffer, kurzzeitig bei 4°C gelagert
PCOOH:	Stammlösung 1 M in Ethanol; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Brigelius-Flohé, Potsdam; bei -80°C gelagert; hiervon abgeleitet 5 mM in Ethanol, täglich frisch, kurzzeitig bei 4°C gelagert
Pepstatin:	1.5 mM in US-Puffer, bei -20°C gelagert
PMSF:	100 mM in DMSO, bei Raumtemperatur gelagert
tBOOH:	1 M und 4 mM im jeweiligen Puffer, täglich frisch, kurzzeitig bei 4°C gelagert
X-Gal:	20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid, bei -20°C gelagert

### 2.1.12.2 Medien

#### Luria-Bertani-Medium (1 l)

10 g	Natriumchlorid
10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt

### 2.1.12.3 Puffer

#### 2.1.12.3.1 Puffer zur Plasmidisolierung

##### P1-Puffer

6,06 mg/ml Tris-Base

3.72 mg/ml EDTA x 2 H<sub>2</sub>O

0.1 mg/ml RNase A

P2-Puffer

4 M NaOH

1%<sub>(w/v)</sub> SDS

P3-Puffer

7 M Kaliumacetat; mit Eisessig auf pH 5.5 eingestellt

### 2.1.12.3.2 Präparations- und Säulenpuffer

Amylose-Säulenpuffer

20 mM Tris-HCl

200 mM NaCl

1 mM EDTA

mit HCl / NaOH *ad* pH 7.4

TE-Puffer

50 mM Tris

1 mM EDTA

mit HCl<sub>aq</sub> bei Raumtemperatur auf pH 7.6 titriert

Ohne weitere pH-Justierung hiervon abgeleitet wurden:

100 bzw.

200 mM KCl-TE

1 M NaCl-TE

x mM NADP<sup>+</sup>-TE (x = 0.25 / 1 / 2)

Regenerierungspuffer für 2'5'-ADP-Sepharose

100 mM NaAcetat

500 mM NaCl

bei Raumtemperatur auf pH 4.5 titriert

100 mM Tris

500 mM NaCl

bei Raumtemperatur *ad* pH 8.5 eingestellt

Ultraschallpuffer

50 mM Natriumphosphat

300 mM Natriumchlorid,

mit HCl<sub>aq</sub> bei Raumtemperatur auf pH 8.0 eingestellt

### 2.1.12.3.3 Assay-Puffer

TrxR-Assaypuffer

100 mM Natriumphosphat

2 mM EDTA  
mit  $\text{KOH}_{\text{aq}}$  bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt

#### GR-Assaypuffer

47 mM Kaliumphosphat  
2 mM EDTA  
200 mM KCl  
mit  $\text{KOH}_{\text{aq}}$  bei Raumtemperatur auf pH 6.9 eingestellt

#### HEDS-Puffer (Grx-Assay-Puffer)

100 mM Tris  
1 mM EDTA  
bei Raumtemperatur auf pH 8.0 eingestellt

#### TPx-Assaypuffer

50 mM HEPES  
bei Raumtemperatur auf pH 7.2 eingestellt

#### Trx2-Puffer

100 mM Kaliumphosphat  
200 mM KCl  
1 mM EDTA  
mit  $\text{KOH}_{\text{aq}}$  bei Raumtemperatur auf pH 8.0 eingestellt

#### Insulin-Assay-Puffer

50 mM Tris-HCl  
2 mM EDTA  
bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt  
0.17 mM Insulin

### 2.1.12.4 Elektrophorese- und Blottingpuffer

#### TE-Puffer

10 mM TRIS-HCl  
1 mM EDTA  
mit  $\text{HCl}_{\text{aq}}$  bei Raumtemperatur auf pH 8.0 eingestellt

#### TBE-Puffer

100 mM Tris-HCl  
83 mM Borsäure  
10 mM EDTA  
bei Raumtemperatur auf pH 8.2 eingestellt

## SDS-Probenpuffer 1x (nach BioRad)

12.5 ml	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (= Sammelgelpuffer)	
25 ml	Glycerin	
20 ml	10% <sub>(w/v)</sub> SDS	<i>ad</i> ~ 2.1%
2 ml	0.5% <sub>(w/v)</sub> Bromphenolblau	<i>ad</i> 0.01%
35 ml	H <sub>2</sub> O	

Lagerung bei RT; vor Gebrauch + 5%<sub>(v/v)</sub> β-ME

## SDS-Probenpuffer 4x (Lämmli)

3 ml	0.5 M Tris-Cl pH 6.8	<i>ad</i> 300 mM
300 mg	DTT	<i>ad</i> 6% <sub>(w/v)</sub>
400 mg	SDS	<i>ad</i> 400 mM
2 ml	Glycerin	<i>ad</i> 40% <sub>(v/v)</sub>
etwas	Bromphenolblau	<u>(1 Spatelspitze)</u>
~ 5 ml		

## SDS-Kammerpuffer / Blottingpuffer

192 mM	Glycin
25 mM	TRIS
0.1% <sub>(w/v)</sub>	SDS (nur für SDS-Kammerpuffer)

mit HCl<sub>aq</sub> bei Raumtemperatur auf pH 8.3 eingestellt

## Coomassie-Färbelösung

0.25% <sub>(w/v)</sub>	Coomassie-Brilliantblau R250
9.2% <sub>(v/v)</sub>	Essigsäure
5.0% <sub>(v/v)</sub>	Methanol

## Coomassie-Entfärber

40% <sub>(v/v)</sub>	Essigsäure
10% <sub>(v/v)</sub>	Methanol

## Anodenpuffer I

300 mM	TRIS
--------	------

## Anodenpuffer II

25 mM	TRIS
-------	------

## Kathodenpuffer

40 mM	6-Aminohexansäure
-------	-------------------

## Stripping-Puffer

2%	SDS
62.5 mM	Tris (pH 6.7)

7 mM      Mercaptoethanol

#### TBS

10 mM      TRIS  
155 mM     NaCl  
mit HCl<sub>aq</sub> bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt

#### TBS-Tween

10 mM      TRIS  
155 mM     NaCl  
0.05%<sub>(v/v)</sub>   Tween 20  
mit HCl<sub>aq</sub> bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt

### 2.1.12.5 Kristallisationspuffer

Zur Kristallisation wurden zunächst die Crystal Screen-Sätze I und II (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) getestet. Diese 98 Puffer wurden zudem mit den 24 Lösungen des Additiva-Kit 2 kombiniert. Zusätzlich ergaben sich weitere Möglichkeiten durch die Verwendung der Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Crystal Screen- und Additiva Screen-Lösungen, mit denen besonders gute Kristalle des PfAOP erzielt werden konnten, wurden nach Angabe von Hampton Research selbst hergestellt.

CS I # 40:                    0.1 M      Tri-Natriumcitratdihydrat (pH der 10x-Stammlösung = 5.6)  
20%<sub>(v/v)</sub> Isopropanol  
20%<sub>(w/v)</sub> PEG 4000

CS II # 26:                    0.1 M      MES (pH der 10x-Stammlösung = 5.6)  
0.2 M      Ammoniumsulfat  
30%<sub>(w/v)</sub> PEG-Monomethylether 550

Screen 2 # 23:                0.1 M      Phenol  
Screen 2 # 18:                0.1 M      Taurin  
Screen 2 # 16:                0.3 M      Glycyl-glycyl-Glycin  
Screen 2 # 15:                1.0 M      Glycin  
Screen 2 # 20:                5%<sub>(w/v)</sub>      Polyvinylpyrrolidon (K15)  
Screen 2 # 19:                0.1 M      Betainmonohydrat  
Screen 2 # 17:                0.1 M      Hexamincobalt-Trichlorid

Zur Kristallisation der verschiedenen PfTrxR-Formen wurde ferner der MembranFac-Kit (Hampton Research) verwendet. Lösung #2, 0.1 M Zinkacetatdihydrat, wurde auch selber angesetzt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikro- und Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Zur Plasmidvermehrung in *E. coli* wurde ein entsprechender Klon gepickt und in 3 ml LB einschließlich der nötigen Antibiotika über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte entweder mit Hilfe des Qiaquick-Kit nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden) oder per Hand in Anlehnung an Holmes und Quigley (1981). Dazu werden 1.5–3 ml der ÜK bei 8000 rpm in der Tischzentrifuge (5150 g) 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer, Mischen und 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Lyse der Zellen erreicht. Anschließend erfolgt die Neutralisation des pH-Wertes und die Ausfällung der Proteine durch 200 µl eiskalten P3-Puffer. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 14000 rpm = 13600 g) wird der Überstand abgenommen und die DNA mit Hilfe von 500 µl Isopropanol in einem neuen Reaktionsgefäß präzipitiert. Das durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 13600 g) gewonnene DNA-Pellet wird nach Entfernung des Überstandes durch Zugabe von 600 µl eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die DNA vollständig getrocknet (wenige Minuten bei Raumtemperatur in der SpeedVac). Anschließend wird das Pellet in 30 µl *aq. dest.* aufgenommen.

#### 2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung selbst kleinster Mengen DNA und stellt daher die Basis vieler molekularbiologischer Verfahren dar. Man macht sich dabei *in vitro* die Fähigkeit des Enzyms DNA-Polymerase zunutze, in Anwesenheit geeigneter Primer und diverser Cofaktoren (dNTP's, Mg<sup>2+</sup>) DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen zu ergänzen. Die zugänglichen Einzelstränge werden dabei statt über *in vivo* vorarbeitende Enzyme (Helicase, Gyrase) durch Hitzedenaturierung erhalten, was die Hitzestabilität der Polymerase notwendig macht. Während das Enzym klassischerweise aus *Thermophilus aquaticus* gewonnen wurde, sind mittlerweile zahlreiche weitere Polymerasen in Gebrauch, die sich hinsichtlich Thermostabilität, Ausbeute und Fehlerhäufigkeit unterscheiden. Die preiswerte *Taq*-Polymerase liefert bei relativ guter Hitzestabilität eine hohe Ausbeute. Desweiteren wird ihre Eigenschaft, am entstandenen Produkt unspezifische A-Überhänge zu erzeugen, für Klonierungen genutzt. Das etwas langsamere Enzym aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) besitzt durch ihre 3'-5'-Exonuclease-Aktivität eine Korrektoreigenschaft (*proofreading*), welche besonders bei der Amplifikation längerer DNA-Fragmente zum Tragen kommt.

Dementsprechend wurden genannte Enzyme auch in der vorliegenden Arbeit verwendet (*Pfu* beispielsweise in der zielgerichteten Mutagenese).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde stets die sog. *hot start* PCR durchgeführt. Diese ist dadurch charakterisiert, dass vor dem Start der Reaktion durch Zufügen einer kritischen Zutat (meist und hier der Polymerase) die Temperatur des Reaktionsgemisches über der Anlagerungstemperatur der Primer gehalten wird, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Konkret bedeutete dies, dass der Zugabe der Polymerase und dem typischen Cycling-Programm ein initialer Denaturierungsschritt vorausging.

Ein Standard-PCR-Ansatz und –Programm sahen aus wie folgt:

Komponente	Stammlösung	Menge	Endkonzentration
10x-Puffer		5 µl	1x
dNTP	2.5 mM	4 µl	0.2 mM
Primer A	100 pmol/µl	1 µl	2 pM
Primer B	100 pmol/µl	1 µl	2 pM
Template (cDNA-Bank)		1.5 µl	
<i>aq. dest.</i>		36.5 µl	
Polymerase		1 µl	1-5 U
		<b>ad 50 µl</b>	

**Tabelle 2.3. Typisches Pipettierschema einer PCR.**

**Tabelle 2.4. Typisches Temperaturprofil einer PCR.**

\* Die Annealingtemperatur liegt meist etwa 5°C unter der Schmelztemperatur des Primers. Da die Temperaturen beider Primer häufig unterschiedlich sind, ist es empfehlenswert, verschiedene Temperaturen auszutesten, was hier meist simultan mit Hilfe der Gradientenfunktion des Cyclers erfolgte.

\*\*Die Elongationszeit wurde mit Hilfe der Faustregel 1 kb/min ermittelt. Für Produkte bis zu 1kb wurde jedoch grundsätzlich 1 min Verlängerungszeit gewählt.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94-95°C	3 min
Denaturierung	94-95°C	30 sec
Annealing	25-35x 55 ±5°C*	30 sec
Elongation		72°C
Finale Elongation	72°C	2-5 min**
Kühlen und Halten	4°C	

Zur Optimierung der PCR wurden je nach Problemstellung MgCl<sub>2</sub>-, dNTP- und Template-Konzentrationen variiert oder die Anwesenheit von Ammoniumsulfat getestet. Für Sequenzen bis 1 kb wurde in der Regel *Taq*-Polymerase verwendet, für größere Fragmente das *Pfu*-Enzym. Als Template dienten die im Labor gebräuchlichen cDNA-Banken aus Gametocyten (gI und gII) bzw. Blutstadien (bs) von *Plasmodium falciparum*, die von Herrn Professor Kaslow (Rawlings und Kaslow, 1992) erstellt wurden. Die als gI bezeichnete Bank befindet sich im Invitrogen-Vektor pcDNAI, die Bank gII in pcDNAII. In beide Banken ist auch die DNA einiger asexueller Formen eingeflossen. In Einzelfällen (z. B. *site-directed mutagenesis*, schwierige Umklonierungen) wurde bereits vorhandenes Plasmid oder PCR-Produkt verwendet. Um eine bessere Spezifität der Primerbindung zu erreichen, welche durch den hohen AT-Reichtum von Pf und der deshalb relativ langen Oligonukleotide erschwert war, wurden zur Identifizierung einer Sequenz zunächst Primer ohne Überhang verwendet. Erst in einem zweiten Schritt wurden Schnittstellen zur Klonierung angefügt.

Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte mit der Faustregel

$$ST = (\# A/T) \times 2^\circ\text{C} + (\# G/C) \times 4^\circ\text{C} \quad \text{Formel (1).}$$

Zur weiteren Verwendung eines PCR-Ansatzes wurde dessen Aufreinigung mit dem Qiaquick PCR-Reinigungskit oder bei Bedarf die Exzision aus einem präparativen Agarosegel unter Verwendung des Qiagen Gel-Extraktions-Kit vorgenommen.



### 2.2.1.3 Klonierung

#### 2.2.1.3.1 Restriktion

Wenngleich im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Klonierungsstrategien zum Einsatz kamen, so z. B. TA-Klonierung (Qiagen PCR Cloning Kit), wurden die beschriebenen Klonierungen doch alle mit der Erzeugung von PCR-Produkten begonnen, deren Enden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme trugen. Bei der anschließend durchgeführten *sticky end*-Klonierung werden das Fragment und auch der zu verwendende Plasmidvektor zunächst mit den entsprechenden Endonukleasen inkubiert, wobei die entstehenden linearen DNA-Moleküle durch die Spezifität der Enzyme überhängende Enden aufweisen. Diese klebrigen Enden haben für die Klonierung mehrere Vorteile: Zum einen zieht die DNA-Ligase die Überhänge glatten Enden vor; zum anderen wird unter Verwendung zweier unterschiedlicher Enzyme die Richtung des Einbaus vorgegeben und die Religation leeren Vektors verhindert.

Zur Restriktion werden Insert und Vektor separat mit enzymespezifischem Puffer und dem Enzym versetzt und mindestens 1 h inkubiert. Während für den Verdau des Vektors 1 h bei 37°C in der Regel ausreichend ist, erfolgt die Spaltung des Inserts optimalerweise für mehrere Stunden bei Raumtemperatur. Dies ist darin begründet, dass die Nuklease freie Enden weniger gut angreifen kann und durch die Verringerung der Temperatur zumindest die Stokes'sche Molekularbewegung etwas vermindert wird.

Werden unterschiedliche Enzyme verwendet, kann die Restriktion in einem Doppelansatz geschehen, sofern Kompatibilität der Pufferbedingungen gegeben ist. Dies ist bei der Auswahl der Enzyme zu bedenken. Auch der Verdau selbst erfordert hierbei häufig Optimierung, da der einzusetzende Puffer oft für beide Enzyme suboptimal ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde, sofern nicht anders vermerkt, stets der „Tango“-Puffer des Enzymherstellers (MBI Fermentas) verwendet.

Insert	Vektor
13 µl <i>aq. dest.</i>	13 µl <i>aq. dest.</i>
3 µl Puffer (10x)	3 µl Puffer (10x)
12 µl PCR-Produkt (~ 70 ng/µl)	6 µl Plasmid (~ 150 ng/µl)
1 µl <i>Bam</i> HI (10 U/µl)	1 µl <i>Bam</i> HI (10 U/µl)
1 µl <i>Hind</i> III (10 U/µl)	1 µl <i>Hind</i> III (10 U/µl)
→ 3 h Inkubation bei RT	→ 1 h Inkubation bei 37°C

**Tabelle 2.5. Typisches Beispiel für einen Restriktions-Doppelansatz von Vektor und Insert.**

Dem Verdau folgt eine Reinigung wie bereits für PCR beschrieben. In

jedem Fall werden anschließend die Konzentrationen der Eluate photometrisch bestimmt (Biophotometer, Eppendorf). Dazu werden 65-68 µl *aq. dest.* in einer UVette (Eppendorf) als Nullwert eingestellt. 2-5 µl der Probe werden zugemischt und die Optische Dichte bei 260 nm gemessen.

Nach der Formel

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \text{ (Sambrook } et al., 1990)$$

Formel (2)

wird die Konzentration der doppelsträngigen DNA berechnet. Das parallel bestimmte Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  gibt darüber hinaus die Sauberkeit der Lösung in Bezug auf Proteinverunreinigungen an.

### 2.2.1.3.2 Ligation

Das optimale molekulare Verhältnis von Insert zu Vektor für deren Verknüpfung wird in der Literatur mit 2:1 bis 5:1 angegeben. Da für die Berechnung der Molekülzahl die Größe der beiden Fragmente zu berücksichtigen ist, ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Benötigte Menge Insert [ng]} = (\text{Vektor [ng]} \times \text{Insertgröße [bp]} \times 5) / \text{Vektorgröße [bp]} \quad (3).$$

Das für die Ligation am häufigsten verwendete Enzym ist aufgrund ihrer Schnelligkeit und unkomplizierter Pufferbedingungen die T4-Ligase. Für die Ligationen im Rahmen dieser Arbeit wurden überwiegend die Kits Ready-To-Go™ T4-Ligase (Amersham, Freiburg) und Quick Ligation™ Kit (NEB, Beverly, USA) verwendet. Letzterer arbeitet ebenfalls mit T4-Ligase. Beide Kits wurden nach Herstelleranweisungen eingesetzt, wobei sich mit dem Ready-To-Go-Ansatz eine etwas verlängerte Inkubationszeit (1 h) bei 16°C als vorteilhaft erwies. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde meist direkt zur Transformation verwendet, der Rest einem 10minütigen Inaktivierungsschritt bei 65°C unterzogen und anschließend bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.3.3 Zielgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Diese Methode wird dazu benutzt, einzelne Basen einer Sequenz gezielt zu mutieren. Die Bezeichnung dient der Abgrenzung von der Zufallsmutagenese, bei der ganze Organismen z. B. durch chemische Agenzien ungerichtet mutiert werden, um die Auswirkungen der Mutationen phänotypisch zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit war die gerichtete Mutation zum einen zur Wiederherstellung der eigentlichen Sequenz vonnöten (Rückmutation Trx3, TrxR), zum anderen wurden in der Sequenz von TPx1 gezielt Cys→Ala-Austausche vorgenommen, um die Bedeutung der Cysteinreste zu untersuchen.

Liegen dabei, so wie hier, komplette Plasmide vor, werden zwei komplementäre Primer entworfen, die in der Mitte den gewünschten Austausch enthalten. Für die PCR wird im Allgemeinen eine Polymerase mit Korrekturaktivität benutzt (hier: *Pfu*). Zwar nimmt man dabei geringere Ausbeute in Kauf, erhält aber ein Produkt mit geringerer Fehlerhäufigkeit und darüber hinaus mit glatten Enden, was für die weitere Vorgehensweise von Vorteil ist. Der PCR-Ansatz wurde pipettiert wie unter beschrieben; es wurden 3 U *Pfu*-Polymerase und etwa 30 ng Plasmidtemplate verwendet. Die Initialdenaturierung und finale Extension erfolgten für 5 min, die Extensionszeit pro Zyklus wurde für das jeweilige Plasmid berechnet: Pro kb wurden 2 min gewährt. Zur Vermeidung unerwünschter, weiterer Mutationen wurde die Zyklenzahl auf etwa 25 begrenzt. Der Erfolg der PCR wurde in einem Agarosegel durch Vergleich mit der eingesetzten Templatmenge kontrolliert. Anschließend wird der gereinigte PCR-Ansatz komplett einem *DpnI*-Verdau (50 µl-Ansatz) unterzogen. Dieses Enzym erkennt

6-methyliertes Guanosin in der Sequenz Gm6A↓TC und spaltet wie durch den Pfeil angezeigt. Unmethylierte DNA wird nicht geschnitten. Da die meisten Bakterienstämme das *dam*-Methylierungssystem besitzen, ist Plasmid-DNA üblicherweise methyliert, das PCR-Produkt aber noch nicht. Optimalerweise wird daher durch die Restriktion das Template zerstört, und bei der anschließenden Transformation (hier 10-20 µl des Verdauansatzes) gelangen nur mutierte Plasmide in die Zellen. Dass sich diese direkt transformieren lassen, liegt daran, dass sich die komplementären Einzelstränge spontan aneinandergelagert haben und nur noch zwei Einzelstrangbrüche enthalten. Diese sogenannten *nicks* befinden sich an unterschiedlichen Positionen und werden im Bakterium repariert. Da für diese Reparatur ein 5'-Phosphatende notwendig ist, wurden entsprechend modifizierte Primer verwendet bzw. die PCR-Produkte phosphoryliert.

#### **2.2.1.4 Transformation in *Escherichia coli***

##### **2.2.1.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (Calciumchlorid-Methode)**

Zur Gewinnung kompetenter *E. coli*-Zellen werden die Zellen aus der Stammkultur (-70°C) frisch ausplattiert und mit einem einzelnen Klon eine Übernachtskultur (ÜK) in 3 ml LB angeimpft, welche bei 37°C und 200 Upm schüttelnd inkubiert wird. Daraus wird 1 ml in 100 ml LB überführt. Im Falle von M15-Zellen erfolgt die Kultivierung in Anwesenheit von Kanamycin. Da sonstige Zellen, die noch kein Plasmid besitzen, ohne Antibiotika angezogen werden, ist bei der Prozedur ganz besonders auf Sterilität zu achten. Die Kultur wird etwa 2 h bei 37°C geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.2 bis max. 0.5 erreicht ist. Dann werden die Zellen 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend in sterilen Falcontubes bei 4°C und 4000 g 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wird das Zellpellet in 30 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und mind. 40 (bis 90) Minuten auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4°C, 400 g) wird jedes Pellet in 4 ml (bez. auf 100 ml Kultur) eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und aliquotiert. Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff oder Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

##### **2.2.1.4.2 Transformation**

Ein Aliquot kompetenter Zellen (100 µl) wird auf Eis aufgetaut. Auf diese Menge können vom Ready-To-Go-Ansatz 2 µl, von der Quick-Ligation 4 µl (etwa 10 ng) transformiert werden. Wird ein bestehendes Plasmid transformiert, geschieht dies mit etwa 1 µg DNA. Nach der Zugabe der DNA wird die Lösung ruhig für 30 Minuten auf Eis belassen. Anschließend exponiert man das Gemisch für 90 sec 42°C, kühlt danach sofort kurz auf Eis ab und gibt 400 µl vortemperiertes LB-Medium zu. Es folgt eine 45minütige Inkubation bei 37°C, wobei mit 160-200 Upm geschüttelt wird. Danach werden die Zellen auf Agar, der die jeweils zur Selektion benötigten Antibiotika enthält, ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die gewachsenen Klone getestet.

##### **2.2.1.4.3 Selektion / Identifizierung positiver Klone**

Die Selektion positiver Klone erfolgte in jedem Fall über die auf den verwendeten Plasmiden codierte Antibiotikaresistenz. Die Vektoren pSK und pQE enthalten das Resistenzgen gegen

Carbenicillin / Ampicillin, pREP4 in M15-Zellen vermittelt Kanamycin-Resistenz. Für die Selektion wird die *E. coli*-Flüssigkultur nach der Transformation auf den Antibiotika-haltigen Agar ausplattiert. Darüber hinaus besitzt der pSK-Vektor das *lacZ*-Gen, dessen Produkt für die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase nötig ist. Dieses Enzym setzt X-Gal, welches ebenfalls in den Agar gegeben wird, zu einem blauen Farbstoff um. Durch eine erfolgreiche Klonierung innerhalb der *multiple cloning site* wird die Expression funktionsfähigen Enzyms verhindert und entsprechende Kolonien bleiben weiß. In dieser Arbeit wurde der Blau-Weiß-Test zur Selektion bei pSK-Klonierungen eingesetzt. Bei den übrigen Klonierungen erfolgte die Identifizierung positiver Klone durch abendliches Animpfen einer 3 ml-ÜK und Plasmid-Präparation und Kontrollverdau am nächsten Morgen. Der Restriktionsansatz umfasste meist 20  $\mu$ l, wobei 5-10  $\mu$ l Plasmid verwendet wurden.

#### 2.2.1.4.4 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die standardmäßige Überexpression klonierter Gene erfolgte in M15-Zellen, in denen eine besonders enge Kontrolle der Expression durch das pREP4-Plasmid erreicht wird. Die Produktion des dort codierten glucosesensitiven Repressors wird durch IPTG beendet und die Expression des eigentlichen Gens induziert.

Als erste Vorkultur (VK) wird eine frisch transformierte Kolonie in 3 ml LB mit Antibiotikazusatz (typischen Endkonzentrationen: C *ad* 100  $\mu$ g/ml, K *ad* 50  $\mu$ g/ml, CH *ad* 25-50  $\mu$ g/ml) inokuliert, diese einige Stunden inkubiert (schüttelnd, 37°C) und in 250 ml LB mit Antibiotika überführt (2. VK). Dieser Kulturansatz wird über Nacht bei 37°C und 160-180 Upm geschüttelt. Die Hauptkultur (1 l LB + Antibiotika) wird am nächsten Morgen 1-2.5%ig damit angeimpft. Bei Hauptkulturen von 0.25 bzw. 0.5 l wird zur Inokulation die erste VK verwendet (3 bzw. 6 ml). Die Hauptkultur wird bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4-0.6 inkubiert und anschließend die Expression durch IPTG-Zugabe *ad* 1 mM induziert. Nach 4stündiger Expressionsdauer werden durch Zentrifugation bei 8000 rpm (10500g, 4°C, 15 min) Zellpellets gewonnen, welche in möglichst wenig US-Puffer resuspendiert werden. Nach Zugabe von 40 nM Cystatin, 150 nM Pepstatin und 10  $\mu$ M PMSF schließt sich die Aufreinigung oder Lagerung bei 20°C an.

Eine sogenannte *leaky expression* noch vor der eigentlichen Induktion lässt sich durch Anwesenheit von Glucose unterbinden. Hierzu wird frisch transformiert und auf Glucosehaltigen Agar (1%) ausplattiert. Während die Vorkulturen ebenfalls 1% Glucose enthalten, werden der Hauptkultur nur 0.5% zugesetzt. Diese Menge ist zum Zeitpunkt der Induktion verbraucht, und die Expression wird wie gewohnt mit IPTG gestartet.

#### 2.2.1.5 Auftrennung von DNA im Agarosegel

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA werden 0.5-1%ige Gele verwendet. Die Agarose wird in TBE-Puffer aufgenommen und durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Erkalten auf Handwärme wird das Gel gegossen.

Von PCR-Proben und Plasmidkontrollverdaus wurden in der Regel 10  $\mu$ l, von Plasmidpräparationen 3-6  $\mu$ l mit 6xloading dye *ad* 1x versetzt, gut gemischt und nach Erstarren des Gels aufgetragen. Der Lauf erfolgt in TBE-Puffer bei 60-90 mA. Anschließend

kann das Gel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt werden. Durch dessen Interkalation in die DNA-Moleküle werden diese unter UV-Licht (254 nm) durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromid sichtbar.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Proteinreinigung**

#### **2.2.2.1.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten**

Die wie beschrieben gewonnene Zellsuspension wird ggf. auf Eis aufgetaut und mit US-Puffer, welcher zusätzlich 0.2 mg/ml Lysozym sowie 1 mg/ml DNase I enthält, auf 25 ml aufgefüllt. Diese Mischung lässt man im Eisbad 30 min rühren, überführt sie in einen Zentrifugenbecher und zerstört die Zellen zusätzlich durch 60-120 Impulse Ultraschall (70%). Im Überstand nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 16.000 rpm (31.000 g) und 4°C befindet sich der Inhalt des *E. coli*-Cytosols einschließlich der überexprimierten Proteine.

#### **2.2.2.1.2 Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose**

Die Plasmidvektoren pQE30 und pRSetA enthalten N-terminal der eingefügten Sequenz die Codierung für einen Hexahistidyl-Tag, welcher durch seine Bindung an Ni<sup>2+</sup> die Aufreinigung aus einem Proteinextrakt durch Metall-Affinitäts-Chromatographie ermöglicht. Das Säulenmaterial besteht aus Nickel-Nitrilotriessigsäure, welches an Sepharose CL-6B gekoppelt ist. Die durchschnittliche Bindungskapazität dieses Materials liegt bei 5-10 mg markiertem Protein pro ml Säulenmaterial. Letzteres wird in einer Glassäule mit Glasfritte sedimentiert und mit mind. 3 SV US-Puffer äquilibriert. Die Aufgabe der Proteinlösung erfolgt mit einer Geschwindigkeit von 8-10 sec pro Tropfen, der anschließende Waschschritt mit 3 SV US-Puffer mit 4-6 sec pro Tropfen. Danach wird mit Lösungen steigender Imidazolkonzentrationen in US-Puffer gewaschen. Dabei sollen zunächst schwächer gebundene Proteine durch Imidazol von den Bindungsstellen verdrängt werden, um das gewünschte Protein danach möglichst sauber zu eluieren. In der Testphase wurde meist ein Imidazolgradient mit 1-3 Säulenvolumen von US-Puffer mit Imidazolgehalt von 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 und 500 mM verwendet. Nach Ermittlung der Imidazolkonzentration, bei der das Zielprotein eluiert, konnte das Elutionsprofil häufig vereinfacht bzw. zur Erzielung einer größeren Sauberkeit optimiert werden. Nach der Elution des exprimierten Proteins wird die Säule mit 5 SV 500 mM Imidazol gewaschen, mit US-Puffer nachgespült (mind. 5 SV) und das Säulenmaterial in 20% Ethanol gelagert.

#### **2.2.2.1.3 Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose**

Zur Reinigung NADPH-abhängiger Enzyme kann deren Bindung an 2',5'-ADP-Sepharose genutzt werden. Pro ml präparierten Säulenvolumens bindet das Material 0.4 mg des Referenzproteins Glucose-6-phosphatdehydrogenase. Das Verfahren wurde in dieser Arbeit zur Reinigung His-tag-freier PfTrxR-Formen eingesetzt.

Den Herstelleranweisungen folgend wurden für ein Säulenvolumen von 7.5 ml 1.5 g 2',5'-ADP-Sepharose verwendet und wie empfohlen in destilliertem Wasser vorgequollen. Anschließend erfolgten Waschschritte mit Wasser und TE-Puffer, die Befüllung der Säule

und weitere 3 SV Äquibrierung mit TE-Puffer. Der Rohextrakt wurde erstellt wie in 2.2.2.1.1 beschrieben, jedoch unter Verwendung von TE- statt US-Puffer. Mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa  $0.3 \text{ cm} \times \text{min}^{-1}$  (bei  $\sim 1 \text{ cm}^2$  Durchschnittsfläche) wurde der Rohextrakt aufgegeben, mit 3 SV TE-Puffer und 1 SV 100 mM KCl-TE gewaschen und anschließend mit steigenden Konzentrationen  $\text{NADP}^+$  in TE eluiert. Für die altPfTrxR erwiesen sich je 2 SV 1 und 2 mM  $\text{NADP}^+$  als günstig, im Falle der shortPfTrxR wurde folgendes Reinigungsschema als optimal etabliert:

Rühren auf Eis	}	Rohextrakt (RE)- Herstellung	45 min
Ultraschall			6 x 20 sec
Zentrifugation			30' bei 30680 g
Waschschritte nach RE-Aufgabe			3 SV TE-Puffer 1 SV 100 mM KCl 1 SV TE-Puffer
Elutionsprofil			2 SV 250 $\mu\text{M}$ $\text{NADP}^+$ 1 SV 500 $\mu\text{M}$ $\text{NADP}^+$ 2 SV 1 mM $\text{NADP}^+$ 2 SV 2 mM $\text{NADP}^+$ 1 SV 1 M NaCl
Elution des Proteins			250 $\mu\text{M}$ $\text{NADP}^+$ (2. Fraktion)
Sonstige Besonderheiten			Aufbereitung des USP* und Aufgabe dieses RE2 direkt nach Aufgabe von RE1. Zusätzlich nochmalige Reinigung von DL- und Waschfraktionen; Elution bei 250/2 und 500

**Tabelle 2.6. Optimiertes Reinigungsschema der shortPfTrxR über 2',5'-ADP-Sepharose.**

\* in etwa einem Drittel der vorher verwendeten Puffermenge; hier nur 3x sonifiziert.

Das gezeigte Schema führte auch mit der His-tag-freien PfTrxR herkömmlicher Länge (nPfTrxR) zu guten Ergebnissen. Hier wurden jedoch aufgrund der starken Expression 10 ml Säulenvolumen pro Liter Kulturvolumen verwendet. Der Elutionsschritt mit 1 mM  $\text{NADP}^+$  war entbehrlich, der Gradient wurde jedoch mit je 1 SV 100 und 250  $\mu\text{M}$  begonnen.

Wie aus Tabelle 2.6 ersichtlich, schloss sich an den  $\text{NADP}^+$ -Gradienten ein Waschschritt mit 1 M NaCl an, da durch diese Ionenstärke komplette Elution erreicht wird. Abschließend wurde mit 3 SV TE-Puffer gewaschen und die Sepharose mit einer pH-Schaukel aus abwechselnd 3 x 3 SV NaAc und Tris (siehe Material) regeneriert.

Die Fraktionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert und proteinhaltige Fraktionen mittels Ultrazentrifugation (Centriprep 30k und ggf. Centricon 30k) eingengt.

Die Affinitätschromatographie an Amylose wurde nur zur Reinigung der MBP-Tlp2-Fusion verwendet und ist daher im entsprechenden Abschnitt (3.1.2.4) beschrieben.

#### 2.2.2.1.4 Kontrolle mittels SDS-PAGE

Die Elektrophoresemethode nach Laemmli (Cleveland *et al.*, 1977) trennt Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel auf. Neben dem Molekulargewicht gibt es weitere Faktoren, wie beispielsweise die Faltung, welche die Laufeigenschaften

beeinflussen. Um diese zu minimieren, werden die Proteine in der Regel vor dem Auftrag reduziert und denaturiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich denaturierende Gele verwendet und es wurde, wenn nicht anders vermerkt, unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit kamen je nach Größe des zu kontrollierenden Proteins 10–15%ige Trenngele zum Einsatz. Das ca. 1.5 cm breite Sammelgel war stets 4%ig. Beispielhaft gibt Tabelle 2.7 die Rezepte für vier 15%ige Gele, einschließlich 4%igen Sammelgelen, wieder.

	4%iges Sammelgel	15%iges Trenngel*
H <sub>2</sub> O	3.05 ml	3.6 ml
Puffer pH 8,8	1.25 ml	3.75 ml
Acrylamid/Bis	0.65 ml	7.5 ml
SDS (10% in H <sub>2</sub> O)	0.05 ml	0.5 ml
APS (10% in H <sub>2</sub> O)	25 µl	75 µl
TEMED	5 µl	7.5 µl

**Tabelle 2.7. Rezept für vier 15%ige SDS-Gele einschließlich Sammelgelen (4%).**

\* Nach dem Gießen wird das Trenngel mit Ethanol überschichtet und polymerisiert etwa 1 h aus. Anschließend wird das Ethanol abgegossen und mit einem Papiertuch vollständig

abgenommen.

Nach Auspolymerisieren des Sammelgels (ca. 30 min) wird das Gel vertikal in eine mit SDS-Kammerpuffer gefüllte Gelkammer gesetzt. Zur Probenvorbereitung wird die Proteinlösung mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C zur besseren Denaturierung inkubiert.

Für Reinigungsprofile erfolgte die Probenvorbereitung und –aufgabe meist wie folgt:

Fraktion	Menge	Auftrag
USP	Pipettenspitze + 50 µl	1x SB 7-10 µl
RE, DL, W	10 µl	+ 20 µl 1x SB 10 µl
Elutionsfraktionen	10 µl	+ 20 µl 1x SB 25 µl
1 ml-Pellets (Expressionskontrolle)	komplett	+ 50 µl 1x SB 5-7 µl
Gelfiltrationsfraktionen	20 µl	+ 5 µl 4x SB komplett

**Tabelle 2.8. Vorbereitung der SDS-PAGE-Proben in dieser Arbeit.**

Die Aufgabe der Proben erfolgt nach Abkühlen und kurzer Zentrifugation. Die Elektrophorese wird in

geschlossener Kammer bei einer Spannung von 120 V durchgeführt. Für eine sauberere und schonendere Auftrennung speziell bei anschließendem Western-Blot sollte die Spannung teilweise auf 100 V oder darunter gesenkt werden, wodurch der Lauf sich verlangsamt. Erreicht die Indikatorfront das untere Gel-Ende, so wird die Spannung abgeschaltet, das Gel entnommen und gefärbt. Hier stehen zwei unterschiedlich sensitive Methoden zur Verfügung, die jedoch nacheinander, bzw. gekoppelt durchgeführt werden können. Die einfachste Standardmethode ist die Färbung mit Coomassie-Blau. Hierfür wird das Gel 20 min in der Färbelösung auf dem Horizontalschüttler bewegt und nach Abspülen mit H<sub>2</sub>O zweimal für je 20 min in 40%igem Methanol mit 10%iger Essigsäure entfärbt. Die Proteinbanden bleiben gefärbt und die Größe des Proteins kann anhand des Markers abgeschätzt werden. Bei geringen Proteinmengen und zum besseren Abschätzen von Verunreinigungen färbt man das Gel mit Silbernitrat. Hierfür wurde ein Kit der Firma Merck (Merck, Darmstadt) verwendet.

## 2.2.2.2 Proteinanalyse

### 2.2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die einfachste spektrophotometrische Methode ist die Messung der Absorption bei 280 nm, die im Wesentlichen vom Gehalt an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bestimmt wird. Da dieser je nach Protein variiert, hängt die Genauigkeit der Methode von der Information über das Protein ab. Prinzipiell exakter selbst bei unbekannter Proteinsequenz ist die photometrische Konzentrationsbestimmung über die Absorption der Peptidbindungen, welche bei sehr kurzen Wellenlängen liegt (192 nm, 205 nm; Scopes, 1974). In diesem Bereich stören jedoch viele Puffersubstanzen und sogar Sauerstoff, was die Messung erheblich erschwert.

Bei bekannter Aminosäuresequenz kann der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  eines Proteins nach der Edelhoch-Methode ermittelt werden. Er ergibt sich aus der Summe der Absorptionen von Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$  von Tyrosin ist ca.  $1.49 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{280}$  von Tryptophan beträgt ca.  $5.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); je nach Oxidationszustand ist auch die Absorption von Cystin ( $0.125 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) zu berücksichtigen. Dem Faktor zu addieren ist ggf. die Absorption prosthetischer Gruppen wie z.B. FAD ( $\epsilon_{280}$  ca.  $37.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Verfälschungen ergeben sich somit „nur noch“ durch den Einfluss der Sekundärstruktur auf die Absorption und die Anwesenheit von Nukleinsäuren, deren Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt.

Da die im Rahmen dieser Arbeit zu bestimmenden Proteinkonzentrationen sich auf nahezu reine Lösungen des jeweiligen Proteins bekannter Sequenz bezogen, wurde stets der kalkulierte Extinktionskoeffizient zugrunde gelegt, welcher mit Hilfe des Programms JustBio ProtCalc (früher MBS) ermittelt wurde. Dies geschah unter Annahme des oxidierten Zustandes des Proteins.

### 2.2.2.2.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration

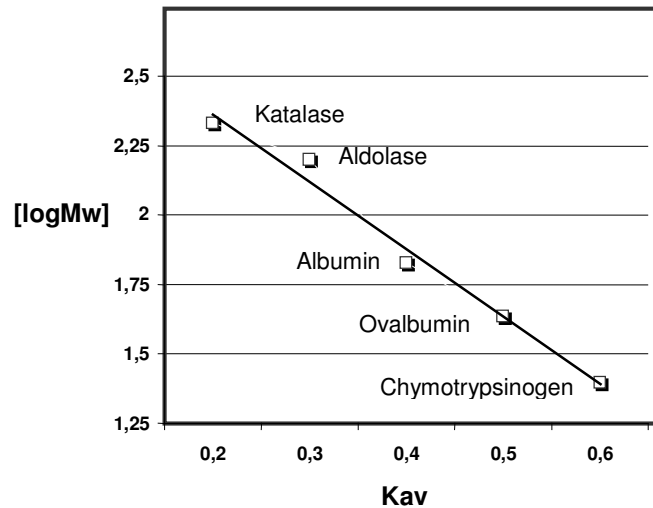
Neben der ungefähren Abschätzung im SDS-Gel und der Berechnung über Computerprogramme lässt sich das Molekulargewicht eines Proteins auch über Säulenchromatographie bestimmen. Dazu wurden hier zwei HiLoad-Säulen (Amersham Pharmacia) verwendet: die Superdex 75, mit einem Trennbereich bis ca. 75 kDa und die Superdex 200, die bis etwa 250 kDa verlässlich auftrennt.

Da kleine Moleküle in das Säulenfüllmaterial eindringen können, während große daran vorbeigeleitet werden, verhält sich das Elutionsvolumen  $V_e$  (bzw. der Trennungskoeffizient  $K_{av}$ , Berechnung nach Formel (4)) antiproportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Zur genauen Berechnung muss zunächst für jede Säule und jedes Puffersystem eine Eichkurve mit Proteinen bekannten Molekulargewichtes erstellt werden (Abb. 2.1). Daraus ergeben sich dann die Säulengleichungen (Formeln (5) und (6)). Da die Gleichungen nur im sogenannten Fraktionierungsbereich linear sind ( $K_{av} = 0.1-0.7$ ), kann nur in diesem Bereich eine gültige Berechnung des Molekulargewichtes vorgenommen werden.



**Abb. 2.1. Kalibrierung der Superdex 200 Chromatographiesäule.**

Als Standards wurden Katalase (215 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Chymotrypsinogen (25 kDa) verwendet.



(4)  $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$  mit  $V_e$  = Elutionsvolumen  
 $V_0$  = Totvolumen (Sephadex 75: 43.2 ml; Sephadex 200: 44.619 ml)  
 $V_t$  = Säulenvolumen (Sephadex 75: 120.6 ml; Sephadex 200: 120.0 ml).

(5) Säulengleichung Superdex 75\*:  $\log(M_w) = -2.01666 \cdot K_{av} + 5.01511$

(6) Säulengleichung Superdex 200\*:  $\log(M_w) = -2.055 \cdot K_{av} + 2.603$   
 \* in US-Puffer mit pH 7.5

Weitere Voraussetzung für die Anwendung der Eichgeraden ist eine ähnliche Form der Eichproteine und des zu untersuchenden Proteins (hier: globuläre Eichproteine).

In dieser Arbeit wurde die Gelfiltration weniger zur Molekulargewichtsbestimmung als zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes des jeweiligen Proteins verwendet.

Die verwendeten Puffer wurden unter Vakuum filtriert und somit gleichzeitig entgast. Für alle hier untersuchten Proteine wurde zunächst US-Puffer verwendet, da er durch seinen NaCl-Gehalt eventuelle ionische Interaktionen eines Proteins mit der Matrix verhindert und den meisten Proteinen relativ hohe Stabilität gewährt. Mit dem Puffer werden zunächst Probenschleife und Pumpen gewaschen, dann wird die Säule mit mindestens 1.5 SV des Laufpuffers äquilibriert. Anschließend erfolgt die Applikation der Probe auf die Probenschleife. Gemäß der Empfehlung für analytische Gelfiltrationen wurde hier das Probenvolumen mit etwa 0.5-2% des Säulenvolumens gewählt. Vor Injektion der Probe auf die Säule wurde ein Vorlauf von einigen ml Puffer programmiert, nach Injektion wurde über 1-1.5 SV eluiert. Für erste Versuche wurde eine Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewählt und das Eluat zu je 3 ml fraktioniert. Während des gesamten Laufs misst die Anlage die Absorption bei 280 nm, pH-Wert, Temperatur und Leitfähigkeit.

Nach der Kontrolle der Peaks mittels SDS-PAGE wurde anhand des Elutionsvolumens und der jeweiligen Säulengleichung das Molekulargewicht errechnet. Die Säule wird nach dem Lauf mit mehreren Säulenvolumina Puffer gewaschen bzw. nach mehreren Läufen nach Herstelleranweisungen regeneriert.

### 2.2.2.2.3 Immunologischer Proteinnachweis (Western Blot)

Grundsätzlich stehen das Wet-Blot-Verfahren mit vertikalem Gel bei 4°C und das *Semidry*-Verfahren mit horizontalem Gel bei Raumtemperatur zu Verfügung. Letzteres fand im Rahmen dieser Arbeit überwiegend Anwendung. Die SDS-PAGE wurde dazu wie gewohnt durchgeführt. Je nach Ergebnis des ersten Blots wurde in einem zweiten Schritt die Probenauftragsmenge optimiert. Vor Zusammenbau der Blot-Apparatur wurde Geltransferpapier in den verschiedenen Puffern 15 min vorinkubiert (drei Papiere in Anodenpuffer I, zwei in Anodenpuffer II und 5 in Kathodenpuffer). Die PVDF-Membran wurde kurz mit Methanol benetzt und anschließend sofort in Anodenpuffer II äquilibriert. Die Graphitplatten des Blot-Geräts wurden mit Wasser gesättigt und der „Sandwich“ wie folgt geschichtet:

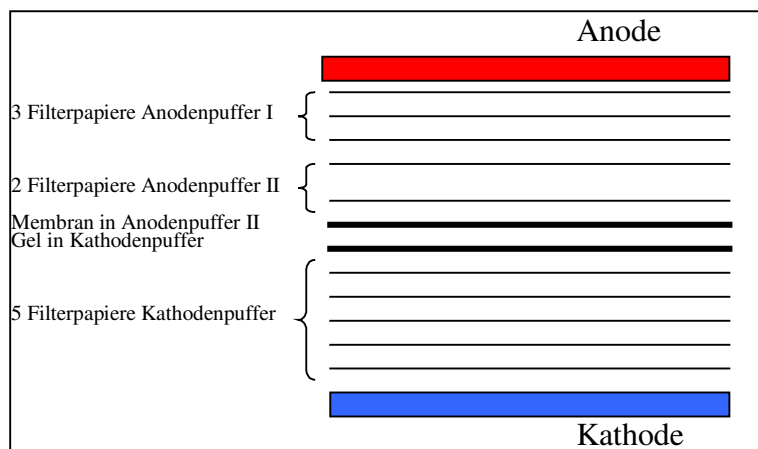


Abb. 2.2. Aufbau eines *Semidry*-Blot.

Dabei wurden Luftblasen stets durch Rollen mit einem Glasstab entfernt. Mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup> wurde für 55 min geblottet. Die Proteine, durch die SDS-Beladung immer noch negativ geladen, wandern dabei in

Richtung Anode und werden auf der PVDF-Membran festgehalten. Letztere wird anschließend völlig getrocknet, dann mit Blottingpuffer rehydratisiert und in TBS gelegt. Wird Nitrocellulose verwendet, wird diese ohne Trocknung direkt in TBS überführt. An dieser Stelle kann zur Kontrolle eine Färbung mit Ponceau-S erfolgen (5 min).

Für die hier mehrmals vorgenommene N-terminale Ansequenzierung geblotteten Proteins wurde kurz mit Coomassie gefärbt und 2x wenige Minuten entfärbt. Anschließend wurde die Membran in Wasser gegeben. Die ausgeschnittenen Banden wurden bis zur Ansequenzierung bei -20°C ebenfalls in *aq. dest.* aufbewahrt.

Zum immunologischen Nachweis wird nach der Kontrollfärbung kurz mit *aq. dest.* gewaschen. Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen mit 5% Magermilchpulver in TBST-Puffer (w/v) bei 4°C für mindestens 1 Stunde oder über Nacht geblockt. Daraufhin wird die Membran zunächst mit TBS abgespült, dann in der ersten Antikörperlösung (Verdünnung je nach Antikörper 1:500 bis 1:2000 in TBST, optional + 5% Magermilchpulver) für 1 h schwenkend inkubiert (Wippe). Es folgen 3 x 5minütige Waschschrte in TBS, 2 x in TBST und wiederum 2 x mit TBS. Nun wird die Membran 1 h in dem 1:1000 verdünnten Zweit-Antikörper, der an Meerettich-Peroxidase gekoppelt ist (wiederum optional 5% Magermilchpulver), inkubiert und gewaschen wie beschrieben.

Zum Sichtbarmachen kann einerseits die Peroxidaseaktivität des Zweitantikörpers genutzt oder andererseits das deutlich sensitivere ECL-KIT zur Fluoreszenzfärbung (Amersham, Freiburg) verwendet werden.

Die erste Methode erfordert nur das Inkubieren des Blots für 2-10 min in Entwicklerlösung, die Silber enthält. Ist die gewünschte Intensität erreicht, wird die Reaktion durch Waschen in Wasser gestoppt.

Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Dabei werden je 1 ml der beiden Lösungen gemischt und auf die noch feuchte Nitrocellulosemembran pipettiert. Nach 1 min lässt man das Gel abtropfen, legt Frischhaltefolie glatt darüber, darauf in der Dunkelkammer Film in der entsprechenden Größe, und belichtet in einer lichtdichten Box für 1 min bis über Nacht.

### 2.2.2.3 Enzymkinetik

Alle im Folgenden geschilderten Messungen wurden in einem temperierten Spektralphotometer bei 25°C durchgeführt. Üblich ist die Messung in einem Volumen von 1 ml über einen effektiven Lichtweg von 1 cm. Abweichungen von diesen Parametern sind im Ergebnisteil vermerkt.

#### 2.2.2.3.1 DTNB-Bestimmung

Die genaue Konzentration einer DTNB-Lösung kann über dessen Reduktion zu zwei TNB-Anionen erfolgen, da letztere bei 412 nm stark absorbieren ( $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Üblicherweise wird dazu DTE / DTT in deutlichem Überschuss verwendet. In 150 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0, andere Puffer sind jedoch auch möglich, wird mit 200  $\mu\text{M}$  DTE der Nullwert bei 412 nm eingestellt und nach Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  DTNB (Ellman's Reagens) die Absorption erneut bestimmt. Die DTNB-Konzentration ergibt sich nach der Formel (7)

$$c = \frac{\Delta A * VF}{\epsilon} \quad (7)$$

Auf der Grundlage dieses Assays erfolgte hier verschiedentlich die Bestimmung des Reduktionszustandes eines Proteins oder auch der qualitative Aktivitätsnachweis.

#### 2.2.2.3.2 Insulin-Assay

Der turbidimetrische Insulinassay (Holmgren, 1979) misst die allgemeine reduktive Aktivität eines Proteins und beruht auf der Reduktion der Disulfidbrücken von Insulin. Reduzierte Insulinketten fallen aus und absorbieren bei 600 nm. Das zu testende Protein wird zunächst *ad* 5-20  $\mu\text{M}$  mit Insulinassaypuffer vermischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 mM DTT gestartet. Möglichst gleichzeitig beginnt man die Messung der Negativkontrolle ohne Testprotein. Gemessen wird die Absorptionzunahme bei 600 nm in allen Proben über einen Zeitraum von 60 min. Das DTT in sämtlichen Proben ergibt einen internen Standard. Als Positivkontrolle diente hier PfTrx1. Bei stark verdünnter Proteinlösung wurde das Insulin direkt darin gelöst.

Reaktionsgleichung der Positivkontrolle:  $\text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{Insulin-S}_2 \rightarrow \text{TrxS}_2 + \text{Insulin}(\text{SH})_2$

### 2.2.2.3.3 TrxR-Assay

Die Bestimmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität (Gromer *et al.*, 1998) erfolgt gewöhnlich unter Verwendung des artefiziellen Substrates DTNB oder des physiologischen Substrates Thioredoxin. Die Messung der Reduktion des DTNB-Disulfids erfolgt über die Absorption des entstehenden TNB<sup>-</sup>, wie unter 2.2.2.3.1 beschrieben, jedoch mit NADPH und TrxR als Reduktionsmittel.



Während die Reduktion von Thioredoxin durch eine TrxR von der Spezifität der Reduktase abhängt, wird DTNB, auch als Ellman's Reagenz bezeichnet, von allen bisher bekannten großen Thioredoxinreduktasen ( $M_w \geq 55 \text{ kDa}$  pro UE) reduziert.

Im Assay mit DTNB ist zu beachten, dass zwar die Entstehung von TNB<sup>-</sup> gemessen, die Volumenaktivität rechnerisch jedoch auf den NADPH-Verbrauch bezogen wird. Da pro NADPH-Molekül zwei Moleküle TNB entstehen, muss die Absorptionsänderung halbiert werden.

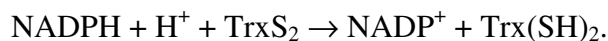
Klassischerweise hat der Assay mit DTNB folgendes Pipettierschema:

Komponente	Konzentration
TrxR-Puffer	(ad 1 ml Gesamtvolumen)*
DTNB	ad 3 mM
TrxR	x $\mu\text{l}$
NADPH	ad 0.2 mM → Start

**Tabelle 2.9. Pipettierschema des TrxR-DTNB-Assays.**

\* In dieser Arbeit wurde meist in 0.4 oder 0.5 ml Endvolumen gemessen.

Die Umsetzung von Thioredoxin folgt der Reaktionsgleichung



Gemessen wird die NADPH-Oxidation als Absorptionsabnahme bei 340 nm ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) während der linearen Phase. Die Volumenaktivität der Enzymlösung errechnet sich nach Formel (8). VF ergibt sich aus dem Gesamtvolumen dividiert durch das Volumen der eingesetzten Enzymlösung.

$$\text{Volumenaktivität}[\text{U/ml}] = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\text{min} * d * 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}} * \text{VF} \quad (8)$$

Die Assayvorbereitung folgt gewöhnlich dem Pipettierschema:

Komponente	Konzentration
TrxR-Puffer	(ad 1 ml Gesamtvolumen)*
Thioredoxin	ad 20 $\mu\text{M}$
TrxR	x $\mu\text{l}$
NADPH	ad 100 $\mu\text{M}$ → Start

**Tabelle 2.10. Pipettierschema des TrxR-Trx-Assays.**

Im Rahmen der Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde der Assay leicht

modifiziert umgesetzt: In einem Endvolumen von meistens 0.4 oder 0.5 ml wurden in TrxR-Puffer zunächst NADPH und TrxR gemischt, wobei hauptsächlich PfTrxR verwendet wurde. Die Enzymkonzentration lag meist um 10 mU/ml. Nach Kontrolle der NADPH-Oxidase-Aktivität zur späteren Berücksichtigung wurde mit Trx gestartet. Diente dieses Assaysystem als backup zur Reduktion eines weiteren Enzyms (PfTPx1, PfAOP), wurden 150 bzw. 200  $\mu\text{M}$  NADPH, mind. 0.1 U/ml PfTrxR und das PfTrx1 verwendet. Als Substrate der PfTrxR wurden außerdem PfTlp1, PfTrx2 und PfTrx3 getestet.

#### 2.2.2.3.4 Trx-Endpunktbestimmung

Die genaue Ermittlung der Trx-Konzentration einer Lösung folgt dem unter 2.2.2.3.3 beschriebenen Prinzip. Der Unterschied liegt darin, dass hier ein Überschuss der Reduktase verwendet wird, so dass das Substrat direkt nach der Enzymzugabe sehr schnell reduziert wird. Durch die schnelle Messung wird eine Verfälschung durch die unspezifische NADPH-Oxidase-Aktivität der TrxR vermieden. Die Berechnung der Thioredoxinkonzentration folgt Formel (7), wobei das bei 340 nm gemessene  $\Delta A$  und der Extinktionskoeffizient für NADPH verwendet werden.

#### 2.2.2.3.5 TPx-Assay

Die Thioredoxinperoxidase-Aktivität eines Proteins wird typischerweise bei 340 nm als NADPH-Verbrauch gemessen, wobei die Peroxidase Elektronen von Trx an ein Peroxid (meist  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) weiterleitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Peroxidase-Proteinen aus *Plasmodium falciparum* gearbeitet (PfTPx1, PfAOP). Während die Messung klassischerweise in TPx-Puffer vorgenommen wird (Rahlfs und Becker, 2001), wurde hier aus Gründen der Vergleichbarkeit meist TrxR-Puffer verwendet. Nach Vorreduktion des Trx werden generell 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zupipettiert und nach Einstellung einer baseline durch TPx-Zugabe gestartet. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Start mit Peroxid, da z. T. Prx-Konzentrationen bis 80  $\mu\text{M}$  Verwendung fanden. Nach der Prx-Zugabe wurde die Einstellung einer baseline, d. h. die Reduktion des Prx, abgewartet und diese, je nach Intensität und Relevanz (bei Variation der TPx-Konzentration) berücksichtigt. Da PfTrx1 selbst mit Peroxiden reagiert (diese Arbeit), wurde außerdem stets eine entsprechende Kontrolle ohne die Peroxidase berücksichtigt. Je nach Aufgabenstellung wurde mit variierender Trx-, Prx-, oder Peroxidkonzentration gemessen.

#### 2.2.2.3.6 GR-Assay

Die Reduktion von Glutathiondisulfid durch Glutathionreduktase erfolgt NADPH-abhängig, ist somit ebenfalls bei 340 nm messbar (Krohne-Ehrich *et al.*, 1977). Die Reaktionsgleichung lautet



Die Vorgehensweise ist bei der Messung für gewöhnlich wie in Tabelle 2.11 gezeigt.

Komponente	Konzentration
GR-Puffer	(ad 1 ml Gesamtvolumen)*
NADPH	ad 0.1 mM
GR	x $\mu$ l
GSSG	ad 1 mM → Start

**Tabelle 2.11. Pipettierschema des GR-Assays.**

\* In dieser Arbeit wurde meist in 0.4 oder 0.5 ml Endvolumen gemessen

Die Berechnung der Volumenaktivität der GR-Lösung erfolgt nach Formel (8), ebenfalls unter Berücksichtigung des linearen Bereiches der Reaktion. Bei Verwendung des GR-Systems als backup wurden 0.4-0.7 U/ml eingesetzt, wobei es sich stets um das Enzym aus Pf handelte.

### 2.2.2.3.7 HEDS-Assay

Die Reduktion des künstlichen Substrates HEDS dient als Nachweis für die Glutaredoxin-Aktivität eines Proteins. Dabei wird im Standard-Assay (Rahlf's *et al.*, 2001) die Reduktion des entsprechenden Proteins durch das GR-backup in HEDS-Puffer abgewartet und nach Einstellung einer baseline der Assay durch 735  $\mu$ M HEDS gestartet. Für die Hintergrundreaktion GSH  $\rightarrow$  HEDS hat eine Kontrolle zu erfolgen, um deren Aktivität der eigentliche Assay korrigiert wird. 1 U ist hier ebenfalls als der Verbrauch von 1  $\mu$ mol NADPH pro Minute definiert. Mit PfGrx, welches hier ausschließlich verwendet wurde, ist bereits mit 0.3  $\mu$ M eine deutliche Aktivität messbar. Bei den Untersuchungen dieser Arbeit diente das geschilderte Glutaredoxin-Assaysystem vorwiegend als backup zur Reduktion von Peroxiredoxinen; Grx selbst wurde ebenfalls auf eine Reaktion mit Peroxiden getestet.

### 2.2.2.3.8 GrxPx-Assay

Mit Hilfe dieses Assays wurde die Fähigkeit von PfTPx1 und PfAOP untersucht, Glutaredoxin als Elektronendonator zu verwenden. Die Zusammensetzung wurde in Anlehnung an Rouhier *et al.* (2001) gewählt. In TrxR-Puffer ad 0.4 ml Endvolumen wurde Glutaredoxin durch ein GR-backup aus 200  $\mu$ M NADPH, 0.4-0.7 U/ml GR und 1 mM GSH vorreduziert, anschließend das Prx zupipettiert und die Einstellung einer baseline abgewartet. Gestartet wurde die Messung bei 340 nm durch Peroxidzugabe. Die Glutaredoxin-, Peroxiredoxin- und z. T. auch Peroxidkonzentration wurde variiert. Darüber hinaus wurde in diesem System die Substrateignung unterschiedlicher Peroxide für PfAOP verglichen.

### 2.2.2.3.9 Lip-DH-Assay

In diesem Assay nach Lohrer und Krauth-Siegel (1990) wird der durch Liponamiddehydrogenase katalysierte NADH-Verbrauch zugunsten der Reduktion von Liponamid / Liponsäure gemessen. Die Detektion der Absorptionsabnahme erfolgt wie mit NADPH bei 340 nm. Standardmäßig werden in 47 mM Kaliumphosphat, 2 mM EDTA, 200 mM KCl pH 6.9 (GR-Puffer), 100  $\mu$ M NADH und 1 U/ml LipDH pipettiert, und der Assay wird nach Erfassung der Diaphorase-Aktivität (baseline) mit 1 mM Substrat gestartet.

### 2.2.2.3.10 Berechnung kinetischer Parameter

Grundsätzlich erfolgte die Berechnung kinetischer Parameter auf der Basis der Gleichungen von Michaelis-Menten. Voraussetzung ist, dass sich die Aktivität eines Enzyms bei

steigender Substratkonzentration einem Maximum annähert und es dann zu keinem weiteren Geschwindigkeitsanstieg sondern einer Abflachung der Kurve kommt. Die Geschwindigkeit berechnet sich dann als (Formel (9)).

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

Als Enzymeinheit wurde hier statt der gültigen SI-Einheit *katal* [ $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ] die gebräuchlichere Einheit *Unit* [ $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ ] verwendet. Dabei entspricht 1 *Unit*  $1.67 \times 10^{-8}$  *katal*.

Die Michaelis-Konstante  $K_M$  entspricht dabei der Substratkonzentration, bei der  $v = \frac{1}{2} V_{\max}$  entspricht. Unter der Voraussetzung, dass der Zerfall des Enzym-Substratkomplexes zum Produkt wesentlich langsamer abläuft als der Zerfall in die Ausgangskomponenten, entspricht  $K_M$  ferner der Assoziationskonstante des Komplexes [ES] und ist somit ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.

Nach Lineweaver und Burk lässt sich der durch Formel (9) wiedergegebene Zusammenhang als lineare Gleichung im Koordinatensystem darstellen, auf dessen Abszisse der Kehrwert der Substratkonzentration und der Ordinate der Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen wird (Formel (10)).  $K_M$  ergibt sich dann als Kehrwert des Schnittpunktes mit der x-Achse,  $V_{\max}$  entspricht dem Kehrwert des Schnittpunktes mit der y-Achse. Beides lässt sich nach Bestimmung der der Geraden zugrunde liegenden Formel gemäß Lineweaver-Burk berechnen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (10)$$

Liegen Messdaten unter Verwendung variierender Substratkonzentrationen vor, können  $K_M$  bzw.  $V_{\max}$  zudem anhand von Formel (9) berechnet werden. Dazu werden verschiedene Substratkonzentrationen, bevorzugt aus dem linearen Bereich der Kurve, und die mit ihnen erreichte Geschwindigkeit in die Gleichung eingesetzt. Der somit mehrfach errechnete Parameter, z. B.  $V_{\max}$ , sollte annähernd identisch sein.

Unter dem Begriff der „spezifischen Aktivität“ wird die Maximalgeschwindigkeit des Enzyms bezogen auf das Molekulargewicht verstanden (U/mg).

Aus der Maximalgeschwindigkeit und der verwendeten Enzymkonzentration lässt sich ferner die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$ , d. h. der Substratumsatz pro Enzymmolekül und Zeiteinheit berechnen. Dabei wird die Sättigung des Enzyms mit Substrat vorausgesetzt, d. h.  $[ES] = [E_t]$ .

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Umsetzungen beobachtet, bei denen sowohl enzymatische Katalyse als auch chemische Reaktion noch nicht ausgeschlossen werden können. Die Abgrenzung zur enzymatischen Reaktion kann prinzipiell zum einen aufgrund einer relativ hohen benötigten Proteinkonzentration (vgl. mit der Substratkonzentration) getroffen werden; zum anderen wird bei den chemischen Reaktionen in realistischen Messbereichen keine Sättigung beobachtet. In diesen Fällen erfolgte neben der Ermittlung

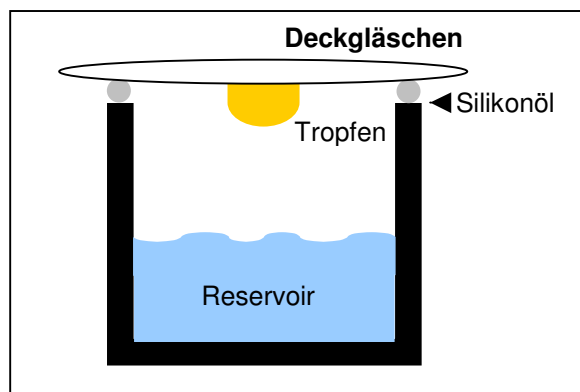
kinetischer Parameter die Berechnung einer Geschwindigkeitskonstante für eine Reaktion zweiter Ordnung nach Formel (11).

$$v = k \times [\text{Protein}] \times [\text{Reaktionspartner}] \quad (11)$$

#### 2.2.2.4 Kristallisation

Hier kam das *hanging drop*-Verfahren zur Anwendung. Das Prinzip dahinter ist, wie auch beim *sitting drop*-Verfahren, die Dampfdiffusion.

Dabei entzieht die höher konzentrierte Reservoirlösung dem Kristallisationstropfen gleichmäßig Wasserdampf und erleichtert durch vorsichtige Konzentrationssteigerung im



Tropfen das Kristallisieren. In die Vertiefungen einer Linbro Zellkulturplatte werden jeweils 800 µl Reservoirlösung pipettiert und die Proteinlösung ggf. mit Zusätzen in die Mitte des runden Deckgläschens gegeben.

Zur Abdichtung gegen Austrocknung wird der obere Rand dick mit Silikonöl bestrichen und das vorbereitete Deckgläschen umgedreht daraufgelegt (Abb. 2.3).

Abb. 2.3. Schema eines Kristallansatzes nach dem *hanging-drop*-Verfahren.

##### 2.2.2.4.1 Kristallisations-Screening

Für ein erstes Screenen auf die Kristallisationsbedingungen eines noch nicht kristallisierten Proteins werden die Lösungen des Kristallisations-Kits 1 und 2 von Hampton Research eingesetzt. Auf diese Weise können relativ schnell über 100 verschiedene Zusammensetzungen getestet werden. Das Kit ist so ausgelegt, dass unterschiedlichste Puffersysteme, Salze und pH-Werte kombiniert werden. In der Regel wird mit einer Proteinlösung von 10 mg/ml begonnen und das Reservoir aus 600 µl Puffer mit 200 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Je 2 µl Proteinlösung werden mit 2 µl Reservoirlösung vermischt als Tropfen am Deckgläschen in die Platte gehängt. Die Platte wird möglichst erschütterungsfrei bei Raumtemperatur gelagert und nach frühestens 5 Tagen unter dem Binokular betrachtet. Weitere Auswertungen erfolgen Wochen bis Monate später. Ansätze, die Kristalle oder Mikrokristalle enthalten, verfolgt man weiter.

##### 2.2.2.4.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Je nach Ausbeute variiert im zweiten Durchgang die Konzentration von Puffer oder Protein, die Zusammensetzung des Puffers, das Tropfenvolumen oder die Temperatur. Dabei können unterschiedliche Ziele verfolgt werden. Bleiben nahezu alle Tropfen für Monate klar, erhöht man die Pufferkonzentration im Reservoir, während einem Ausfallen eines Großteils der Ansätze mit Konzentrationserniedrigung von Puffer und Proteinlösung begegnet wird. Außerdem kann die Kristallisation bei Raumtemperatur, 4°C oder 37°C versucht werden.



Ansätze, die im ersten Durchgang leichtes Kristallwachstum zeigten, werden wiederholt und den Tropfen je 1 µl der unterschiedlichen Zusätze des Additive Screen 2 (Hampton Research) beigemischt. Hierdurch ergibt sich eine zusätzliche Variation der Bedingungen. Darüber hinaus wurde hier der Screen MembFac desselben Herstellers verwendet.

## **2.2.3 Anzucht von *Plasmodium falciparum***

### **2.2.3.1 Kultivierung**

Die Kultivierung der Blutstadien von *Plasmodium falciparum* orientiert sich an der Methode von Trager und Jensen (1976). Durch Nutzung eines Inkubators, welcher eine Regelung von Luftfeuchte, O<sub>2</sub>-, und CO<sub>2</sub>-Gehalt erlaubt, kann die Methode jedoch vereinfacht werden. Eine Kultur von infizierten Erythrozyten wird dabei mit serumhaltigem Medium (hier: Gibco RPMI 1640 mit versch. Zusätzen) und Erythrozyten der Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv (hier: Blutspendedienst Bayr. Rotes Kreuz), verdünnt und bei 37°C mit 3% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte inkubiert. Idealerweise sollte der Hämatokrit zwischen 1-2% und die Parasitämie nicht über 5% liegen. Je nach Anforderungen ist jedoch eine Parasitämie bis 10% vertretbar. Das Medium wird täglich gewechselt, um die Pufferkapazität nicht zu erschöpfen und dem hohen Bedarf der Parasiten an Glucose gerecht zu werden. Der Zyklus des hier verwendeten Stammes (K1) ist nach 48 h abgeschlossen. Zur Überwachung der Parasitämie werden die auch in der Diagnostik standardmäßig durchgeführten Blutausstriche herangezogen. Dazu werden ca. 0.5 ml der gut gemischten Kultur abgenommen, zentrifugiert, 4 µl hiervon auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Dieser Ausstrich wird luftgetrocknet, 10-20 sec in Methanol fixiert und nach weiterem Trocknen für 2-5 min in Giemsa-Lösung gefärbt. Nach Abwaschen der überschüssigen Farbe wird der getrocknete Ausstrich unter dem Mikroskop betrachtet und infizierte sowie uninfizierte Zellen ausgezählt. Wird im Ringstadium eine Parasitämie von >1-2% ermittelt, wird die Kultur aufgrund der Antizipation einer 4fachen Steigerung in den folgenden 24 h gesplittet.

### **2.2.3.2 Synchronisation der Kulturen**

Soll auf Ringstadien synchronisiert werden, erfolgt dies mittels Sorbitol-Lyse der späten Trophozoiten und Schizonten. In uninfizierte Erythrozyten bzw. solche mit Ringstadien kann Sorbitol aufgrund der noch intakten Membran nicht eindringen.

Eine Kultur mit mindestens 5% Ringen wird abzentrifugiert (10 min, 1000 rpm, ohne Bremse) und das weiche Pellet in zehnfachem Volumen 5%iger, steriler Sorbitollösung (in H<sub>2</sub>O) aufgenommen. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird für 4 min (1000 rpm, ohne Bremse) abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird mit vorgewärmtem Medium ohne weitere Erythrozytenzugabe versetzt und in neuer Kulturflasche in den Inkubator gestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Thioredoxine und Thioredoxin-ähnliche Proteine aus Pf

Nach heutigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass alle Organismen mehrere Thioredoxin-Proteine besitzen (Jacquot *et al.*, 2002). Für *Plasmodium falciparum* war bislang nur ein Trx bekannt (Kanzok *et al.*, 2001). Die Sequenzierung des Pf-Genoms (Gardner *et al.*, 2002) erleichterte die Suche nach weiteren Vertretern. Über BLASTs (Basic Local Alignment Search Tools) der bis dahin bekannten Teile des *Plasmodium falciparum*-Genoms in der Plasmodium-Datenbank PlasmoDB wurden verschiedene Trx-ähnliche Sequenzen identifiziert, deren Klonierung, Expression und vorläufige Charakterisierung im Folgenden beschrieben werden.

#### 3.1.1 Thioredoxin-like protein1 (Tlp1)

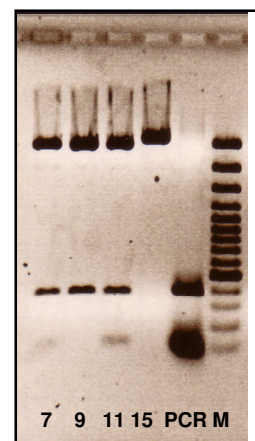
##### 3.1.1.1 Klonierung

Auf Chromosom 14, welches auch das Trx1-Gen beinhaltet, wurde ein weiterer *open reading frame* (orf) mit dem Thioredoxin-*active site*-Motiv WCGPC entdeckt. Ein potentielles Start- und ein Stopcodon, die den orf begrenzen, waren vorhanden. Für Beginn und Ende der 121 AS umfassenden Sequenz wurden unmodifizierte Oligonukleotide (OpfDynv und OpfDynh) entworfen und für eine PCR mit den vorhandenen cDNA-Banken verwendet. Der PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas) wurde pipettiert wie in Methoden beschrieben. Die Anlagerungstemperatur für die Primer betrug 60°C; das ansonsten standardmäßige Temperatur-Zeit-Programm wurde 34x wiederholt. Das mit gII als Template erhaltene Produkt hatte in etwa die erwartete Größe (363 bp). Das gereinigte PCR-Produkt ebenso wie pSKII+-Vektor wurden mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut, mit Hilfe des Ready-to-go<sup>TM</sup>-Kit ligiert und zu XL1Blue-Zellen transformiert wie beschrieben.

**Abb. 3.1. Vergleich der amplifizierten Tlp1-Sequenz mit verdauten pSK-Klonen.**

Probenvorbereitung und –auftrag auf ein 1%iges Agarosegel erfolgten wie gewohnt. Markerbanden von oben nach unten: 3000, 2000, 1500, 1031, 900-100 bp in 100 bp-Schritten.

Nach Überprüfung des pSK-Klons 9 durch Restriktion (Abb. 3.1) und Sequenzieren wurde die Tlp1-Sequenz ausgeschnitten und mit Hilfe eines präparativen Agarosegels von der Vektorsequenz separiert. Anschließend erfolgte die standardmäßige Klonierung in pQE30-Vektor (Ready-to-go<sup>TM</sup>-Ligationskit, XL1Blue-Zellen). Erhaltene Klone wurden durch Restriktionsverdau getestet und ein korrektes Plasmid zur Überexpression in M15-Zellen umtransformiert. Die zu exprimierende Aminosäuresequenz von Tlp1 ist im Anhang wiedergegeben (Abb. A1).



Laut Vorhersage des Programms „Plasmo-AP“ handelt es sich bei Tlp1 nicht um ein mögliches Apicoplast-Protein (nur 2 von 5 Kriterien erfüllt); das Vorhersageprogramm SignalP findet auch kein mögliches Signalpeptid.

### 3.1.1.2 Überexpression und Reinigung

Die Überexpression erfolgte wie unter Methoden beschrieben in M15-Zellen. Die zur Kontrolle stündlich genommenen 1 ml-Pellets zeigten die erfolgte Expression jedoch nicht.

Die Gewinnung des Rohextraktes und Aufgabe auf eine vorbereitete Ni-NTA-Agarose-Säule wurden standardmäßig durchgeführt. Nach einem Waschschrift von 2 SV US-Puffer wurde mit 3 SV 30, 50, 75, 100, 150 und 200 mM Imidazol in US-Puffer eluiert. Varianten ohne den 30 mM Imidazol-Schritt resultierten in geringerer Sauberkeit. Möglich war jedoch die Einsparung des Waschschriftes mit US-Puffer.

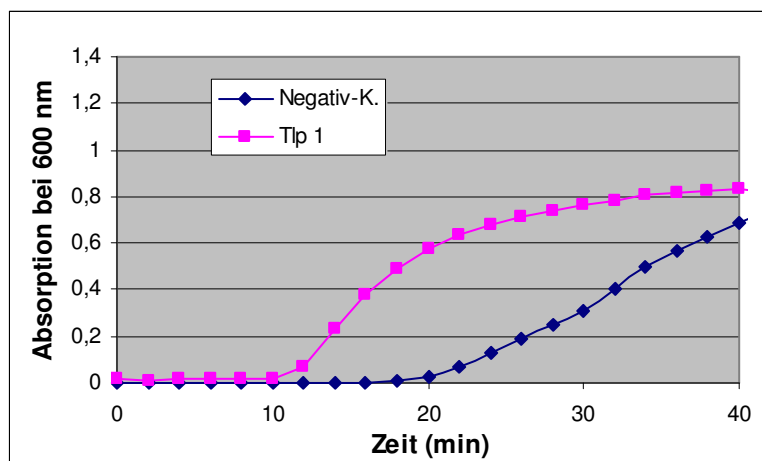
Das Reinigungsprofil im SDS-Gel zeigte eine eindeutige, saubere Bande mit 75 mM Imidazol entsprechend der berechneten Größe (15.69 kDa;  $\epsilon_{280\text{ ox}} = 15.25\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die Ausbeute aus 1 l Kulturvolumen belief sich auf 5.2 bis 9 mg. Trotz großzügiger Bemessung des Säulenvolumens befand sich im Durchlauf eine Bande auf derselben Höhe, von der noch nicht gesagt werden kann, ob es sich ebenfalls um Tlp1 handelt. Möglicherweise ist die Bindungsfähigkeit durch inkorrekte Faltung des Proteins herabgesetzt, denn auch das gereinigte Tlp1 zeigte Instabilität: Spätestens nach Aufkonzentrierung der Tlp1-haltigen Fraktionen durch Ultrazentrifugation präzipitierte das Protein.

Da festgestellt wurde, dass BSA stabilisierend auf Tlp1 wirkt, wurde nach folgenden Reinigungen der Proteinlösung 0.5 mg/ml BSA zugesetzt. Die Tlp1-Konzentration wurde daher entweder vor BSA-Zugabe bestimmt oder gegen die entsprechende BSA-Konzentration gemessen.

### 3.1.1.3 Biochemische Untersuchungen mit Tlp1

#### Insulin-Assay

Der Insulin-Assay wurde mit 20  $\mu\text{M}$  Tlp1 durchgeführt wie beschrieben und war, verglichen mit der Negativkontrolle, deutlich positiv. Tlp1 besitzt demnach Redoxaktivität.



**Abb. 3.2. Verhalten von Tlp1 im Insulin-Assay.**

Die Negativkontrolle enthielt 1 mM DTT im Insulin-haltigen Puffer, die Probe beinhaltete zusätzlich 20  $\mu\text{M}$  Tlp1. Bei 600 nm wurde die Trübung bedingt durch den Ausfall des reduzierten Insulin gemessen.

### Trx-Assay

Der Trx-Assay wurde durchgeführt wie in Methoden beschrieben, wobei 14 mU/ml PfTrxR eingesetzt wurden. Die Messung der Absorption bei 340 nm zeigte keine Veränderung im Zeitverlauf – Tlp1, das in Konzentrationen bis 30  $\mu\text{M}$  getestet wurde, wird durch PfTrxR nicht reduziert. Auch unter Verwendung der hTrxR, die PfTrx1 effektiver reduziert als das plasmodiale Enzym, wurde keine Reduktion beobachtet.

### Reduktion durch PfGR

Durch Zugabe von 65 mU/ml PfGR zu 30  $\mu\text{M}$  Tlp1 und 100  $\mu\text{M}$  NADPH in GR-Puffer (400  $\mu\text{M}$  Endvolumen) wurde getestet, ob Tlp1 ein Substrat für PfGR ist. Es wurde keine deutliche NADPH-Abnahme gemessen.

### Reduktion durch GSH

In GR-Puffer und einem Endvolumen von 400  $\mu\text{l}$  wurden 30  $\mu\text{M}$  Tlp1, 100  $\mu\text{M}$  NADPH und 2 mM GSH 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1.3 U/ml PfGR zugegeben und der Absorptionsverlauf bei 340 nm verfolgt, um einen möglichen GSH-Verbrauch durch die Reduktion des Tlp1 festzustellen. Dieser hatte jedoch nicht stattgefunden. Auch bei der Verwendung von 10 mM GSH war gegenüber der Kontrolle ohne Tlp1 kein erhöhter NADPH-Verbrauch zu erkennen.

### Reduktion durch PfGrx

Um zu testen, ob Tlp1 durch PfGrx reduziert wird, wurde wiederum in GR-Puffer 30  $\mu\text{M}$  Tlp1 mit 100  $\mu\text{M}$  NADPH, 1 mM GSH und 0.4  $\mu\text{M}$  Grx gemischt und der Assay bei 340 nm mit 0.65 U/ml PfGR gestartet. Es war keine Reaktion erkennbar.

### Aktivierung der PfTrxR im DTNB-Assay

In TrxR-Puffer wurden 30  $\mu\text{M}$  Tlp1, 3 mM DTNB und 10 mU/ml PfTrxR pipettiert, mit 100  $\mu\text{M}$  NADPH gestartet und, wie im Standard-DTNB-Assay, die Absorptionzunahme bei 412 nm gemessen. Abzüglich der Aktivität, die parallel ohne Tlp1 gemessen wurde, ergab sich eine deutliche Steigerung der TrxR-katalysierten DTNB-Reduktion. Die Aktivierung ist von der Tlp1-Konzentration abhängig (Steigerung durch 30  $\mu\text{M}$  0.131  $\text{min}^{-1}$ ; Steigerung durch 15  $\mu\text{M}$  0.083  $\text{min}^{-1}$ ), wenn auch keine klare Linearität gegeben war. Mit Hilfe einer Kontrolle mit Tlp1 ohne BSA wurde ausgeschlossen, dass die Steigerung der DTNB-Reduktion durch BSA verursacht wurde.

### Aktivierung der PfTrxR im Trx-Assay

In 400  $\mu\text{l}$  Endvolumen und TrxR-Puffer wurde ein Trx-Assay (20  $\mu\text{M}$  Trx1, 10 mU/ml PfTrxR und 100  $\mu\text{M}$  NADPH) pipettiert, wobei mit NADPH gestartet wurde. In der Probe waren zusätzlich 30  $\mu\text{M}$  Tlp1 enthalten. In diesem Assay wurde bei 340 nm kein Unterschied der Aktivitäten von Kontrolle und Probe festgestellt. Es erfolgt in diesem Assay somit keine Aktivierung der PfTrxR durch Tlp1. In der Literatur ist mit Trx-ähnlichen Proteinen die Untersuchung zu finden, ob diese eine kompetitive Hemmung der Reduktion des eigentlichen Trx durch die TrxR bewirken (Sadek *et al.*, 2003). Die Verdeckung einer Inhibition durch BSA-abhängige Stabilisierung wurde durch Reproduktion des Versuchs mit Tlp1 ohne BSA-Zugabe ausgeschlossen. Dass die PfTrxR durch Tlp1 gegenüber DTNB aktiviert wird, gegenüber Trx1 jedoch nicht, könnte daraufhin deuten, dass doch eine Kompetition vorliegt. Um dies genau sagen zu können, sind jedoch Messungen der Konzentrationsabhängigkeit erforderlich.

### Reduktion von DHA

1 mg Tlp1 (64  $\mu$ M; + 0.5 mg/ml BSA) wurden mit 2 mM DTT 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend um Faktor 4 mit US-Puffer verdünnt, um die Kompatibilität des Ni-NTA-Agarose-Materials mit DTT nicht zu überschreiten und auf eine mit US-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 5 SV US-Puffer und die Elution des reduzierten Tlp1 mit einer Imidazol-Konzentration von 200 mM. Die proteinhaltigsten der aufgefangenen 100  $\mu$ l-Fractionen wurden gepoolt.

DHA wurde *ad* 10 mM in US-Puffer gelöst und 400  $\mu$ l-Assays mit äquimolaren Konzentrationen Tlp1 und DHA (200  $\mu$ M) vorbereitet (für die Kontrolle wurde anstatt Tlp1 lediglich dieselbe Menge 200 mM Imidazol verwendet). Bei 265 nm wurde die Entstehung von Ascorbat verfolgt, die jedoch nicht stattfand.

## **3.1.2 *Thioredoxin-like protein2* (Tlp2)**

### **3.1.2.1 Klonierungen**

Auf einem Contig von Chromosom 9 wurden einige Bruchstücke mit Ähnlichkeit zu PfTrx1 gefunden, von denen eines die modifizierte *active site* WCAPC beinhaltet. Die Fragmente wurden zusammengefügt, erneut geblastet, und unter Berücksichtigung möglicher Start- und Stopcodons wurden Oligonukleotidprimer abgeleitet.

Unter Verwendung des Primers OPfTrx9v1 waren Kombinationen mit verschiedenen reverse-Primern (OPfTrx9h1; OPfTrx9h2) und cDNA-Banken erfolgreich. Dem PCR-Ansatz wurde zur Erleichterung der Anlagerung der Oligonukleotide MgCl<sub>2</sub> *ad* 2.5 mM zugesetzt und im PCR-Programm (Annealing-Temperatur = 60°C) wurden 15 Zyklen mit dem reverse-Primer durchgeführt, bevor für weitere 25 Zyklen der forward-Primer zugefügt wurde.

Die PCR für das längere Fragment wurde daraufhin mit neuen Oligonukleotiden (OPfTrx9v1B und OPfTrx9h1H) wiederholt und das Produkt wie beschrieben über *Bam*HI und *Hind*III in den Vektor pSKII+ kloniert. Der dem Kontrollverdau nach richtige Klon enthielt einen orf einschließlich der mutmaßlichen *active site*. Das zunächst vermutete Startcodon befand sich jedoch nicht in diesem Leserahmen. Daher wurden drei andere mögliche Translationsstarts upstream ermittelt, entsprechende Primer generiert (OPf9vA, B und C) und mit Primer A ein Produkt erhalten. Da die Verlängerung durch den neuen Primer in etwa der genomischen Sequenz entsprach (366 bp), war zu vermuten, dass es sich bei dem erweiterten N-Term um 5'-UTR handelt. Dies wurde durch Sequenzierung des PCR-Produktes bestätigt.

Der tatsächliche Translationsstart war demnach weiter downstream des anfänglich vermuteten Starts zu suchen. Das erste in Frage kommende Methionin wurde im Folgenden als Start-Aminosäure angenommen und mit Hilfe eines entsprechenden Primers (OPfTrx9vDB) und des vorhandenen pSK-Plasmids als Template die Sequenz amplifiziert (65°C Annealing-Temperatur). Die Klonierung erfolgte erneut über *Bam*HI und *Hind*III zunächst in pSKII+ und daraus in pQE30 wie beschrieben.

Da sich in der Sequenz ein Aminosäureaustausch an Position 121 befindet (D statt vorhergesagtem A) wurden PCR und Klonierung mit erneut synthetisiertem Primer wiederholt, es ergab sich jedoch wieder genannter Austausch.

Die genomische Sequenz mit farbiger Unterlegung der verschiedenen Primer ist in Abb. A2 dargestellt. Auffallend sind in dieser Sequenz die extrem kurzen Exons 3 (IE) und 4 (K). Die hier angenommene Sequenz des Tlp2 entspricht in PlasmoDB der Vorhersage des Programms FullPhat (chr9.phat\_260). Die Annotationen (CAD51936 in NCBI bzw. Pfi1250w in PlasmoDB) sind leicht abweichend. Für die annotierte Sequenz indizieren Array-Daten, dass das entsprechende Gen tatsächlich transkribiert wird (PlasmoDB: Array element PFI1250w from Scripps/GNF malaria array (scrmalaria)). Für die Sequenz PFI1250w existieren darüber hinaus Massenspektrometrie-Daten, die für die Translation eines korrespondierenden Proteins sprechen. Da die Sequenzabdeckung lediglich 19.7% beträgt, widersprechen die Daten nicht der hier identifizierten Sequenz.

Die hier als richtig vermutete Sequenz von Tlp2 besitzt wahrscheinlich kein sekretorisches Signalpeptid („TargetP“ score = 0.25 unter Verwendung von „Non-Plant Networks“; 0.5 mit „Plant Networks“).

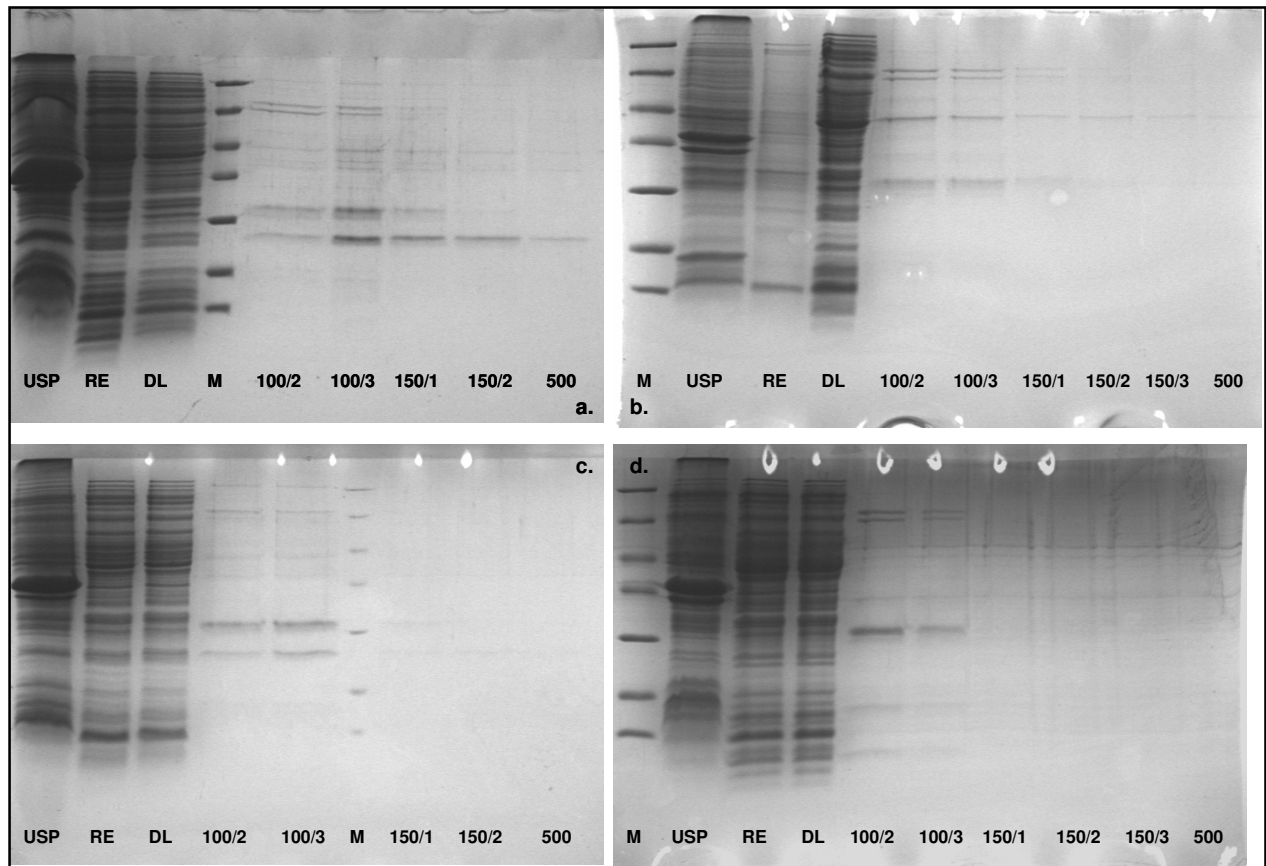
Im Zusammenhang mit den Schwierigkeiten bei der Überexpression (folgende Abschnitte) wurde die Umklonierung in pRSetA vorgenommen. Dieser Vektor besitzt neben Ampicillin-Resistenz und dem N-terminalen 6xHis-tag den T7-Promotor und verspricht daher einen besonders hohen Expressionsgrad. Der T7-Promotor war zudem für die *in vitro*-Translation erforderlich (Abschnitt 3.1.2.3). Die Tlp2-Sequenz wurde dazu aus dem entsprechenden pQE-Plasmid in einem Standard-Verdau mit *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten, wobei zusätzlich *Nco*I (schneidet pQE30 an Position 860) verwendet wurde, um die Religation dieses Vektors zu vermindern. Die Ligation mit dem *Bam*HI- und *Hind*III-verdauten pRSetA und die Transformation zu XL1Blue-Zellen erfolgten standardmäßig, das richtige Plasmid wurde wie gewohnt identifiziert. Die Klonierung als MBP-Fusion ist im entsprechenden Abschnitt erläutert.

### 3.1.2.2 Überexpression

Die Überexpression der Tlp2-Sequenz im Vektor pQE30 wurde in verschiedenen Zellen (M15, XL1Blue, Novablue, BL21 und SG13009) getestet. Der Stamm SG13009 wird bei schlechter Ausbeute in M15 von Qiagen empfohlen. Bei der Verwendung von M15-Zellen wurden zudem verschiedene Varianten (0.4% Glucose / Rig-Plasmid / 3 h ÜE) probiert. Die Verfahrensweise war wie beschrieben; die Zugabe von Antibiotika erfolgte den verwendeten Zellen bzw. Plasmiden entsprechend. Teilweise wurde der zur Expression verwendete Klon parallel auf die Existenz und Richtigkeit des Plasmids überprüft. Es zeigten jedoch weder die Pellets zur Expressionskontrolle noch anschließende Aufreinigungen (nativ / denaturierend) das zu exprimierende Protein (berechnet 16.1 kDa,  $\epsilon_{280\text{ ox}} = 12.45\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Weitere Versuche konzentrierten sich auf die Expression mittels des Vektors pRSetA. In diesem Plasmid wurde zum einen die unter 3.1.2.3 geschilderte *in vitro*-Translation vorgenommen. Parallel wurde die Überexpression *in vivo* in den Zellen C41 und C43 getestet.

Obwohl die Expressionskontrollen auch hier nicht auf einen Erfolg hindeuteten, konnten geringe Mengen Protein über Ni-NTA-Agarose gereinigt werden. Die Größe im SDS-Gel (ca. 23 kDa) ist jedoch etwas von der berechneten (18.8 kDa bei Expression in pRSetA)

abweichend. Um sicherzustellen, dass es sich dabei nicht um ein Protein der C41-/C43-Zellen handelte, erfolgten daher parallel Expressionen und Reinigungen mit leerem pRSetA. Diese ließen erkennen, dass die erwähnte Bande für die Verwendung des Tlp2-haltigen Plasmids spezifisch war.

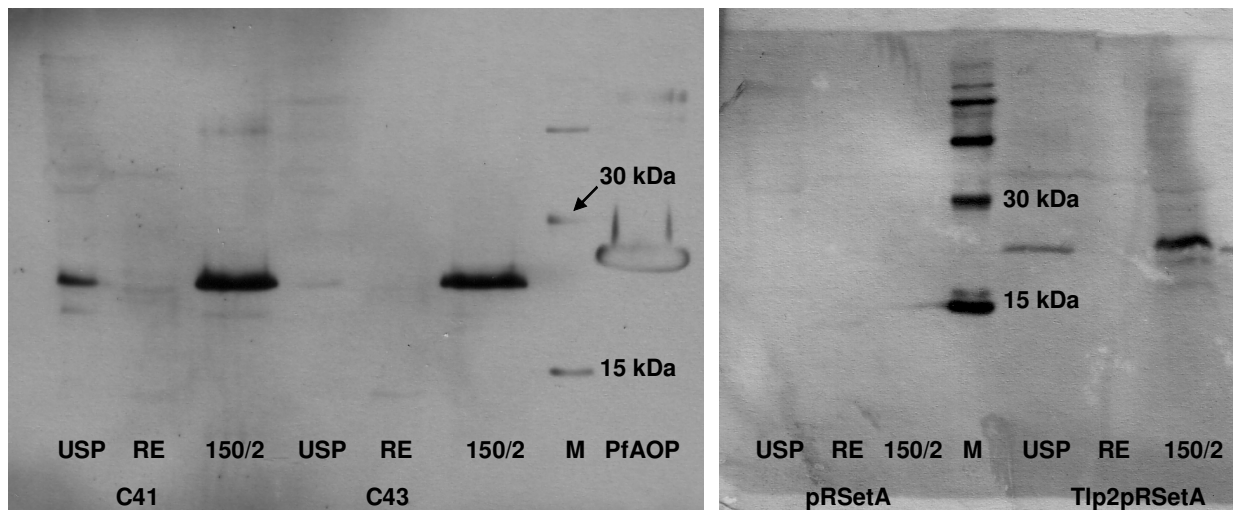


**Abb. 3.3. Reinigungsprofile von Tlp2pRSetA in C41 und C43 und entsprechender Expressionskontrollen mit leerem pRSet A.**

a: Tlp2pRSetA in C41. b: pRSetA leer in C41. c: Tlp2pRSetA in C43. d: pRSetA leer in C43. Dargestellt ist das Verhalten in 15%iger SDS-PAGE bei Vorbereitung und Verwendung der Proben wie beschrieben. Größen der Markerproteine: 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 und 14.4 kDa.

Darüber hinaus wurden Ultraschallpellet, Rohextrakt und Elutionsfraktionen mittels Western Blot untersucht.

Die Blots (Abb. 3.4) bestätigen zusätzlich die Identität des Tlp2, da es spezifisch mit dem verwendeten Anti-His-Antikörper reagiert, während eine solche Interaktion mit den C41-spezifischen Proteinen nicht stattfindet. Nicht erklärbar ist die fehlende Reaktion mit dem Rohextrakt. An der Reaktion des USP wird einmal mehr die schlechte Löslichkeit des Tlp2 deutlich, die auch in der *in vitro*-Translation gezeigt wurde.



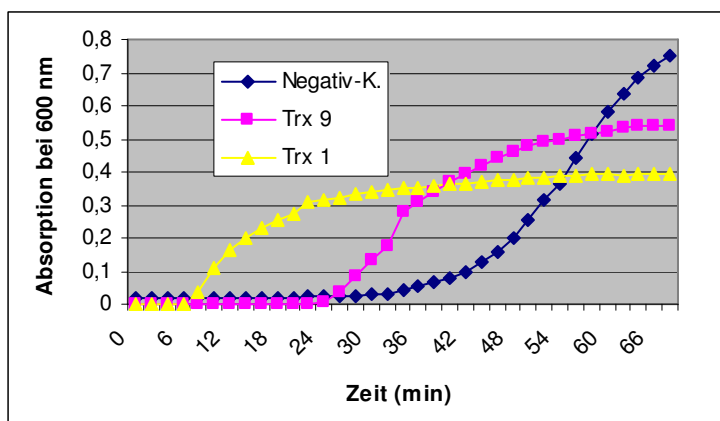
**Abb. 3.4.** Western Blot verschiedener Reinigungsfraktionen von Tlp2pRSetA in C41 bzw. C43 (links) und von leerem pRSetA vgl. mit Tlp2pRSetA in C41 (rechts).

Für den linken Blot wurde eine Pipettenspitze USP bzw. 10  $\mu$ l RE bzw. 10  $\mu$ l Elutionsfraktion 150/2 mit 20  $\mu$ l 1xSB gemischt und vorbereitet wie gewohnt. Von USP und RE wurden 10  $\mu$ l, von 150/2 25  $\mu$ l auf das SDS-Gel aufgetragen. Für den rechten Blot wurden jeweils 10  $\mu$ l der vorbereiteten Gemische (Spitze USP+50  $\mu$ l 1xSB bzw. 10  $\mu$ l RE / 100/3 / 150/1 + 20  $\mu$ l 1xSB) eingesetzt. Blot, Absättigung und Färbung wurden durchgeführt wie beschrieben. Markergrößen von oben nach unten: 100, 75, 50, 30 und 15 kDa; links nur 50–15 kDa sichtbar.

Die erneute Aufarbeitung und Reinigung des USP in Anwesenheit von 2% Triton X-100 resultierte in einer weiteren Extraktion von Tlp2. Die Anwendung von Triton zu Beginn der Reinigung führte allerdings nicht zur Steigerung der gereinigten Proteinmenge. Die Reinigung bedarf somit noch der Optimierung.

Bezüglich der Überexpression in pRSetA und C41-Zellen wurden weitere Tests durchgeführt. Von den erprobten Expressionsvarianten (+ Rig-Plasmid / + 0.5% Glucose / Induktion mit 0.3 mM IPTG / Inkubation bei RT / Induktion bei OD 0.4 vs. Induktion bei OD 0.7) waren die Induktion mit 0.3 mM IPTG und die Inkubation bei RT Erfolg versprechend. Auch dies bedarf der Bestätigung.

### Insulin-Assay



**Abb. 3.5.** Insulin-Assay mit Tlp2.

Ausgehend von der Beschreibung des Assays unter 2.2.2.3.2 wurde lediglich die Probe leicht modifiziert: Die benötigte Insulin-Menge wurde direkt in der Tlp2-Lösung (20  $\mu$ M) gelöst. Die Positivkontrolle enthielt 2  $\mu$ M Trx1.

Mit einer geringen verfügbaren Menge Tlp2, exprimiert in pRSetA, wurde der Insulin-Assay durchgeführt. Für die Probe wurde

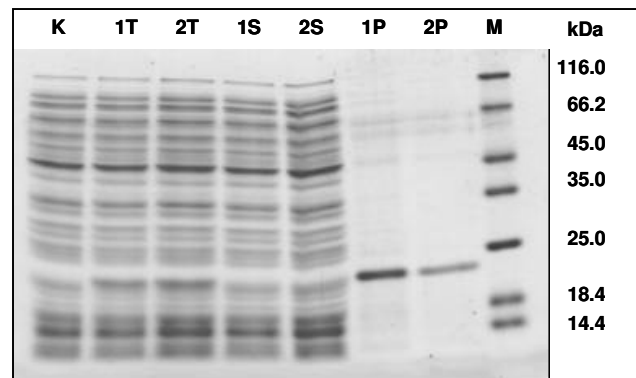
das für 20  $\mu$ M Tlp2-Endkonzentration notwendige Volumen Tlp2-Lösung mit Insulin-Assaypuffer (ohne Insulin) ad 400  $\mu$ l gemischt und Insulin ad 0.17 mM darin gelöst. Für die Kontrollen wurde ausschließlich Insulin-Assaypuffer (+ Insulin) verwendet. Als Positivkontrolle dienten 2  $\mu$ M Trx1. Wie in Abb. 3.5 dargestellt, zeigt Tlp2 zwar geringere Aktivität als Trx1, im Vergleich zur Negativkontrolle ist das Ergebnis aber deutlich positiv.



### 3.1.2.3 *In vitro*-Translation

Die Herstellung eines Proteins in einem zellfreien Expressionssystem wird als *in vitro*-Translation bezeichnet. Sie findet Anwendung, wenn die *in vivo*-Produktion aufgrund von Toxizität, Unlöslichkeit oder schnellem proteolytischen Abbau des zu exprimierenden Proteins erschwert ist. Es werden herkömmlicherweise Extrakte von Kaninchen-Retikulozyten, Weizenkeimen oder *E. coli* verwendet, denen zur Erhöhung der Ausbeute Aminosäuren, Energiequellen bzw. -regenerationssysteme, Cofaktoren etc. zugesetzt werden. Für die *in vitro*-T. im engeren Sinne wird RNA als Ausgangsmaterial verwendet; häufig kommen jedoch sogenannte gekoppelte Systeme zum Einsatz, bei denen der Translation eine *in vitro*-Transkription vorangestellt wird und somit DNA das Ausgangsmaterial darstellt. Während bei der *Coupled* Transkription-Translation, die mit *E. coli*-Extrakt vorgenommen wird, typischerweise beide Prozesse simultan ablaufen können, läuft die *Linked* Transkription-Translation mit eukaryotischen Systemen in zwei Stufen ab. Weiterentwickelte zellfreie Systeme gehen in einem *continuous flow* oder *continuous exchange* vor sich, was bedeutet, dass (Abfall-)Produkte ständig entfernt und Supplemente ergänzt werden.

Die Arbeitsgruppe von Dr. Frank Bernhard (Institut für Biophysikalische Chemie, Universität FfM) führte (parallel zu den *in vivo*-Expressionsversuchen) freundlicherweise eine *Coupled in vitro*-Transkription-Translation mit dem Plasmid Tlp2pRSetA durch, wobei ein *continuous exchange*-System mit *E. coli* S30-Extrakt verwendet wurde. Eine Überexpression des Tlp2 war damit möglich, jedoch befand sich das Protein im Pellet.



**Abb. 3.6. Ergebnis der *in vitro*-Translation des Tlp2.**

Das Plasmid Tlp2pRSetA wurde als Ausgangsmaterial zur *in vitro*-Translation in einem *continuous exchange*-System mit *E. coli* S30-Extrakt verwendet. Der Prozess wurde in der Arbeitsgruppe Dr. F. Bernhard, Universität FfM durchgeführt. M: 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14 kDa (von oben nach unten). K: Kontrolleextrakt ohne Expression; T: Gesamtprotein nach 24 h Expression (2 Ansätze); S: Lösliches Protein nach 24 h Expression (2 Ansätze); P: Unlösliches Protein nach 24 h Expression (2 Ansätze).

Angesichts des Hydrophobizitäts-Plot (Abb. 4.2) ist das Verbleiben des Tlp2 im Pellet, das sich bei der *in vivo*-Expression bereits angedeutet hatte, überraschend. Auch die Programme SOSUI und TMPred geben Tlp2 als lösliches Protein an.

### 3.1.2.4 Klonierung, Überexpression und Reinigung der MBP-Tlp2-Fusion

Aufgrund der Unlöslichkeit von Tlp2, die von den hier beschriebenen Expressions- und Reinigungsversuchen in *E. coli* indiziert und durch die *in vitro*-Translation bestätigt wurde, war das nächste Ziel die Verbesserung der Löslichkeit des Proteins.

In der Literatur ist die Erhöhung der Löslichkeit durch Fusion mit dem *maltose-binding protein* (MBP) beschrieben (Kapust und Waugh, 1999; Riggs, 2000).

Um dies für Tlp2 zu testen, wurde die Sequenz in einen entsprechenden Vektor kloniert: pBUF1b ist ein Abkömmling von pMal-c2X (New England Biolabs), bei dem unter

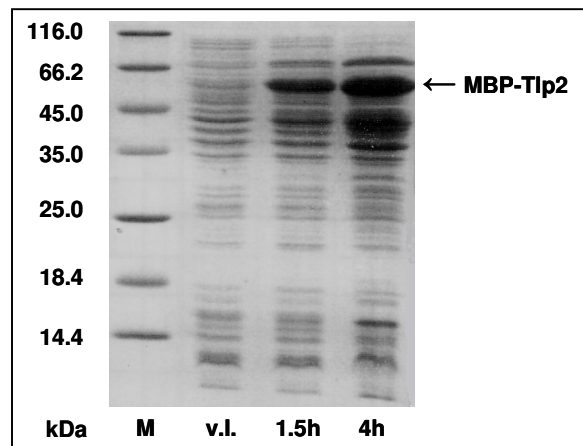
Beibehaltung des Leserahmens die Xa- durch eine TEV-*site* ersetzt wurde. Der Vektor verwendet den starken tac-Promotor zur Expression des *malE*-Gens, dessen Signalsequenz deletiert wurde, was zur cytoplasmatischen Lokalisation des (Fusions-)Proteins führt. Das gewünschte Gen wird downstream des *malE*-Gens in einen Polylinker kloniert, welcher auch die Spaltstelle für die Protease enthält. Mit Hilfe derer kann das gewünschte Protein nach der Reinigung vom MBP abgespalten werden. Außerdem sind Blau-Weiss-Test und Induzierbarkeit durch IPTG gegeben. Die TEV-Spaltstelle enthält die Aminosäurefolge ENLYFQG; die Spaltung erfolgt zwischen Q und G.

Zur Umklonierung wurde Tlp2pQE30 wie gewohnt verdaut und die Tlp2-Sequenz aus einem präparativen Agarosegel extrahiert. Mit pBUF1b wurde ebenso verfahren, da dieser Vektor, der freundlicherweise von Dr. F. Bernhard, Institut für Biophysikalische Chemie, Biozentrum, Ffm, bereitgestellt wurde, ein *Bam*HI-*Hind*III-kloniertes Insert von 400 bp Länge enthielt.

Die Ligation erfolgte mit Hilfe des Quick Ligation<sup>TM</sup>-Kit erreicht, der gemäß Herstellerangaben verwendet wurde. 4 µl des Ansatzes wurden zu XL1Blue-Zellen transformiert. Mit einem als korrekt identifizierten Klon wurde die Überexpression des Fusionsproteins wie gewohnt in M15-Zellen durchgeführt. Die Expressionskontrolle ist in Abb. 3.7 gezeigt.

**Abb. 3.7. Expressionskontrolle des Fusionsproteins MBP-Tlp2 in pBUF1b und M15.**

Die Proben wurden wie gewohnt vorbereitet und in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. v.I.: vor Induktion.

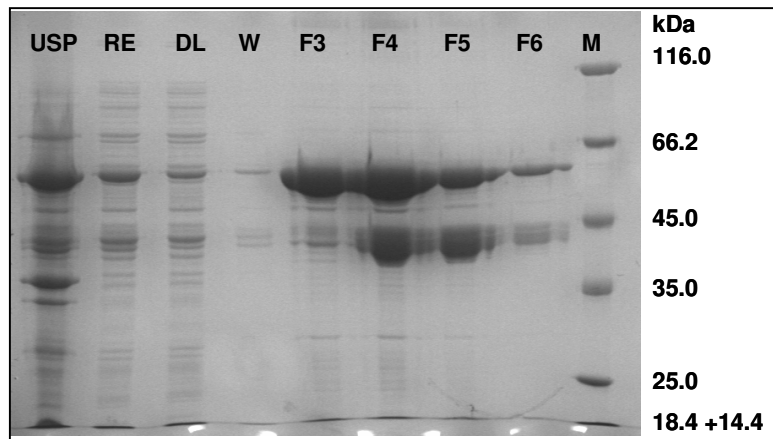


Da das Fusionsprotein laut Berechnung mittels JustBio „ProtCalc“ ein Molekulargewicht von 57.3 kDa ( $\epsilon_{280} = 78.45 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) haben sollte, war zu vermuten, dass es sich bei der markierten Bande um selbiges handelt.

Bei der Reinigung wurde weitestgehend verfahren wie von NEB empfohlen. Ein Zellpellet aus 250 ml Kulturvolumen wurde in 5 ml Amylose-Säulenpuffer resuspendiert und mit PMSF (20 µM) versehen. Die Suspension wurde 3 x in flüssigem Stickstoff gefroren und in Eiswasser aufgetaut. Anschließend wurde die Lösung 6 x 15 sec (70%) sonifiziert. Der nach einem Zentrifugationsschritt bei 9000 g für 30 min erhaltene Rohextrakt (Überstand) hatte eine Proteinkonzentration von etwa 34.4 mg/ml (nach  $A_{280}$ ). Mit dem für die Amylose-Säule empfohlenen Puffer wurde auf 5.7 mg/ml verdünnt.

Das Säulenmaterial wurde *ad* 2 ml Säulenvolumen vorbereitet und mit 8 SV Säulenpuffer äquilibriert. Mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 0.1-0.2 ml/min wurde zunächst der Rohextrakt aufgegeben, dann mit 12 SV Säulenpuffer gewaschen (hier 0.3 ml/min) und schließlich mit 4 SV 10 mM Maltose in Säulenpuffer eluiert (0.2 ml/min). Das Eluat wurde in 0.5 ml-Fractionen aufgefangen, deren Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt wurde. Die höchsten Proteingehalte wurden in den Fractionen 3-6, v. a. in Fraction 4 gemessen und anhand eines SDS-Gels bestätigt. Die Regeneration der Amylose-Säule erfolgte durch

Waschen mit 3 SV *aq. dest.*, 3 SV 0.1% SDS (letzteres zügig und bei RT), 3 SV *aq. dest.*, 3 SV Säulenpuffer.



**Abb. 3.8. Reinigungsprofil des MBP-Tlp2-Fusionsproteins über Amylose.**

Probenvorbereitung: Während Vorbereitung und Aufgabe von USP und den Fraktionen RE, DL und W erfolgte wie gewohnt, wurde von den Fraktionen 3-6 je 4  $\mu$ l in 20  $\mu$ l 1xSB resuspendiert und nach herkömmlicher Vorbereitung die komplette Probe auf das 12%ige SDS-Gel gegeben.

Da Fraktion 3 den geringsten Anteil der 45 kDa-Bande aufwies, wurde diese für die folgende TEV-Protease-Spaltung verwendet. Dazu wurden (wie für die TEV-Protease empfohlen) pipettiert:

Komponente	Menge/Konzentration
Puffer	270 $\mu$ l
Fraktion 3	25 $\mu$ l (~ 50 $\mu$ g Prot.)
DTT (0.1 M)	3 $\mu$ l ( <i>ad</i> 1 mM)
TEV-Protease	2 $\mu$ l (= 20 U)

**Tabelle 3.1. Pipettierschema des TEV-Protease-Spaltungsansatzes.**

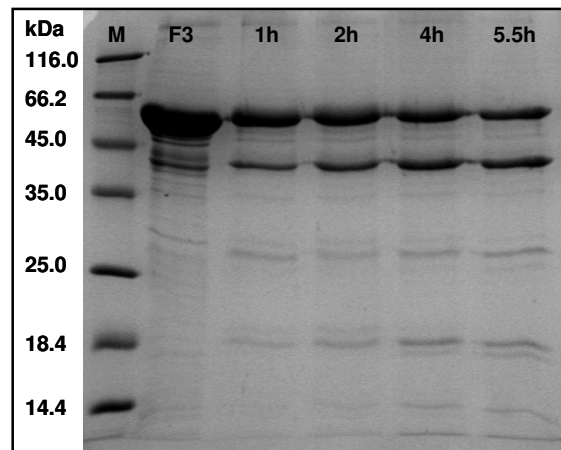
Einzig der Puffer war nicht der für die TEV-Protease empfohlene (50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 8.0), sondern es wurde der Amylose-Säulenpuffer (pH 7.4) verwendet, der aber hinsichtlich der Zusammensetzung ähnlich ist.

Da die Inkubation über Nacht schüttelnd bei 16°C (lt. Hersteller sollten bei 16°C nach 2 h 99% der Fusion gespalten sein) nur eine sehr schwache Bande in Frage kommender Größe ergeben hatte, wurde ein zweiter Ansatz bei 30°C inkubiert. Nach 1, 2, 4 und 5.5 h wurden je 20  $\mu$ l für die SDS-PAGE entnommen.

Da die Inkubation über Nacht schüttelnd bei 16°C (lt. Hersteller sollten bei 16°C nach 2 h 99% der Fusion gespalten sein) nur eine sehr schwache Bande in Frage kommender Größe ergeben hatte, wurde ein zweiter Ansatz bei 30°C inkubiert. Nach 1, 2, 4 und 5.5 h wurden je 20  $\mu$ l für die SDS-PAGE entnommen.

**Abb. 3.9. Zeitverlauf der Spaltung des Fusionsproteins MBP-Tlp2 durch TEV.**

Die nach 1, 2, 4 und 5.5 h dem Spaltungsansatz entnommenen Proben (20  $\mu$ l) wurden ebenso wie 4  $\mu$ l der ungespaltenen Fraktion 3 mit 5  $\mu$ l 4xSB versetzt, wie gewohnt vorbereitet und auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt.



Die Abnahme des MBP-Fusionsproteins ist erkennbar, ebenso die Zunahme der Fraktion darunter in Höhe <45 kDa, die vermutlich das gespaltene MBP darstellt (berechnetes Mw = 42.5 kDa). Eine Zunahme der Intensität ist auch bei den Banden in Höhe von 18 und 14 kDa zu sehen. Das Tlp2-Spaltprodukt besitzt zwar eine berechnete Größe von 14.84 kDa, Tlp2 verhielt sich jedoch in früheren Reinigungen stets größer, daher könnte es sich bei der 18 kDa-Bande um Tlp2 handeln. Die Intensität des Proteins, welches leicht über der 25 kDa-Markerbande läuft, verändert sich nicht, was vermuten lässt, dass es sich um die TEV-Protease selbst handelt (Mw = 26 kDa).

Es ist denkbar, dass die Bande bei 45 kDa in Abb. 3.7, die parallel zum Fusionsprotein zunimmt, auch bereits gespaltenes MBP ist. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass das Fusionsprotein früher von der Säule eluiert (Abb. 3.8), während MBP alleine wohl spezifischer an die Amylose bindet und erst in Fraktion 4 erscheint. Ebenfalls parallel ist in Abb. 3.7 auch die Zunahme der Bande bei ~ 16 kDa erkennbar, die Tlp2 darstellen könnte. Die mögliche Instabilität der Fusion in *E. coli* ist kongruent mit den Schwierigkeiten bei der Überexpression von Tlp2 alleine.

### 3.1.3 Thioredoxin 2 (Trx2)

#### 3.1.3.1 Klonierungen

Eine weitere Trx-ähnliche Sequenz wurde auf Chromosom 13 identifiziert. Die Sequenz nach Genefinder (chr13\_002163.gen\_4) umfasst 157 AS und setzt sich aus 4 Exons zusammen.

SignalP findet für das putative Protein ein Signalpeptid (SP; 4 von 4 Kriterien erfüllt), das bis Position 23 reicht. Von TargetP, einem anderen Programm zur Kalkulation von Signalpeptiden, wird mit einem score = 0.971 dieselbe Signalsequenz vorhergesagt. Während es sich nach Berechnung des Apicoplast-Vorhersageprogramms „PATS“ *Neural Network* um ein potentielles Apicoplast-Protein handelt (score = 0.966), ist laut Plasco-AP eine Lokalisation in dieser Organelle nicht wahrscheinlich (3 von 5 Kriterien erfüllt).

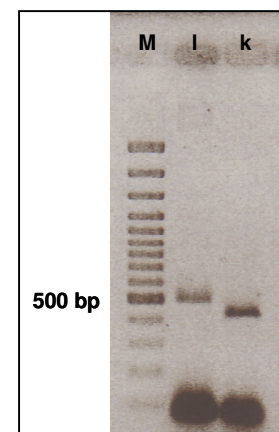
Unter Verwendung von Standard-Ansätzen mit *Taq*-DNA-Polymerase konnte sowohl die gesamte Sequenz (Trx2l; Oligonukleotide OPfTrx13/5 und OPfTrx13/3) als auch die um das mögliche SP verkürzte (Trx2k; Primer OPfTrx13/52 und OPfTrx13/3) aus den verfügbaren cDNA-Banken amplifiziert werden. Die PCR-Bedingungen waren standardmäßig; mit 50°C Annealingtemperatur wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Größen der Produkte im Agarosegel entsprachen in etwa den erwarteten (471 (einschl. Stop-Codon) bzw. 402 bp).

#### Abb. 3.10. Amplifikation der Trx2-Sequenz.

l = gesamte Sequenz; k = ohne putatives Signalpeptid. Die Durchführung des 1%igen Agarosegels erfolgte wie gewohnt.

Im nächsten Schritt wurde zwecks Klonierung die PCR mit entsprechenden Schnittend-Primern (OPfTrx13/52B, OPfTrx13/5B, OPfTrx13/3S) wiederholt. Die Produkte wurden aus dem Agarosegel extrahiert (Qiagen Gelextraktions-Kit), in Standardansätzen 2h mit *Bam*HI und *Sac*I verdaut (37°C) und in standardmäßig vorbereiteten pSKII+-Vektor kloniert (Ready-to-go<sup>TM</sup>-Ligationskit). Transformation und Identifizierung der Klone erfolgten wie beschrieben. Die Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30 wurde ebenfalls wie gewohnt durchgeführt (Ready-to-go<sup>TM</sup>-Kit).

In Anbetracht der geringen Stabilität von Trx2k und der positiven Apicoplast-Vorhersage durch PATS wurde ferner eine nochmals verkürzte Variante des Proteins (Trx2sk) kloniert. Der mögliche Start des reifen Proteins ergab sich anhand eines Alignments mit anderen Thioredoxinen.



hsTrx	-----MVKQIESKTAFQE
dmTrx	-----MVYQVKDKADLDG
pfTrx1	-----MVKIVTSQSEFDS
pfTrx2	MKKYIFFFLFSFINFFFVYDVTCTKEVTSNDPLTPLNRFDKYYLRMFKKVPRLQQNGS * . :
hsTrx	ALDAAG---DKLVVDFSATWCGPCKMIKPFHSLSEKYS-NVIFLEVDVDDCQDVASEC
dmTrx	QLTKAS---GKLVVLDFFATWCGPCKMISPKLVELSTQFADNVVVLKVDVDECEDIAMEY
pfTrx1	IISQN-----ELVIVDFFAEWCGPCKRIAPFYEECSKTYT-KMVFVKVDVDEVSEVTEKE
pfTrx2	NIINGVNMKNTVIVLYFFAKWCQACTMQSTEMDKLQKYYGKRIYLLKVDLDKNESLARKE :                   : : : * * * * . * .                   . . . : : : : * * * . . . : :
hsTrx	EVKCMPTFFQFFKKG---QKVGEFSGANKEKLEATINELV-
dmTrx	NISSMPTFVFLKNG---VKVEEFAGANAKRLEDVIKANI-
pfTrx1	NITSMPTFKVYKNG---SSVDTLLGANDSALKQLIEIYAA
pfTrx2	SVKSLPTIILLKNKTMLARKDHFVSSND--LIALIKKHL- . . . . : * * : . * :                   : . : * * * :

**Abb. 3.11. Alignment der Trx2-Sequenz mit anderen Thioredoxinsequenzen.**

hs: *homo sapiens*; dm: *Drosophila melanogaster*. Rot: putatives SP. Grün: putatives Apicoplast-Transitpeptid. Gelb: übereinstimmende *active site*-Reste.

Mit den Primern OPfTrx13skB und OPfTrx13/3S wurde ein Standard-PCR-Ansatz (*Taq*-Polymerase) präpariert und die Sequenz von Trx2sk basierend auf dem Trx2k-haltigen pQE-Plasmid amplifiziert. Die Annealingtemperatur betrug 61°C; es wurden 35 Zyklen gefahren und alle anderen Bedingungen standardmäßig gewählt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend wie gewohnt mit *Bam*HI und *Sac*I für 2 h bei 37°C verdaut; parallel dazu wurde pQE30-Vektor standardmäßig genauso vorbereitet. Nach Reinigung der Restriktionsansätze wurde ligiert und zu XL1Blue-Zellen transformiert wie gewohnt.

### 3.1.3.2 Überexpression und Reinigung von Trx2k; biochemische Interaktionen

Nachdem die gesamte Proteinsequenz sich nicht heterolog hatte exprimieren lassen, war die Expression der einfach verkürzten Variante erfolgreich (Bedingungen wie beschrieben), ebenso die Reinigung über Ni-NTA-Agarose: Das Protein eluierte nahezu sauber bei 50 und 75 mM Imidazol. Das Elutionsprofil umfasste nach RE-Aufgabe 2 SV US-Puffer, 2 SV 10 mM Imidazol, 1 SV 20 mM Imidazol und je 2 SV 30, 50, 75, 100 und 150 mM Imidazol (jeweils in US-Puffer). Die Größe im SDS-Gel stimmte überein mit der berechneten von 17.08 kDa ( $\epsilon_{280 \text{ ox}} = 13.61 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die Ausbeute war mit 7-17 mg aus 250 ml Kulturvolumen recht hoch. Dies mag ein Grund für die Instabilität des Proteins sein, die sich schon beim Einengen zeigte. Die Zugabe von BSA (*ad* 0.25 mg/ml) konnte die Präzipitation verringern; Umpuffern nach 500 mM NaCl, 5 mM DTE, 1 mM EDTA, 50 mM Natriumphosphat hatte keinen Effekt.

Problematisch war auch die Konzentrationsbestimmung über den Trx-Endpunkt-Assay: Es zeigte sich zwar Aktivität, jedoch war diese nicht so stark, dass das Protein komplett reduziert worden wäre. In Anbetracht der Instabilität könnte die schwache Aktivität aus einer Missfaltung des Proteins resultieren. Denkbar ist jedoch auch, dass die bekannte PfTrxR nicht das physiologisch bedeutende Enzym zur Reduktion ist oder die Anwesenheit des möglichen Transitpeptides störend wirkt.

Zur Verbesserung der Aktivität wurden verschiedene Puffer getestet: Nachdem sich in einem Vergleich von US-, GR- und GST-Puffer als Assay-Puffer der GST-Puffer (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 6.5) als der Beste erwiesen hatte, wurde hierin noch die Salzkonzentration variiert (50 – 300 mM KCl). In Anwesenheit von 200 mM KCl zeigte sich die höchste Absorptionsabnahme. Der Zusatz von 1% Tween bzw. Triton X-100 hatte keinen förderlichen Effekt. Im Vergleich verschiedener pH-Werte zeigte sich bei pH 8.6 die höchste Aktivität; zugunsten der TrxR wurde jedoch in folgenden Messungen pH 8.0 eingestellt.

Wie PfTrx1 so wird auch Trx2k von der humanen TrxR besser reduziert als von der plasmodialen. Der  $K_M$ -Wert, der aufgrund der Präzipitation des Trx2k noch nicht genau bestimmt werden konnte, kann im Bereich von 0.5-1 mM angenommen werden. Der  $K_M$  am humanen Enzym liegt wahrscheinlich etwas niedriger, da sich hier mit 150  $\mu$ M eine Sättigung andeutete.

In älteren Proben von Trx2k tauchten neben dem als Trx angesehenen Protein zwei weitere prominente Banden (ca. 70 und 14 kDa) auf, die in dieser Stärke zunächst nicht vorhanden gewesen waren.

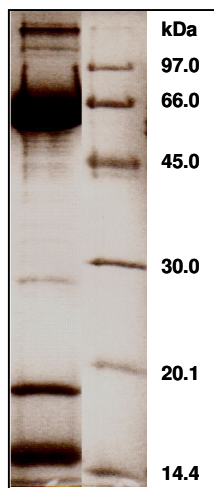


Abb. 3.12. Ältere Probe gereinigten Thioredoxins 2 (k) (links) im 15%igen SDS-Gel.

Um der Identität dieser Banden nachzugehen und auch Trx2k als solches zu bestätigen, sollte eine N-terminale Ansequenzierung erfolgen. Die Probe wurde in einem 17%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und die entsprechenden Banden daraus ausgeschnitten. Die weiteren Schritte bis zum Erhalt der N-terminalen Sequenz wurden von Herrn Dr. Linder (AG Prof. Dr. Preissner; Institut für Biochemie, Giessen) durchgeführt. Die Sequenzierung erwies sich insgesamt als schwierig, über die Identität der oberen Bande kann daher keine Aussage getroffen werden.

Die ersten Aminosäuren der Bande bei ~ 17 kDa lauten:

Nr. der AS	1	2	3	4	5	10	11	12	13	14	15
sehr wahrscheinlich	M	R	G	S	H	H	G	S	T	K	K
alternativ möglich											C

Tabelle 3.2. Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung der mittleren Bande aus Abb. 3.12.

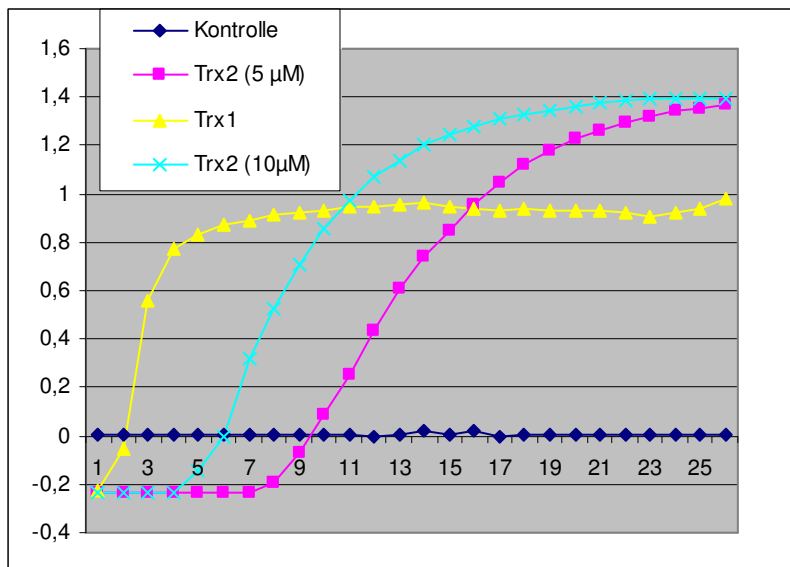
Es handelt sich bei der mittleren Bande somit sicher um das heterolog exprimierte Protein; die Aminosäuren Nr. 13 und 14 sind wie für Trx2k erwartet, Nr. 15 müsste allerdings ein E sein. Dennoch spricht das Ergebnis deutlich für die Identität der mittleren Bande als des Trx2k.

Die Sequenzierung der unteren Bande (14–15 kDa) ergab folgendes:

Nr. der AS	1	2	3	4	5	6	7
sehr wahrscheinlich	M	F	K	K	V	P	K
alternativ möglich	K	V/Q	P/G/T	S/M	L/F/E/A	Q/L	Q/T

Tabelle 3.3. Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung der unteren Bande aus Abb. 3.12.

Der Anfang der Sequenz entspricht (bis auf Position 7) erstaunlicherweise der 2fach verkürzten Form. Dieses Ergebnis könnte daraufhin deuten, dass die vermutete Spaltstelle des putativen Apicoplast-Transitpeptids richtig ist, da selbst *in vitro* hier ein Bruch stattfindet.

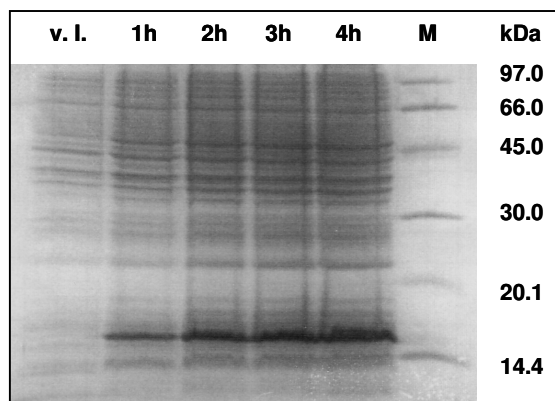


Als weitere vorläufige Ergebnisse mit Trx2k sind deutlich vorhandene Aktivität als Elektronendonator für PfTPx1 zu nennen, ebenso wie die Reduktion von GSSG. Auch im Insulin-Assay ließ sich Aktivität zeigen, die sich als konzentrationsabhängig erwies.

**Abb. 3.13. Insulin-Assay mit Trx2k.**  
Der Assay wurde in TrxR-Puffer durchgeführt.

### 3.1.3.3 Überexpression und vorläufige Charakterisierung des Trx2sk

Die Überexpression des putativ reifen Trx2 (Trx2sk) war ebenfalls unter Standardbedingungen möglich, was auch in den Expressionskontrollen zum Ausdruck kommt.



**Abb. 3.14. Expressionskontrolle von Trx2sk.**

Probenvorbereitung und Lauf des 15%igen SDS-Gels erfolgten wie gewohnt. Errechnete Parameter von Trx2sk:  $M_w = 14.08 \text{ kDa}$ ,  $\epsilon_{280 \text{ ox}} = 11.05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Mit dem für Trx2k angewandten Elutionsprofil konnte zwar auch hier recht sauberes Protein erhalten werden, die erhoffte Stabilitätsverbesserung durch die Verkürzung blieb jedoch aus: Das Protein präzipitierte z. T. bereits direkt nach der Elution. Parallel zum Ausfall des

Proteins verschlechtert sich die Übereinstimmung der Konzentrationsbestimmungen über  $A_{280}$  und den Endpunkt im TrxR-Trx-Assay. Von verschiedenen Maßnahmen zur Stabilisierung zeigte die Zugabe von 0.2%  $\beta$ -Octyl-Glucosid gar keine, die Zugabe von 23% Glycerin geringfügige und die Dialyse gegen Trx2-Puffer tendenziell die größte Verbesserung.

#### Trx-Assay

Sowohl mit Pf- als auch hTrxR zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Aktivität von der Trx2sk-Konzentration.  $K_M$ -Bestimmungen waren jedoch aus denselben Gründen wie für Trx2k beschrieben noch nicht möglich.

Um dennoch einen Vergleich zwischen Trx1 und Trx2 anstellen zu können, wurden in 0.5 ml-Assays je 20  $\mu\text{M}$  des Thioredoxins durch PfTrxR reduziert, wobei der jeweils geeigneteste

Puffer verwendet wurde. Die spezifische Aktivität berechnete sich mit Trx2sk zu 0.4 U/mg, mit Trx1 dagegen zu 16.5 U/mg. Unter Verwendung von hTrxR ist der Unterschied nicht ganz so ausgeprägt, aber immer noch deutlich: Mit Trx2sk wurden 4.25 U/mg, mit Trx1 10.01 U/mg gemessen.

#### Interaktion mit TPx1, GSH und Liponamid-System

An PfTPx1 konnte eine klare Konzentrationsabhängigkeit von Trx2sk beobachtet werden; eine Reduktion von Trx2sk durch GSH war ebenfalls möglich. Hier ergab sich nach einer kurzen Inkubation von 80  $\mu\text{M}$  GSH und 40  $\mu\text{M}$  Trx2sk in 500  $\mu\text{l}$  Trx2-Puffer und Start mit 1.7 U/ml GR ein  $\Delta\text{A}$  von  $0.02 \text{ min}^{-1}$ . Es ist jedoch noch zu klären, ob die geringe Reaktion durch eine Interaktion mit der hoch konzentrierten Reduktase zustande kommt. Es handelt sich mit Sicherheit um eine durch Trx2sk verursachte Reaktion, da eine Kontrolle ohne das Trx negativ ausfiel. Wie bei der einfach verkürzten Variante kann auch die „superkurze“ (sk) Form die Reduktion von GSSG vermitteln: Im 0.5 ml-Assay wurden 20  $\mu\text{M}$  Trx2sk mit 0.13 U/ml PfTrxR bis zur Einstellung einer baseline inkubiert und dann 400  $\mu\text{M}$  GSSG zupipettiert. Daraufhin ergab sich ein Netto- $\Delta\text{A}$  (korrigiert um die baseline) von  $0.048 \text{ min}^{-1}$ . Die Kontrolle ohne Trx2sk war negativ.

In Trx2-Puffer wurde ferner mit 0.35 U/ml PfTrxR getestet, ob Trx2sk (20  $\mu\text{M}$ ) Liponsäure (LA) bzw. Liponamid (LAM) (20  $\mu\text{M}$ ) reduzieren kann. Es fand keine Reaktion statt.

Die umgekehrte Interaktion, die Reduktion von Trx2sk durch das Liponamid-System, konnte dagegen detektiert werden. In Anwesenheit von 0.88 U/ml Liponamiddehydrogenase (LipDH) wurde zunächst nach LA-/LAM-Zugabe die Einstellung einer baseline abgewartet und anschließend Trx2sk (20  $\mu\text{M}$ ) zupipettiert. Korrigiert um die baseline betrug die Absorptionsabnahme in Anwesenheit von Liponsäure  $0.025 \text{ min}^{-1}$ , mit Liponamid  $0.037 \text{ min}^{-1}$ . Es ist ferner noch nicht auszuschließen, dass LipDH selbst bereits Trx2sk reduzieren kann. Alle mit Liponamiddehydrogenase durchgeführten Messungen erfolgten in Trx2-Puffer bei pH 6.6, womit der pH-Präferenz der LipDH Rechnung getragen wurde.

### **3.1.4 Thioredoxin 3 (Trx3)**

#### **3.1.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung**

Neben der Codierung für Tlp2 befindet sich auf Chromosom 9 die Sequenz für ein weiteres potentiell Thioredoxin. Nachdem in einem ersten Schritt die tatsächliche Existenz einer entsprechenden mRNA im Gametocytenstadium von *Plasmodium falciparum* gezeigt werden konnte, indem das Kernstück der Sequenz einschließlich der *active site* – WCKPC – amplifiziert wurde (Oligonukleotide OPfIXs und OPfIXas, Standard-PCR-Ansatz mit Taq-DNA-Polymerase,  $60^\circ\text{C}$  AT), galt es in einem nächsten Schritt, Anfang und Ende des orf zu bestimmen. Während die Vorhersageprogramme „Genefinder“ und „FullPhat“ bezüglich des Endes übereinstimmten, differierten hingegen die angenommenen Translationsstarts. Dies bedeutete Kongruenz bezüglich der Exons 2, 3 und 4; lediglich Exon 1 wurde unterschiedlich vorhergesagt.



1. Exon	Gene-finder	MKCYEMINMIHINIY
	FullPhat	MALICIGSVCFSLFHIGVILLIINYFSSHIKKIFPSFFKPNPNKEEIDKHIG NI
2. Exon		LEAKRKNKQLEQSIYIELKNTGSLNQVFSSTQNSSIVIKFGAVWCKPCNKIKEYFK
3. Exon		NQLNYYYVTLVDIDVDIHPKLNQHNICALPTFEFYFNLNNEWVLVHTV
4. Exon		EGANQNDIEKAFQKYLEKAK

**Tabelle 3.4.** Exonverteilung der Trx3-Sequenz. Grau unterlegt: putatives Signalpeptid.

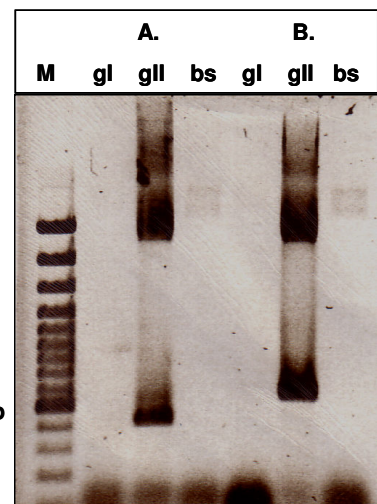
Während mit einem forward-Primer auf den Genefinder-Start lediglich Sequenz genomischer Länge amplifiziert werden konnte, wurden unter Annahme des FullPhat-Starts mit gII als Template die je nach reverse-Primer erwarteten, gespleißten Produkte erhalten. Das die gesamte Sequenz umfassende Fragment hatte 540 bp (Standard-Ansatz, *Taq*-Polymerase, Primer OPf9API + OPfIXh1, 56.6°C AT, übrige Bedingungen standardmäßig).

**Abb. 3.15. Amplifikation der Trx3-Sequenz.**

Mit einem dem Start nach FullPhat-Vorhersage gemäßen forward-Primer wurde mit einem internen reverse-Primer (A.) und einem auf den Translationsstop gerichteten Primer (B.) PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten.

Aufgrund positiver Vorhersagen für Signalpeptid und Apicoplast-Lokalisation des putativen Trx wurde auch das Fragment ohne das errechnete Signalpeptid (29 AS) generiert (453 bp). Dies geschah unter Verwendung von Primern mit Schnittenden für eine *Bam*HI- und *Hind*III-Klonierung (OPfIXN-ap und OPfIXC). Primer OPfIXC wurde zusammen mit OPfIXN auch zur Erstellung eines Produktes der gesamten Länge mit genannten Schnittstellen verwendet. Beide PCR-Reaktionen wurden standardmäßig durchgeführt mit 60°C bzw. 62.8°C Anlagerungstemperatur und waren wiederum mit cDNA II erfolgreich.

In Anbetracht der hohen Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Klonierung der um 87 bp (29 AS) verkürzten Sequenz fokussiert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde *Bam*HI und *Hind*III in pSKII+ kloniert wie beschrieben. Die Sequenzierung der positiven Klone zeigte eine hohe Fehlerhäufigkeit der *Taq*-Polymerase. Im günstigsten Fall war die Sequenz an zwei eng benachbarten Stellen verändert, welche mit einem einzigen Mutagenese-Schritt (zielgerichtete Mutagenese) korrigiert wurden.



Vorhersageprogramm	Score / Kriterienerfüllung	Länge SP
Signalpeptidvorhersage		
TargetP	0.966	29 AS
SignalP	4 von 4*	29 AS
Apicoplastvorhersage		
PATS Neural Network	0.974	23 AS
Plasmo-AP	5 von 5	Keine Angabe

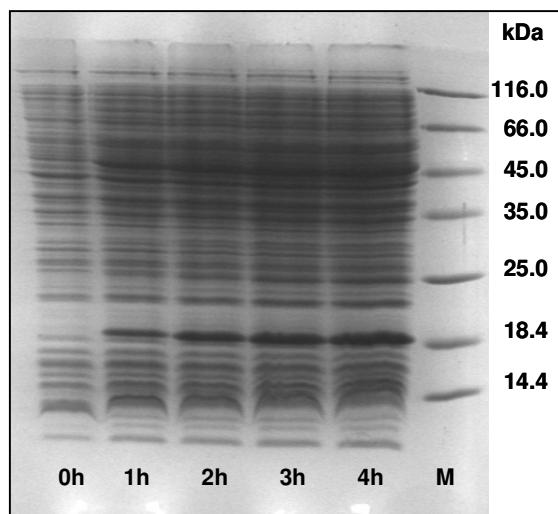
**Tabelle 3.5.** Lokalisationsvorhersagen für Trx3.

Ein score von 0 entspricht sehr geringer, ein score von 1 sehr hoher Wahrscheinlichkeit. \*Score für die Wahrscheinlichkeit eines Signalpeptidankers = 0.796.

Anschließend wurde die Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30 vorgenommen. Das pSK-Plasmid wurde dazu 1.5 h bei 37°C und weitere 1.5 h bei RT im Standard-Ansatz mit *Bam*HI, *Hind*III und *Sac*I verdaut. Die Restriktion mit *Sac*I diente dazu, die Religation des pSK-Vektors zu erschweren. Die Trx3-Sequenz beinhaltet keine Erkennungsstelle für dieses Enzym. Der pQE30-Vektor wurde nach Standard-*Bam*HI- und *Hind*III-Verdau durch Zugabe von 3 U *Shrimps Alcaline Phosphatase* (SAP) zum Restriktionsansatz und weitere 30minütige Inkubation bei 37°C dephosphoryliert. Hierdurch sollte die Wahrscheinlichkeit für eine Religation leeren Vektors herabgesetzt werden. Beide Restriktionsreaktionen wurden mittels Agarosegel kontrolliert. Es traten jedoch nur geringe Anteile der durch *Sac*I zu bildenden Fragmente auf. Die für die anschließende Ligation (Ready-to-go; ü. N. bei 16°C) verwendeten Mengen Vektor und Insert wurden anhand des Gels gewählt. Transformiert wurde standardmäßig zu XL1Blue. Das als korrekt identifizierte pQE-Plasmid wurde unter verschiedenen Bedingungen für die heterologe Expression verwendet.

Zwar war die Überexpression erster standardmäßiger Versuche in M15-Zellen in den Kontrollpellets zu erkennen (Abb. 3.16), brachte jedoch wenig Ausbeute. Daher wurden neben der Verwendung anderer Zellen (XL1Blue, BL21, C41, C43) diverse Zusätze bzw. Varianten getestet (+ Rig-Plasmid / + 0.5% Glucose / bei Raumtemperatur / Expressionsdauer <4 h / geänderte Induktions-OD). Es war jedoch in keinem Fall eine deutliche und

reproduzierbare Steigerung der erhaltenen Proteinmenge zu verzeichnen. Aus 1 l Kulturvolumen konnten bestenfalls 6.5 mg Trx3 gewonnen werden.



**Abb. 3.16. Expressionskontrolle der ÜE von Trx3.**

Der dargestellte Verlauf entstammt einer ÜE in M15-Zellen + Rig-Plasmid. Probenvorbereitung und –auftrag auf ein 15%iges SDS-Gel erfolgten wie beschrieben. Trx3: Mw = 19.15 kDa;  $\epsilon_{280\text{ox}} = 20.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.1.4.2 Vorläufige Redox-Ergebnisse

#### Insulin-Assay

Die allgemeine Redoxaktivität von Trx3 wurde anhand der Reduktion der Insulin-Disulfidbrücken im entsprechenden Assay nachgewiesen. Der Anstieg der OD<sub>600</sub> wurde durch 5 µM Trx3 später verursacht als durch 5 µM Trx1, aber eindeutig schneller als in der Negativkontrolle.

#### Trx-Assay

Die Reduktion von Trx3 durch PfTrxR konnte ebenfalls detektiert werden. Bei der Variation der Trx3-Konzentration (in 0.5 ml Endvolumen, Start mit 7 mU/ml TrxR) zeichnete sich allerdings mit 100 µM noch keine Sättigung ab. Da die zur Verfügung stehende Menge Trx3

limitierend war, konnte bislang die Konzentration noch nicht weiter gesteigert werden, weshalb derzeit keine  $K_M$ -Angabe möglich ist.

#### Interaktion mit Plrx

In einem auf dem Trx-Assay aufbauenden Versuch wurde getestet, ob Trx3 Plasmoredoxin reduzieren kann. Dazu wurden 20  $\mu\text{M}$  Trx3 in 400  $\mu\text{l}$  Endvolumen wie gewohnt mit PfTrxR (7 mU/ml) vorreduziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Plrx. Da letzteres durch die TrxR nicht umgesetzt wird, war eine weitere NADPH-Abnahme nur zu erwarten, falls Trx3 das Plasmoredoxin reduziert. Eine solche Reaktion konnte jedoch nicht festgestellt werden.

#### Interaktion mit GSSG

Analog zum Test mit Plrx erfolgte auch die Überprüfung einer Reduktion von GSSG (ad 100  $\mu\text{M}$ ) durch Trx3 (14  $\mu\text{M}$ ). Nach Reduktion des Trx in 0.4 ml Assayvolumen durch 70 mU/ml TrxR wurde mit GSSG gestartet. Während in der Kontrolle ohne Trx3 keine Absorptionsabnahme messbar war, betrug sie in Anwesenheit des Trx  $0.02 \text{ min}^{-1}$ .

Die umgekehrte Reaktion, die Reduktion von 50  $\mu\text{M}$  Trx3 durch das GR-System, fand unter den üblichen Assay-Bedingungen (1 mM GSH, 0.3 U/ml GR) nicht statt. Die Zwischenschaltung von 0.25  $\mu\text{M}$  Grx hatte ebenso wenig Effekt wie die Modifikation der GR-Assay-Bedingungen (5 minütige Vorinkubation von 20  $\mu\text{M}$  Trx3 mit 1.25 mM GSH, anschließend Start mit 0.4 U/ml GR). Eine Reduktion von 50  $\mu\text{M}$  Grx durch 50  $\mu\text{M}$  Trx3 nach Vorreduktion mit 70 U/ml TrxR (0.5 ml Volumen) konnte jedoch detektiert werden.

Hinweise auf eine Reduktion der PfTPx1 durch Trx3 sind vorhanden, bedürfen aber der Bestätigung.

## **3.2 Herstellung des PfTrx1 ohne His-tag (Trx1-His)**

### **3.2.1 Herstellung eines pQE30PfTrx1-Konstrukts ohne His-tag**

Zur Aufklärung der Struktur des PfTrx1 sollte eine tag-freie Proteinform hergestellt und kristallisiert werden. Um zu einem His-tag-freien Konstrukt der PfTrx1-Sequenz in einem Expressionsvektor zu gelangen, wurde zunächst der vorhandene Vektor pQE30 entsprechend modifiziert und anschließend das Trx1-Gen hineinkloniert. Diese Zwei-Schritte-Strategie hatte den Vorteil, dass der tag-freie pQE30, dessen Verwendung im Labor gut etabliert ist, für weitere Klonierungen ohne Polyhistidin eingesetzt werden kann.

Im ersten Schritt wurde dazu mittels standardmäßigem *EcoRI*- und *BamHI*-Verdau und anschließender Reinigung eine Sequenz von 54 bp Länge einschließlich der His-tag-codierenden Basen aus dem Vektor entfernt. Die linearisierte Sequenz wurde mittels CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) den Herstelleranweisungen folgend dephosphoryliert. Um eine tag-freie, aber ansonsten funktionelle Sequenz einzufügen, wurden komplementäre Oligonukleotide (pQE30-Hisfor und pQE30-Hisrev) entworfen, die sich lediglich bezüglich ihrer Enden unterschieden. Die phosphorylierten 30mere wurden in äquimolaren Konzentrationen gemischt und einem Temperaturprogramm von 95°C 3 min, 62°C 3 min unterzogen, wodurch die Aneinanderlagerung erreicht wurde (Schmelztemperatur 68°C). Das so generierte Insert besaß überhängende Enden mit *EcoRI*- bzw. *BamHI*-Schnittstelle in

geschnittener Form. Abgesehen vom Fehlen der Polyhistidin-Sequenz entsprach das Insert der aus pQE30 entfernten Sequenz mit einer Ausnahme: Durch die Modifizierung zweier Basen direkt vor dem Start-ATG wurde zu Selektionszwecken eine *NdeI*-Schnittstelle generiert. Die Ligation wurde standardmäßig mittels Ready-to-go<sup>TM</sup>-Kit vorgenommen und der Ansatz zu XL1Blue-Zellen transformiert.

Potentiell richtige Klone wurden per *NdeI*-Verdau (im Puffer R+, sonst standardmäßig) ermittelt und per Sequenzierung bestätigt.

Zur Erlangung des pQE30Trx-His-Konstruktes wurde der erstellte pQE-His-Vektor standardmäßig mit *BamHI* und *HindIII* verdaut und anschließend im Verdauansatz dephosphoryliert (CIAP). Der Verdau des vorhandenen pQE30PfTrx1 erfolgte mit *BamHI*, *HindIII* und zusätzlich *XbaI* standardmäßig und wurde mittels Agarosegel bestätigt. Die gereinigten Verdauansätze wurden für 4 h bei 20°C ligiert (R.t.g.-Kit) und der Ansatz standardmäßig zu XL1Blue-Zellen transformiert. Die Selektion der Trx-haltigen Klone erfolgte mittels Doppelverdau durch *BamHI* und *HindIII*. Diese wurden anschließend durch *NdeI*-Verdau auf pQE30-His überprüft. Durch die neue Schnittstelle und die herkömmlich an Position 1398 vorhandene ergaben sich dabei Fragmente von 1603 (einschließlich der 318 bp-Trx1-Sequenz) und 2176 bp Länge. Zusätzlich wurde eine Sequenzierung der Kandidaten vorgenommen.

### 3.2.2 Überexpression und Reinigung des tag-freien PfTrx1

Die Überexpression wurde erfolgreich in M15- (2 h Inkubation nach Induktion) bzw. BL21-Zellen (3 h nach Induktion) vorgenommen (Ausbeute aus 0.5 l BL21-Kultur bis zu 22 mg). Längere Expressionszeiten führten zu keiner weiteren Steigerung der Proteinmenge.

In Anlehnung an die von Bauer *et al.* beschriebene Reinigung des his-tag-freien *Drosophila melanogaster*-Thioredoxins wurde die Vorreinigung des wie üblich gewonnenen Rohextraktes durch einen Hitzeschritt getestet, wobei verschiedene Bedingungen zwischen 60 und 70°C über 1 bis 5 Minuten angewendet wurden. Bei dieser Behandlung sollte die relative Hitzestabilität des Trx gegenüber anderen Proteinen ausgenutzt werden. Im Anschluss an die Hitzebehandlung wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, deren Bedingungen ebenfalls variiert wurden.

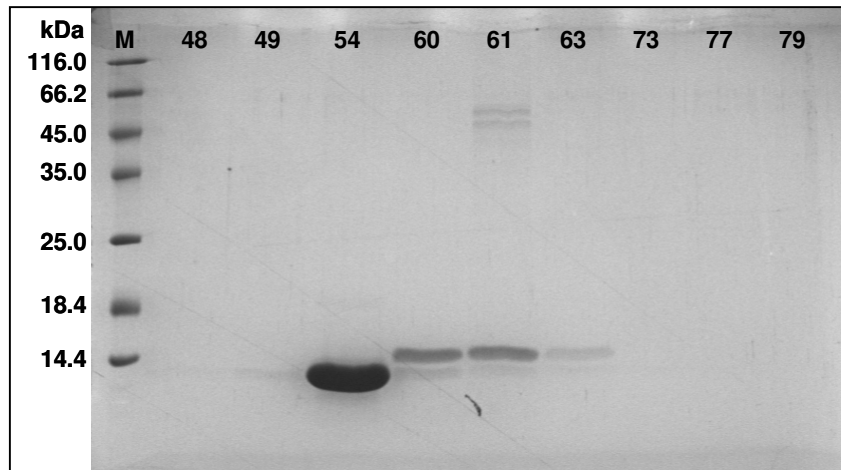
In der letztlich etablierten Reinigungsprozedur wurde jedoch auf diese Reinigungsschritte verzichtet und der Rohextrakt direkt der Gelfiltration über Superdex 75 unterzogen. Diese Vereinfachung der Vorgehensweise geschah zum einen aufgrund der nicht durchgehend feststellbaren Wirkung der Zwischenschritte, zum anderen zur Vermeidung aller potentiell schädlichen Einflüsse auf die native Konformation des Proteins. Diese schien zunächst nur bedingt gegeben zu sein, denn die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteinlösung über die Aktivität des Trx im TrxR-Trx-Assay (Endpunktbestimmung) wich deutlich von der über  $A_{280}$  und den millimolaren Extinktionskoeffizient ( $\epsilon = 11.17 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ermittelten ab.

Zur Gelfiltration wurde die Sephadex 75-Säule mit US-Puffer, pH 7.5 oder 8.0, äquilibriert. Der Rohextrakt wurde nochmals scharf zentrifugiert (30 Minuten bei 104000 g) und ein Aliquot von max. 2 ml des erhaltenen Überstands auf die Säule gegeben. Eluiert wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über mindestens 1 SV. Die Fraktionierung des

Eluats in 3 ml-Portionen resultierte in scheinbar sauberem Protein; die Übereinstimmung von Endpunktbestimmung und  $A_{280}$  war jedoch noch immer nicht zufriedenstellend. Erst die Sammlung von 1.5 ml-Fractionen ergab hinreichend sauberes Protein, das in der Endpunktbestimmung 60-80% der  $A_{280}$ -Werte zeigte.

Trx1-His eluierte hier v. a. in den Fractionen 53-55; das anhand der Gelfiltration ermittelte Molekulargewicht lag zwischen 10.26 und 10.92 kDa. Das errechnete  $M_w$  beträgt 11.86 kDa.

Die vergleichende  $K_M$ -Wert-Bestimmung resultierte in identischen Werten für Trx1-His und



Trx1+His.

**Abb. 3.17. Gereinigtes PfTrx1-His nach der Gelfiltration.**

Vorbereitung und Elektrophorese des 17%igen SDS-Gels erfolgten wie gewohnt. Fraction 54 enthält das PfTrx1-His.

### 3.2.3 Kristallansätze

Für die bisher durchgeführten Kristallisationsversuche des PfTrx-His wurden Proteinkonzentrationen von 8-15 mg/ml verwendet; das Protein lag meist in 100 mM Naphosphat, 300 mM NaCl, pH 8.0 vor; einmal wurde 54 mM Tris, pH 8.0 verwendet. Reservoir und Tropfen wurden präpariert wie beschrieben. Neben den Lösungen der Crystal Screens 1 und 2 (Hampton Research) kam auch der Additiva Screen 2 zum Einsatz; ferner wurde der Zusatz von DTT (2 mM) zur Proteinlösung getestet. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur präpariert und aufbewahrt. Bislang konnte keine deutliche Kristallbildung festgestellt werden. Das Protein steht für weitere Tests zur Verfügung.

### 3.3 Herstellung verschiedener PfTrxR-Formen

#### 3.3.1 N-terminal verlängerte, „alternative“ PfTrxR

##### 3.3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung

In Anbetracht der für Säuger-Systeme und *Drosophila melanogaster* beschriebenen Existenz mehrerer Spleißvarianten der TrxR-Gene stellte sich die Frage, ob *Plasmodium falciparum* ebenfalls durch alternatives Spleißen des bekannten TrxR-Gens verschiedene Isoformen des Enzyms produziert. Die Datenbankanalyse zeigte, dass beide Kopien des Gens, welche aus lediglich einem Exon bestehen, am 5'-Ende eine längere Ausdehnung des offenen Leserahmens besitzen als bisher angenommen. Ein entsprechendes alternatives Startcodon ist vorhanden, welches zu einer Extension der bisher angenommenen TrxR-Sequenz um 228 bp (76 AS) führt. TargetP kalkuliert für ein mitochondriales Signalpeptid eine Wahrscheinlichkeit von lediglich 31% (für die DmTrxR2 wurde eine Wahrscheinlichkeit von 93.2% für ein mitochondriales SP vorhergesagt). Während auch die Mitochondrien-spezifischen Programme „PlasMit“ und „Predotar“ die alternative TrxR-Sequenz nicht für ein mitochondriales Protein halten, errechnet „MitoProt“ immerhin einen score von 0.9 für diese Lokalisation.

Mit einem unmodifizierten Oligonukleotidprimer auf den neuen möglichen Sequenzbeginn (OPfTrxRaN) und einem Gen-internen Primer (OPfTrxRas) wurde unter Verwendung von *Taq*-Polymerase eine PCR durchgeführt. Mit einer Annealing-Temperatur von 63°C wurde nach 35 Zyklen ein deutlich positives Resultat mit der *bloodstage*-cDNA erhalten. Das Produkt hatte die errechnete Länge von 630 bp. Die PCR wurde daraufhin mit Schnittendprimern für *Bam*HI (OPfTrxRaNB) bzw. *Hind*III (OPfTrxRasH) wiederholt und das Produkt standardmäßig in pSKII+ kloniert. Bis auf ein Basenpaar (G statt A in Position 136, entsprechend V46 statt I46) erwies sich die Sequenz als die dem Datenbankeintrag nach erwartete.

Parallel dazu konnte auch ein PCR-Produkt über die gesamte Länge der alternativen TrxR-Sequenz (1854 bp) erhalten werden (Primer OPfTrxRaN und OPfTrxRCterm; 60°C Annealingtemperatur, 35 Zyklen). Die Ansequenzierung lieferte die erwartete Sequenz, womit der Beweis erbracht wurde, dass Transkripte der gesamten „alternativen“ PfTrxR tatsächlich generiert werden.

Da die bisher bekannte PfTrxR-Sequenz bereits durch stille Mutagenese auf die Expression in *E. coli* optimiert worden war (Kanzok *et al.*, 2000), wurde nun nicht mit dem PCR-Produkt der gesamten Sequenz weitergearbeitet, sondern mit dem zuvor erhaltenen Abschnitt für den N-Terminus. Dieses 630 bp-Fragment wurde über *Bam*HI und *Hind*III in pQE30 umklont. Für weitere Arbeiten wurde eine natürliche *Nhe*I-Schnittstelle an Position 69 innerhalb der herkömmlichen Sequenz ausgenutzt. Da auch pQE30 eine *Nhe*I-Schnittstelle, etwa 120 bp downstream der *mcs*, besitzt, reichte ein *Nhe*I-Einzelverdau, um den C-Terminus der adaptierten TrxR-Sequenz in den Vektor mit alternativer N-terminaler Sequenz zu transferieren. Zur Erleichterung des Vorgangs wurde durch zusätzlichen *Hind*III-Verdau von pQE30+altN-Term und Dephosphorylierung mittels CIAP dessen Religationswahrscheinlichkeit herabgesetzt. pQE30+TrxR wurde mit demselben Ziel zusätzlich *Eco*RI-verdaut. Mit 1.5 fachem Überschuss des TrxR-Verdau wurde 75 min ligiert

(Ready-to-go<sup>TM</sup>-Kit) und zu XL1Blue-Zellen transformiert. Anhand verschiedener Restriktionen wurde ein korrektes Plasmid identifiziert; heterologe Expression der Sequenz in M15-Zellen und Reinigung über Ni-NTA waren bei standardmäßiger Durchführung erfolgreich. Das Protein eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 40 mM. Das „ProtCalc“-Programm von MBS ermittelte für die AS-Sequenz der altPfTrxR ein Molekulargewicht  $M_w = 69.97$  kDa und einen Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{280} = 60.87$  mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Bei der Proteinbestimmung war zu beachten, dass FAD ein  $\epsilon_{280} = 37$  mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> hat und sich somit  $\epsilon_{280} = 97.87$  mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> für die altPfTrxR ergibt.

Ein Vergleich von PfTrxR der herkömmlichen Länge (61.09 kDa) mit der alternativen Form über SDS-PAGE ergab einen angemessenen Größenunterschied.

Der kinetische Vergleich der N-terminal verlängerten mit der herkömmlichen TrxR-Form ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Affinität für NADPH, DTNB und PfTrx1 und der spezifischen Aktivität.

### 3.3.1.2 Herstellung einer altPfTrxR ohne His-tag

Für Kristallansätze wurde mittels zielgerichteter Mutagenese eine tag-freie Variante generiert. Dazu wurde unter Verwendung eines reverse-Primers auf die Schlusssequenz des pQE30-Vektors (TrxRmutr1) und eines forward-Primers (altPfTrxR-hismut) auf den Beginn der altPfTrxR-Sequenz eine PCR durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mittels *Pfu*-Polymerase wie beschrieben. Als Matrize wurde das bisher verwendete altPfTrxRpQE30-Plasmid eingesetzt; die Annealingtemperatur betrug 56°C, die Extensionszeit 10.5 min (5.3 kb). Das PCR-Produkt wurde anschließend aus dem Agarose-Gel extrahiert (Qiagen-GE-Kit) und gemäß Herstellerangaben mittels Polynukleotidkinase phosphoryliert. Da hier keine komplementären Primer verwendet wurden und somit ein lineares PCR-Produkt entstand, war ein Ligationsschritt notwendig (T4-Ligase, 560 ng DNA, ATP *ad* 1 mM und 5 U T4-Ligase in 100  $\mu$ l, ü. N. bei 22°C). Anschließend wurde erneut gereinigt, *DpnI*-verdaut (Puffer B; 1  $\mu$ l *DpnI*, BSA *ad* 1 mg/ml) und zu XL1Blue-Zellen transformiert.

Nach der Identifizierung eines erfolgreich mutierten Klons per Sequenzierung wurde außerdem durch gezielte Mutagenese eine Rückmutation vorgenommen. In AS-Position 116 (vom herkömmlichen N-Terminus gezählt) befand sich ein Y→H-Austausch (in Abb. 3.18 unterstrichen). Die PCR mit Primern TrxRshortMutf und TrxRshortMutr im Standard-Ansatz mit 18 ng Template-Plasmid wurde durchgeführt wie beschrieben. Bei den Primern handelte es sich um komplementäre 21mere, die den notwendigen Basenaustausch C→T enthielten. Die Anlagerungstemperatur betrug 50°C. Anschließend wurden Reinigung, *DpnI*-Verdau und Transformation durchgeführt. Sequenzierung bestätigte die erfolgte Mutation.

Die rückmutierte alternative TrxR-Form ohne His-tag wurde standardmäßig überexprimiert und aufbereitet. Die Aufreinigung erfolgte über 2',5'-ADP-Sepharose wie beschrieben. Die Fraktionen wurden mit 12% SDS-PAGE kontrolliert. Das Protein eluierte v. a. bei 1 mM NADP<sup>+</sup>, verhielt sich im SDS-Gel jedoch kleiner (~60 kDa) als erwartet (68.7 kDa nach Computerberechnung). Neben einem aberranten Laufverhalten war eine zweite, wahrscheinlichere Erklärungsmöglichkeit, dass die N-terminale Sequenz bei Expression ohne His-tag von *E. coli* abgespalten wird. Dasselbe Problem trat auch bei DmTrxR2 auf

(persönliche Kommunikation). Um dies zu klären, wurde das Protein auf PDF-Membran geblottet und in der AG Prof. Dr. Preissner (Institut für Biochemie, JLU Gießen) N-terminal ansequenziert. Das Resultat entsprach weitestgehend dem Anfang der bisher bekannten TrxR-Form abzgl. des Start-Methionins. Abgesehen von einer erneuten Kontrolle des für die Expression verwendeten Plasmids, die das Vorhandensein des erweiterten orf bestätigte, wurde die altPfTrxR nicht weiter untersucht.

1	-	ATGAACAATGTAATTTCTTTTCATTGGAAATTCATCAAATAAATATTTCCAAATTAATCAA	-	60
	-	<b>M N N V I S F I G N S S N K Y F Q I N Q</b>		
61	-	CTTCATTTTATTAGGATCATCAATAAAAATATACATTCTAAGAATAATCTTATTAACCTCT	-	120
	-	<b>L H F I R I I N K N I H S K N N L I N S</b>		
121	-	AATTCATCTTATAATGTTTTTTATAATAAATATTTTATAAAGAACACATTCCAAAATAAA	-	180
	-	<b>N S S Y N <u>V</u> F Y N K Y F I K N T F Q N K</b>		
181	-	AATAAACTATCCTCCATATATTTCCAAATTAACCTTTTCCATTAAAAACATGTGTAAAGAT	-	240
	-	<b>N K L S S I Y S K L N F S I K N M C K D</b>		
241	-	AAAAACGAAAAAAAAAATTATGAACATGTTAATGCGAATGAAAAAAAAATGGCTACCTAGCT	-	300
	-	<b>K N E K K N Y E H V N A N E K N G Y L A</b>		
301	-	AGCGAAAAAACGAACTCACCAAAAATAAGGTCGAGGAACATACATATGATTATGATTAT	-	360
	-	<b>S E K N E L T K N <u>K V E E H T Y D Y D Y</u></b>		
361	-	GTTGTAATAGGAGGAGGTCCAGGTGGAATGGCTTCAGCCAAAGAAGCTGCAGCACATGGT	-	420
	-	<b>V V I G G G P G G M A S A K E A A A H G</b>		
421	-	GCTCGAGTTTTATTGTTTGATTATGTAAAGCCAAGTAGTCAAGGAACAAAATGGGGTATA	-	480
	-	<b>A R V L L F D Y V K P S S Q G T K W G I</b>		

**Abb. 3.18. Sequenzbeginn der bearbeiteten PfTrxR-Varianten.**

Dargestellt sind die ersten 84 AS der bekannten TrxR-Form. Fett gedruckt ist der verlängerte N-Terminus; graue Unterlegung kennzeichnet die verkürzte Form (shortPfTrxR); das rückmutierte Histidin ist unterstrichen.

### 3.3.2 N-terminal verkürzte PfTrxR

#### 3.3.2.1 Expression und Reinigung

Um die Hemmstoffentwicklung auf Basis der Struktur betreiben zu können, wurden schon zahlreiche Kristallisationsversuche mit der PfTrxR unternommen. Weil aufgrund bisher bekannter Strukturen großer Trx-Reduktasen davon auszugehen war, dass ein gewisser N-terminaler Teil keine funktionelle Bedeutung hat und möglicherweise die Kristallisation stören könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Idee nachgegangen, eine verkürzte und His-tag-freie Variante des Enzyms zu präparieren und zu kristallisieren. Das entsprechende Plasmid wurde von der AG Prof. Dr. R.-H. Schirmer (Zentrum für Biochemie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um den Vektor pET16b mit der TrxR-Sequenz, deren Beginn in Abb. 3.18 hellgrau unterlegt ist. Der His-tag befindet sich in diesem Plasmid innerhalb einer mcs, so dass er durch gezielte Verwendung bestimmter Restriktionsenzyme bei der Klonierung entfernt werden konnte.

Da auch diese Sequenz den bereits erwähnten Y→H-Austausch enthielt, wurde hier ebenfalls eine entsprechende Rückmutation vorgenommen. Es wurde verfahren wie für die altPfTrxR beschrieben; lediglich die Extensionszeit wurde anders gewählt (13.4 min für 6.69 kb). Der Erfolg der Rückmutation wurde per Sequenzierung bestätigt. Die Expression wurde standardmäßig durchgeführt; aufgrund der verwendeten BL21-Zellen wurde nur Carbenicillin benötigt. Auf dem SDS-Gel war anhand der Kontrollpellets die Produktion des Proteins erkennbar. Die Herstellung des RE erfolgte unter Verwendung von TE-Puffer und wie gewohnt. Die Präparation der 2',5'-ADP-Sepharose wurde vorgenommen wie beschrieben.



Da die geschilderte Reinigungsprozedur nicht die für Kristallansätze benötigte Sauberkeit erbrachte, wurden verschiedene Bedingungen getestet, von denen die in Tabelle 2.6 gezeigte Kombination das beste Resultat erzielte. Da aufgrund erster Gelelektrophorese-Ergebnisse zu vermuten war, dass das USP noch erhebliche Mengen TrxR enthielt, wurde dieses in geringer Puffermenge resuspendiert und nochmals extrahiert. Aktivitätsmessungen ergaben, dass sich auch in den Fraktionen DL und W noch TrxR befand, was zu einer separaten Nachreinigung veranlasste. Das aus dieser Prozedur erhaltene Protein war von noch höherer Reinheit als das der ersten Reinigung.

Die mit JustBio ProtCalc errechneten Daten für die shortPfTrxR sind

$$\begin{aligned} M_w &= 55.80 \text{ kDa} \\ \epsilon_{280 \text{ ox}} &= 51.79 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (AS-Sequenz)} \\ &+ \underline{37.00 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (FAD)}} \\ &88.79 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

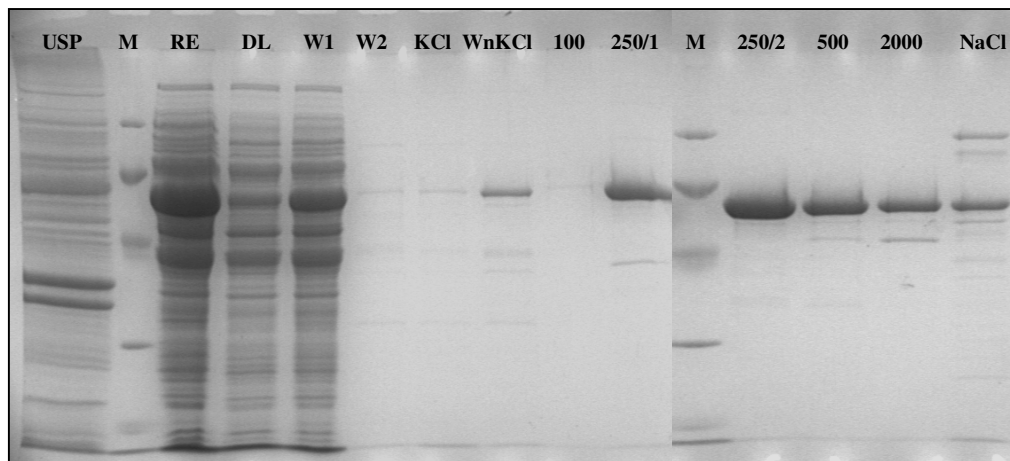
Verglichen mit der bekannten Enzymform erwies sich im kinetischen Vergleich die Affinität der kurzen Variante zu Trx1 höher (Faktor 2-5); alle anderen Parameter waren unverändert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kristallisation gereinigter shortPfTrxR unter Verwendung der Crystal Screens 1 und 2, des MembFac-Kit und des Additive-Screens 2 (Hampton Research) versucht, zeigte jedoch keinen Erfolg.

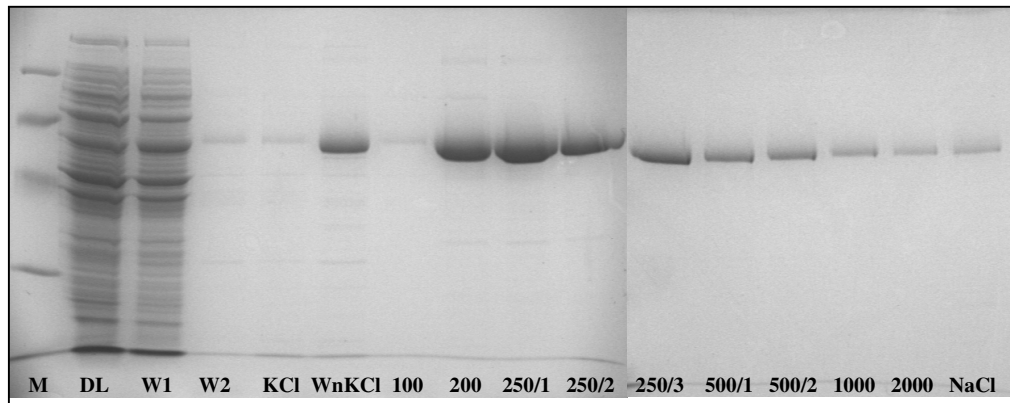
### 3.3.3 PfTrxR ohne His-tag

#### 3.3.3.1 Expression und Reinigung

Ein pQE30-Plasmid mit der PfTrxR-Sequenz der herkömmlichen Länge (nPfTrxR) ohne His-tag lag im Labor bereits vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein standardmäßig in M15-Zellen exprimiert und gereinigt, wie für die optimierte shortPfTrxR beschrieben. Aufgrund der starken Expression der PfTrxR mit His-tag wurden hier pro 1 l Kulturvolumen 5 ml fertiges SV verwendet. Das Protein eluierte sauber in der 2. Fraktion des 250  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>-Schrittes. Auch hier konnte durch die Nachreinigung der Waschfraktionen Protein höherer Reinheit gewonnen werden als aus der ersten Reinigungsprozedur resultiert hatte.



**Abb. 3.19. Reinigungsprofil der PfTrxR-His in der 12%igen SDS-PAGE.**  
 Markerbanden: 97.0, 66.0, 45.0, 30.0, 20.1 und 14.4 kDa



**Abb. 3.20.**  
**Profil der**  
**Nachreinigung**  
**der**  
**Waschfraktion**  
**von PfTrxR-**  
**His in der**  
**12%igen SDS-**  
**PAGE.**  
 Marker: 97.0,  
 66.0, 45.0, 30.0,  
 20.1 und 14.4  
 kDa.

Ohne Berücksichtigung der Proteinmenge aus der Nachreinigung wurden aus 500 ml Kulturvolumen etwa 5 mg Protein erhalten.

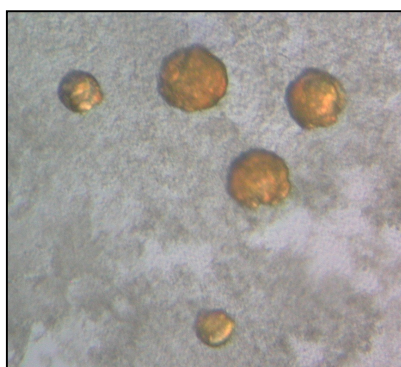
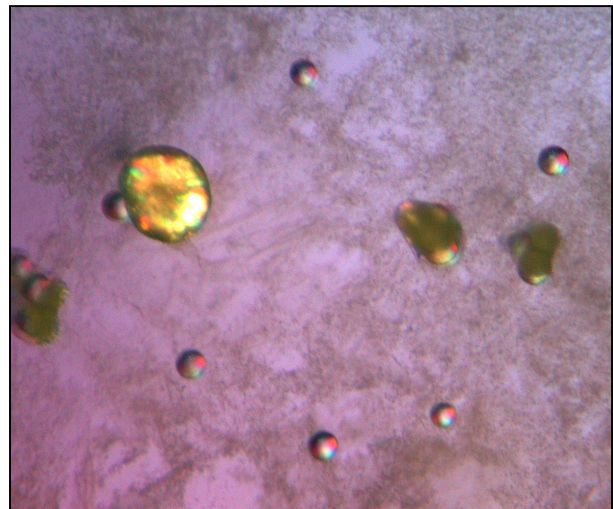
JustBio ProtCalc errechnete folgende Daten der PfTrxR-His:

$$\begin{aligned}
 M_w &= 59.7 \text{ kDa} \\
 \epsilon_{280 \text{ ox}} &= 54.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (AS-Sequenz)} \\
 &+ \underline{37.00 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (FAD)}} \\
 &91.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}
 \end{aligned}$$

Zwar erfordern die bezüglich der Kinetik angestellten Untersuchungen noch Reproduktionen, sie lassen jedoch die Tendenz erkennen, dass der Polyhistidintag die Affinitäten für NADPH, Trx1 und DTNB nicht verändert. Die Aktivität wird jedoch möglicherweise durch den tag negativ beeinflusst.

### 3.3.3.2 Kristallisation der PfTrxR-His

Nach einem ersten Screening unter Verwendung der Lösungen der Crystal Screens 1 und 2, des MembFac-Kit und des Additive Screens 2 (Hampton Research) wurden zahlreiche Variationen durchgeführt. Zwar wurden mit einigen Ansätzen Kristalle erhalten (Abb. 3.21), die sich jedoch aufgrund ihrer optischen Eigenschaften (Lichtbrechung) nicht zur Röntgenstrukturanalyse eigneten.



**Abb. 3.21. Kristallfotos der PfTrxR-His.**

Die zur Kristallisation verwendete Proteinlösung enthielt 21.7 mg/ml TrxR, die übrigen Bedingungen waren (links) Reservoir aus 650  $\mu$ l MembFac #2 (0.1 M Zinkacetatdihydrat) und 150  $\mu$ l *aq. dest.*, je 2  $\mu$ l Proteinlösung und Reservoir, + 1  $\mu$ l Triton X-100 *ad* 1.8 mM; (rechts) 700  $\mu$ l MembFac #2 + 100  $\mu$ l *aq. dest.*, je 2  $\mu$ l Proteinlösung, Reservoir und Triton X-100 *ad* 3 mM.

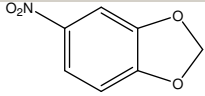
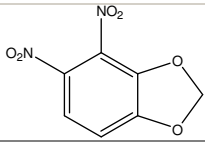
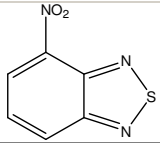
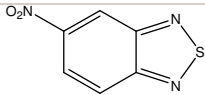
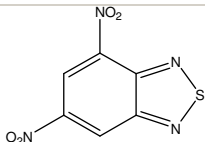
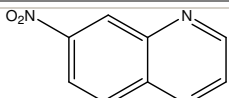
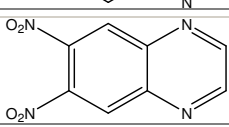
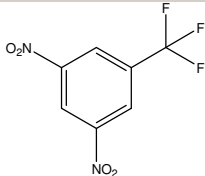
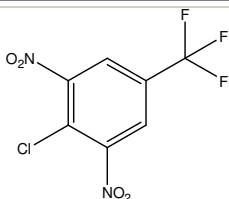
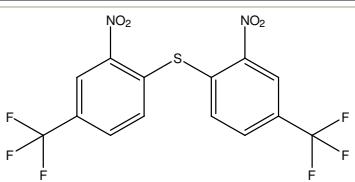
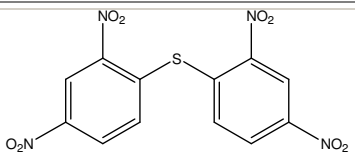
### 3.3.4 Inhibitormessungen an PfTrxR

Ermittelt wurden die  $IC_{50}$ -Werte der gezeigten Verbindungen (Tabelle 3.6) an der PfTrxR mit PfTrx1 als Substrat und an der humanen TrxR (isoliert aus Plazenta nach Gromer *et al.*, 1998) mit hTrxC72S als Substrat. Die Bestimmung erfolgte in 500  $\mu$ l-Ansätzen und in TrxR-Puffer. Die Endkonzentration NADPH betrug 100  $\mu$ M; PfTrxR wurde *ad* 20 nM, das humane Enzym mit 10 nM Endkonzentration eingesetzt. Nach Zugabe variierender Inhibitor-Konzentrationen erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von Pf- bzw. hTrx *ad* 20  $\mu$ M. Die Abnahme der Absorption wurde bei 340 nm und 25°C ohne Vorinkubation gemessen. Die Inhibitorlösungen wurden mit DMSO hergestellt. Es wurden entsprechende Kontrollen mit der Endkonzentration DMSO (max. 2%) berücksichtigt, wobei die Enzymaktivität etwa 16 mU/ml betrug.

Als besonders wirksam in Bezug auf PfTrxR erwiesen sich die Verbindungen 028, 036 und 064. Auch 045, 049, 054 und 065 hemmten recht effektiv, wobei für letztere beiden aufgrund der Schwierigkeiten bei der Messung keine weiteren Parameter bestimmt wurden.

Die hTrxR wurde von nahezu allen Substanzen deutlich weniger beeinträchtigt (8-70fach geringere Hemmung mit den favorisierten Verbindungen).

Die wirksamsten Verbindungen wurden in  $IC_{50}$ -Konzentrationen (PfTrxR) an den Glutathionreduktasen getestet, wobei sich das humane Enzym tendenziell empfindlicher zeigte (Hemmungen: 028: 31% PfGR, 19% hGR; 036: 61% PfGR, 73% hGR; 049: 30% PfGR, 44% hGR; 064: 55% PfGR, 82% hGR; 045: 26% PfGR, 67% hGR). Ferner wurden Untersuchungen den Hemmtyp betreffend angestellt.  $K_M$ -Bestimmungen für Trx in Anwesenheit der  $IC_{50}$ -Konzentration ergaben interessanterweise sogar eine Erniedrigung (028: 6  $\mu$ M; 036: 6  $\mu$ M; 049: 6  $\mu$ M; 064: 3  $\mu$ M) verglichen mit 10-24  $\mu$ M ohne Inhibitor in den Parallelmessungen (Literaturwert: 10.4  $\mu$ M; Kanzok *et al.*, 2000). Eine Konkurrenz mit Trx ist demnach für alle Verbindungen auszuschließen. Die Affinität für NADPH wurde durch 028 und 064 nicht signifikant beeinflusst (Parallelwerte ohne Inhibitor 6-10  $\mu$ M; Literaturwert: 2.8  $\mu$ M; Kanzok *et al.*, 2000). 036 und 049 dagegen erhöhten den  $K_M$  und scheinen daher mit NADPH um den Platz an der entsprechenden Bindungsstelle zu konkurrieren. Weitere Tests deuten daraufhin, dass eine Zeitabhängigkeit der Hemmung nur für Verbindung 049 gegeben ist. Dies bedarf jedoch noch der Bestätigung.

Verbindung	Struktur	IC <sub>50</sub> für PfTrxR	IC <sub>50</sub> für hTrxR
001		7% mit 100 µM	> 200 µM
002		10 µM	80 µM
028		2 µM	50 µM
049		10 µM	90 µM
054		10 µM	~ 2 µM
056		40 µM	> 200 µM
036		2 µM	140 µM
037		30 µM	> 200 µM
045		8 µM	100 µM
059		20 µM	> 150 µM
064		0.5 µM	4 µM
065	*	8 µM	n.d.

**Tabelle 3.6. IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Verbindungen an PfTrxR und hTrxR.**

Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 bzw. 3 unabhängigen Messungen. \*Struktur nicht bekannt.

Für die wirksamsten Verbindungen (028, 036, 049 und 064) wurden außerdem in Anwesenheit der ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen K<sub>M</sub>-Werte für PfTrx bzw. NADPH an der PfTrxR bestimmt. Die Verbindung 054 wurde trotz Effektivität wegen

Komplikationen durch unbekannte Nebenreaktionen nicht weiter berücksichtigt. Bis auf die Variation der Substratkonzentration

(Trx: 2.5–40 µM; NADPH: 1–30 µM) wurden die Assaykomponenten und -bedingungen beibehalten.

Lediglich die Enzymkonzentration wurde jeweils angepasst und variierte daher leicht. Parallel wurde der K<sub>M</sub> in Anwesenheit der entsprechenden DMSO-

Konzentration als Kontrolle ermittelt. Hier lag die Enzymaktivität um 15 mU/ml. Für die Messungen an den Glutathionreduktasen im GR-

Assay wurden 100 µM NADPH und 1 nM GR sowie die in Tabelle 3.6 gelisteten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der Inhibitoren an PfTrxR eingesetzt. Gestartet wurde

mit GSSG ad 1 mM in 1 ml Endvolumen. Die Erfassung der Absorptionsabnahme bei 340 nm erfolgte wiederum bei 25°C und ohne

Vorinkubation. Kontrollen mit der entsprechenden DMSO-Konzentration wurden auch hier berücksichtigt.

### 3.3.5 Inhibitortests an *Plasmodium*-Kulturen

Die drei wirksamsten Verbindungen in Bezug auf PfTrxR und PfGR *in vitro* wurden darüber hinaus hinsichtlich ihres Effektes *in vivo* untersucht. Dazu wurde der Chloroquin-resistente Stamm K1 auf das Ringstadium synchronisiert wie beschrieben. Die Parasitämie wurde auf 1-1.5% und der Hämatokrit auf 3.3% eingestellt. Für jeden Inhibitor wurden von dieser Kultur 12 x 495 und 2 x 500 µl ausgesät (24well-Platten). Die Inhibitoren wurden frisch in DMSO *ad* 10 mM verdünnt, und von dieser Stammlösung ausgehend wurden schrittweise weitere Verdünnungen *ad* 1 mM, 100 µM, 10 µM und 1 µM hergestellt. Das verwendete DMSO wurde dazu sterilfiltriert. Von jeder Verdünnung wurden in doppelter Ausführung 5 µl *ad* 0.5 ml Endvolumen zu den Kulturen pipettiert, so dass Endkonzentrationen von 100, 10, 1, 0.1 und 0.01 µM erreicht wurden. Des weiteren wurden je zwei Kontrollen für die erreichte DMSO-Endkonzentration (1%) präpariert. Die *wells* mit 500 µl Kultur dienten als Kontrolle ohne Zusatz.

Es folgte eine Inkubation bei 37°C unter 3% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> ohne Füttern oder Splitten der Parasiten über 48 h. Nach 24 und 48 h wurden Ausstriche angefertigt. Da sich die Parasitämie während der Entwicklung Ringe → Trophozoiten nicht ändert, erfolgte die Bestimmung der Parasitämie nur für die Proben nach 48 h. Dazu wurden mindestens 5 Gesichtsfelder pro Ausstrich ausgezählt und der Durchschnitt errechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse der Doppelbestimmung gemittelt. Tabelle 3.7 gibt die Ergebnisse wieder.

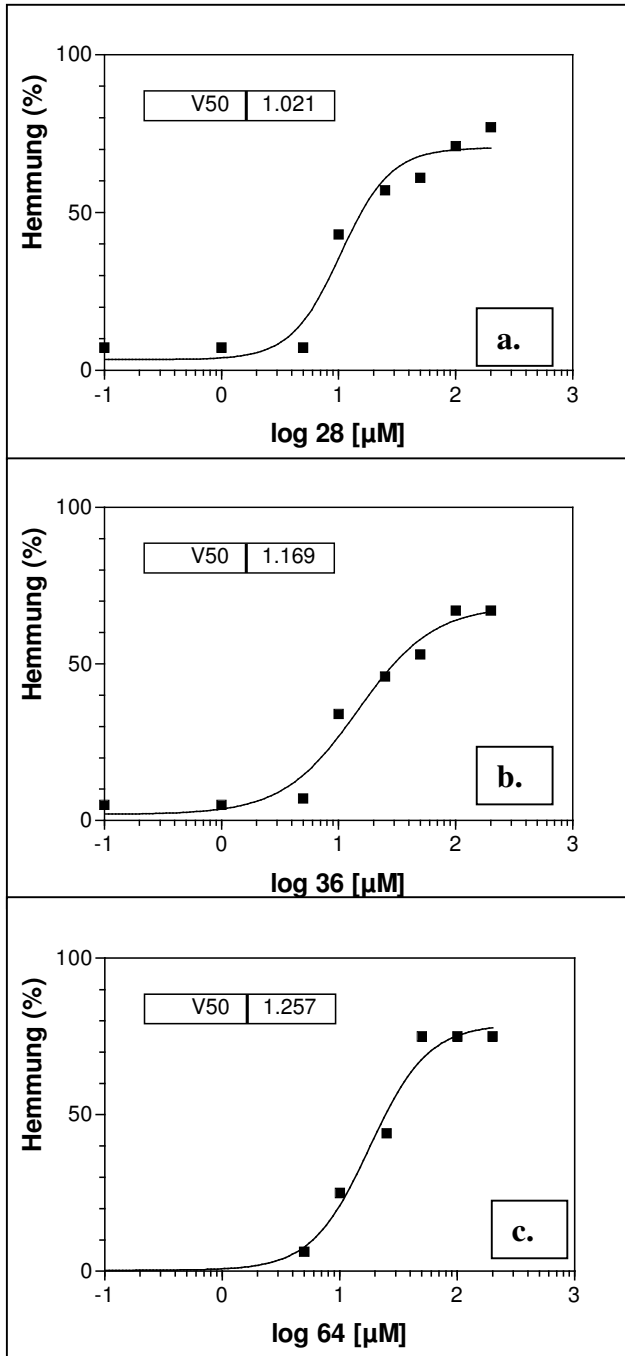
Inhibitorkonzentration (µM)	Parasitämie nach 48 h (Hemmwirkung in %)		
	028	036	064
100	1.58% (81%)	1.53% (84%)	2.18% (73%)
10	3.58% (56%)	4.73% (50%)	7.05% (11%)
1	6.1% (26%)	7.15% (23%)	6.77% (15%)
0.1	6.16% (26%)	6.69% (28%)	7.05% (11%)
0.01	7.47% (9.5%)	7.17 % (23%)	7.63% (4%)
/ („Kontrolle DMSO“)	7.01%	9.07%	6.28%
/ („Kontrolle“)	8.25%	9.32%	7.95%

**Tabelle 3.7. Auswirkungen der Verbindungen 028, 036 und 064 auf Plasmodien-Kulturen.**

Anhand der nach 24h durchgeführten morphologischen Beschreibung lässt sich sagen, dass sich die unter dem Einfluss der Verbindungen 028 und 036 nach 24 h herausgebildete Hemmung auch während der zweiten Zyklushälfte gleichmäßig fortsetzte. Mit Verbindung 064 waren weder die Abstufungen zwischen den Verdünnungen noch die Parallelen zwischen den Zeitintervallen deut-

lich. Besonders nach 48 h ist ein deutlicher Wirkungszuwachs erst zwischen 10 und 100 µM zu sehen.

Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism3 wurden anhand der ermittelten Parasitämien die IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen bestimmt. Hierzu erfolgte die Auftragung der prozentualen Hemmung gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration (Abb. 3.22.a, b und c); anhand der Kurven wurden die Inhibitorkonstanten berechnet. Diese ergaben sich zu 10.5, 14.76 und 18.07 µM. Hiermit sind die Unterschiede zwischen den drei Verbindungen relativ gering, was

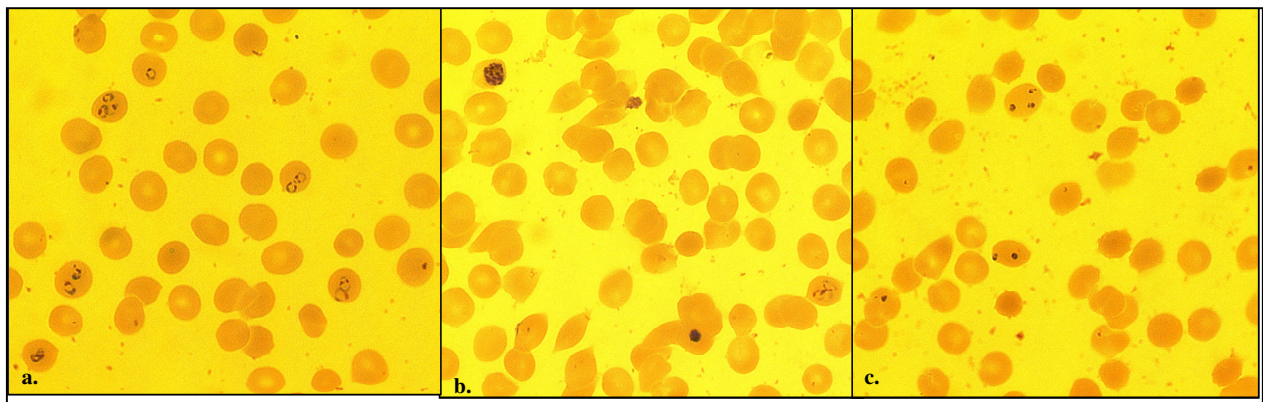


recht gut mit den kinetisch an PfTrxR ermittelten  $IC_{50}$ -Werten korreliert. Lediglich für 064 liegt die Hemmkonstante niedriger als gemäß morphologischer Beschreibung erwartet, aber höher, als nach der Kinetik zu vermuten war.

Abb. 3.22.  $IC_{50}$ -Kurven für die Inhibitoren 028 (a.), 036 (b.) und 064 (c.) an den Kulturen.

Ein Beispiel für den Einfluss der Inhibitoren an den Plasmodienkulturen gibt Abb. 3.23.

Abb. 3.23. Parasitenkulturen ohne (a.) bzw. unter Einfluss von 10 μM (b.) und 100 μM (c.) 028 nach 48h.



### 3.4 Enzymaktivitätstests mit bekannten Redox-Proteinen aus *Plasmodium falciparum*

#### 3.4.1 Reduktion von Peroxiden durch Trx bzw. Grx

Thioredoxine können nicht nur als Elektronendonoren für TPx dienen, sondern sind auch zur Reaktion mit Hydroperoxiden in der Lage (Rahlfs *et al.*, 2003). Die Gültigkeit für PfTrx1 wurde im Rahmen der weiteren Charakterisierung des Proteins untersucht.

In TrxR-Puffer wurden bei RT 100  $\mu\text{M}$  NADPH, 0.1 U/ml hTrxR und verschiedene Konzentrationen Trx1 (5, 10 und 20  $\mu\text{M}$ ) pipettiert und nach Einstellung einer baseline 0.1-10 mM Peroxidsubstrat ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; tBOOH; CuOOH) zugefügt. Die Intensität der Reaktion wurde über den NADPH-Verbrauch bei 340 nm bestimmt. Korrekturen der Absorptionsabnahmen erfolgten für die Peroxidase-Aktivität der TrxR. Unter der Annahme, dass das backup-System eine *steady state*-Konzentration an reduziertem Trx entsprechend der Ausgangskonzentration gewährleistet, konnten, wie beschrieben (Formel (11)), entsprechend einer Reaktion zweiter Ordnung Geschwindigkeitskonstanten berechnet werden:

$$v = k_2 \times [\text{ROOH}] \times [\text{Trx}(\text{SH})_2].$$

Die höchste Reaktivität konnte für die Reaktion  $\text{Trx}(\text{SH})_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  festgestellt werden ( $k_2 = 6.7 \pm 0.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), gefolgt von CuOOH ( $k_2 = 1.3 \pm 0.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Mit tBOOH ergab sich  $k_2 = 0.5 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Die Reduktion verschiedener Hydroperoxide ist für je ein Grx aus Hefe und Reis beschrieben (Collinson *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2004). Die spezifische Aktivität des Hefe-Proteins wurde mit 110.2 U/mg ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ermittelt, aber auch tBOOH und CuOOH werden umgesetzt. Mit tBOOH zeigt das Grx ähnlich gute Peroxidase-Aktivität wie eine eigentliche Peroxidase des Organismus, PHGpx2 (Collinson *et al.*, 2002).

Ein nachweislich nicht mit Peroxiden interagierendes Grx ist das Protein aus *Populus trichocarpa*: Es zeigt mit 150  $\mu\text{M}$  NADPH, 300  $\mu\text{M}$  GSH, 0.5 U/ml Hefe-GR und 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (keine anderen Peroxide getestet!) in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  keine deutliche Reaktion (Rouhier *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bedingungen verwendet:

HEDS-Puffer bzw. TrxR-Puffer, 100  $\mu\text{M}$  NADPH, 0.24-0.5 U/ml GR, Grx-Konzentrationen von 1-25  $\mu\text{M}$  und 0.1-10 mM Peroxid. Gestartet wurde mit dem Substrat nach Grx-Reduktion und die Absorptionsabnahme bei 340 nm verfolgt. Die baseline vor Peroxidzugabe ebenso wie die Reaktion  $\text{GSH} \rightarrow \text{Peroxid}$  wurden berücksichtigt.

Es war jedoch unter keiner der erfolgten Variationen eine signifikante und vor allem konzentrationsabhängige Aktivität des Glutaredoxins zu erkennen.

#### 3.4.2 Reduktion von DHA durch das Trx-System bzw. Grx

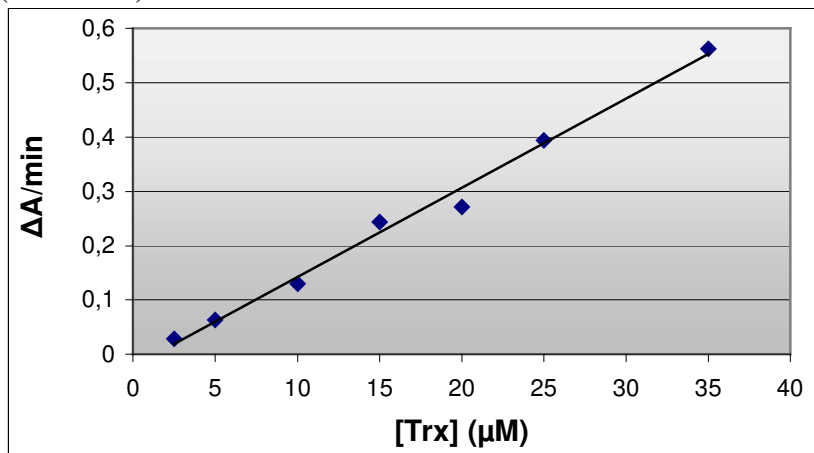
Für Säuger-TrxR ist nachgewiesen, dass sie zur NADPH-abhängigen Reduktion von DHA in der Lage sind (May *et al.*, 1997; Mendiratta *et al.*, 1998). May und Kollegen erbrachten diesen Nachweis u. a. über die Messung der NADPH-Abnahme bei 340 nm. Es wurden in

Tris-EDTA-Puffer bei RT und pH 7.4 0.2 mM NADPH und 20-72 nM TrxR aus Rattenleber verwendet. Bis 8 mM DHA wurde keine Sättigung erreicht.

Die *E. coli*-TrxR dagegen zeigt mit dem Ascorbat-Analogen Alloxan keine Aktivität (Arnér *et al.*, 1996). Da auch das *Plasmodium*-Homolog sich durch die Selenlosigkeit deutlich vom Säuger-Enzym unterscheidet, war zunächst der Frage nachzugehen, ob die DHA-Reduktion mit diesem Merkmal verknüpft ist. Dieser Test wurde mit 0.2 mM NADPH und 195 nM PfTrxR (0.1 U/ml) in TrxR-Puffer durchgeführt. Gestartet wurde mit DHA *ad* 2.5 mM. Es war keine Absorptionsabnahme bei 340 nm und somit keine Umsetzung von DHA feststellbar.

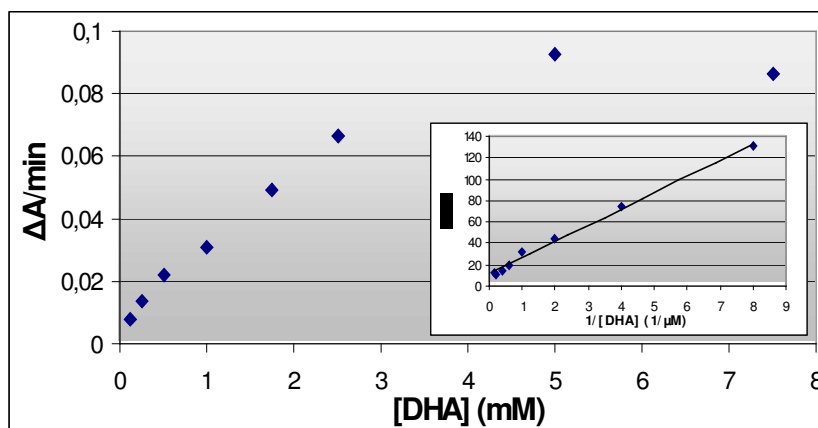
In der erwähnten Studie von May *et al.* wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ M Rattenleber-Trx der  $K_M$  der TrxR für DHA von 2.5 auf 0.7 mM gesenkt. Der  $k_{cat}$ -Wert blieb dabei konstant; unter Verwendung von *E. coli*-Trx änderte sich auch dieser (Anstieg von  $90 \text{ min}^{-1}$  auf  $201 \text{ min}^{-1}$ ).

Unter den hier geschilderten Bedingungen war in Anwesenheit von PfTrx1 eine deutliche, reproduzierbare Reduktion von DHA feststellbar, die von der Trx-Konzentration abhing (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24. Trx-Abhängigkeit der Reaktion  $\text{Trx}(\text{SH})_2 \leftrightarrow \text{DHA}$ .** Unter Verwendung des Trx-Systems bestehend aus 200  $\mu$ M NADPH, 0.1-0.5 U/ml PfTrxR und verschiedenen Trx-Konzentrationen wurde die Reduktion von 1 mM DHA bei 340 nm gemessen.

Unter Annahme einer Reaktion zweiter Ordnung wurde die Geschwindigkeitskonstante berechnet (Tabelle 3.9). Bei der Variation der DHA-Konzentration unter Verwendung von 2  $\mu$ M Trx wurde mit 5 mM DHA eine Sättigung erreicht (Abb. 3.26). Da dies mit 10  $\mu$ M Trx nicht der Fall war, erscheint auch die Annahme einer enzymatischen Reaktion und somit die Ermittlung enzymkinetischer Parameter legitim (Tabelle 3.9).



**Abb. 3.25. DHA-Abhängigkeit der Reaktion  $\text{Trx}(\text{SH})_2 \leftrightarrow \text{DHA}$ .** In Anwesenheit von 200  $\mu$ M NADPH, 0.1 U/ml PfTrxR und 2  $\mu$ M Trx wurde die Reduktion von 0.125-7.5 mM DHA über die NADPH- und somit Absorptionsabnahme bei 340 nm verfolgt. Anhand des Lineweaver-Burk-Plots (Inset) wurde die  $K_M$ -Ermittlung vorgenommen.



### Reduktion von DHA durch Grx

Die DHA-Reduktase-Aktivität von PfGrx wurde unter Einsatz von 200  $\mu\text{M}$  NADPH, 0.7 U/ml GR und 1 mM GSH in TrxR-Puffer getestet. Nach Zugabe von Grx und Einstellung der baseline wurde mit DHA *ad* 0.4 ml Endvolumen gestartet. Es wurde stets um die Reaktion  $\text{GSH} \leftrightarrow \text{DHA}$  korrigiert. Sowohl die Variation der Grx-Konzentration (0.05-10  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von 1 mM DHA als auch die Reduktion unterschiedlicher DHA-Konzentrationen (12.5-2500  $\mu\text{M}$ ) durch 0.5  $\mu\text{M}$  Grx ergaben deutliche Konzentrationsabhängigkeiten. Der  $K_M$  wurde anhand des Lineweaver-Burk-Plot ermittelt und ist wie die spezifische Aktivität in Tabelle 3.9 wiedergegeben. Zusätzlich wurde unter Annahme einer bimolekularen, chemischen Reaktion  $k_2$  kalkuliert.

Die direkte Messung der Entstehung von Ascorbat bei 265 nm (0.4 ml, TrxR-Puffer, 1 mM GSH, Start mit 1 mM DHA) bestätigte die Abhängigkeit von der Grx-Konzentration (0.05-10  $\mu\text{M}$ ). Die absolute Aktivität war jedoch aufgrund der fehlenden Regeneration von GSH geringer als bei 340 nm gemessen. Auch hier wurde um die Kontrolle ohne Grx korrigiert.

### Reduktion von DHA durch Plrx

Um zu testen, ob das Plasmodien-spezifische Redoxprotein Plasmoredoxin (Plrx) DHA reduzieren kann, wurde Plrx mit DTT reduziert wie unter 3.5.11 beschrieben. In TrxR-Puffer wurden anschließend variierende Konzentrationen Plrx mit 1 mM DHA versetzt und der Absorptionsanstieg bei 265 nm gemessen. Die Daten bedürfen zwar noch der Bestätigung, die konzentrationsabhängige Zunahme der Ascorbatreduktion durch Plrx ist jedoch klar erkennbar (Tabelle 3.8).

[Plrx] ( $\mu\text{M}$ )	2.5	5	10	15	20	30	40
$\Delta A_{265}/\text{min}$	0.008	0.017	0.033	0.055	0.069	0.087	0.128

**Tabelle 3.8. Reduktion von DHA durch Plrx.**

In TrxR-Puffer wurde die Reduktion von 1 mM DHA durch verschiedene Konzentrationen reduzierten Plrx<sup>2</sup> bestimmt. Dazu wurde die Absorptionzunahme bei 265 nm gemessen.

Der Absorptionsanstieg in Anwesenheit von 40  $\mu\text{M}$  Plrx entspricht einer Ascorbatreduktion von 9  $\mu\text{M}/\text{min}$  ( $\epsilon_{265} = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Aus den mit 2.5-20  $\mu\text{M}$  Plrx erhaltenen Daten ergibt sich  $k_2 = 4.05 \pm 0.21 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

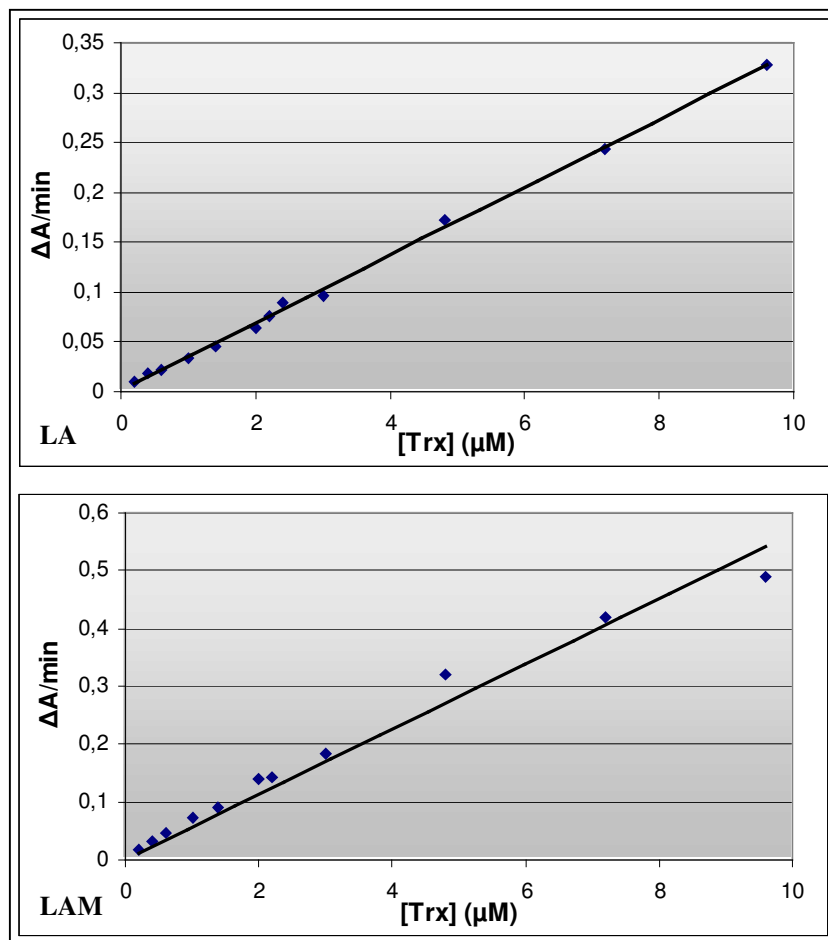
## **3.4.3 Reduktion von Liponsäure/Liponamid**

### Reduktion von LA/LAM durch das Trx-System

Die PfTrxR wurde auch auf ihre Fähigkeit zur Reduktion von LA/LAM untersucht, da entsprechende Aktivität von Säuger-TrxR-Proteinen bekannt ist (Arnér *et al.*, 1996). In 0.4 ml Endvolumen wurden dazu bei RT 200  $\mu\text{M}$  NADPH und 0.95 U/ml PfTrxR in TrxR-Puffer pipettiert und mit LA- bzw. LAM-Konzentrationen von 0.1 bis 2.5 mM gestartet. Mit beiden Substraten ist eine geringe Aktivität messbar. Der  $K_M$  für LA liegt um 1 mM, der  $K_M$  für LAM deutlich darüber. Mit 2.5 mM Substrat, was bzgl. LA einer Sättigung entspricht, wurden 80 mU/mg (LA) bzw. 272 mU/mg (LAM) gemessen. Mit LA liegt  $k_{\text{cat}}$  um 5-10  $\text{min}^{-1}$ .

Da auch eine Reaktion zwischen Trx und LA/LAM beschrieben ist (Holmgren, 1979), wurde der Assay um die Anwesenheit von PfTrx1 erweitert. In verschiedenen Messreihen wurden

Trx- und LA-/LAM-Konzentrationen variiert. Sowohl für die Reduktion von LA als auch von LAM ist eine lineare Konzentrationsabhängigkeit von Trx gegeben.



**Abb. 3.26. Trx-Abhängigkeit der LA- bzw. LAM-Reduktion durch das Trx-System.**

Gemessen wurde mit einem Trx-System aus 200  $\mu\text{M}$  NADPH, 0,1-0,2 U/ml TrxR und variierenden Konzentrationen Trx. Nach Reduktion von Trx wurde mit LA (oben) /LAM (unten) ad 0,5 mM gestartet. Dabei wurden baselines vor Substratzugabe und Kontrollen ohne Trx berücksichtigt und bei  $> 0,01 \text{ min}^{-1}$  die Absorptionsabnahme entsprechend korrigiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei Messreihen.

Da die Variation der LA- bzw. LAM-Konzentration (0,1-4 mM LA / LAM mit 2  $\mu\text{M}$  Trx) trotz ausreichendem backup-System einer Sättigungskinetik folgt, wurden hier neben  $k_2$  auch  $K_M$ -Wert, spezifische Aktivität und  $k_{\text{cat}}$  berechnet (Tabelle 3.9).

#### Reduktion von LA/LAM durch Grx

Die Reduktion von LA bzw. LAM durch Grx wurde mit 200  $\mu\text{M}$  NADPH, 0,7 U/ml GR, 1 mM GSH und 1  $\mu\text{M}$  Grx gemessen. Nach Einstellung einer baseline wurde der Assay mit variierenden Konzentrationen (50-4000  $\mu\text{M}$ ) LA bzw. LAM gestartet. Beide Substrate wurden konzentrationsabhängig umgesetzt; die ermittelten Parameter sind in Tabelle 3.9 aufgelistet. Für Grx (0,2-5  $\mu\text{M}$ ) konnte ebenfalls eine klare Konzentrationsabhängigkeit (mit 0,2 mM LA bzw. LAM) festgestellt werden. Ferner konnte eine Reduktion von Grx durch LAM mit dem LipDH-System als backup detektiert werden. Auch die in der Literatur beschriebene, daran geknüpfte Reduktion von GSSG (Porrás *et al.*, 2002) wurde beobachtet. Diese Messungen werden allerdings erschwert durch die Präferenz der LipDH, die Reaktion zwischen LAM und NAD zugunsten der NAD-Reduktion zu katalysieren (Arnér *et al.*, 1996).

		Trx1	Grx
Peroxide	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$k_2 = 6.7 \pm 0.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	/
	CuOOH	$k_2 = 1.3 \pm 0.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	/
	tBOOH	$k_2 = 0.5 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	/
DHA		$k_2 = 58.5 \pm 5.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $K_M = 1.3 \text{ mM}$ $V_{\max} = 0.5 \pm 0.04 \text{ U/mg}$ $k_{\text{cat}} = 6.91 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$	$k_2 = 919.3 \pm 83.05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $K_M = 150.5 \text{ }\mu\text{M}$ $V_{\max} = 3.28 \text{ U/mg}$ $k_{\text{cat}} = 45.33 \text{ min}^{-1}$ *
LA		$k_2 = 185.8 \pm 19.6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $K_M = 1.56 \text{ mM}$ $V_{\max} = 1.78 \text{ U/mg}$ $k_{\text{cat}} = 23.33 \text{ min}^{-1}$	$k_2 = 551 \pm 44.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $K_M = 362 \text{ }\mu\text{M}$ $V_{\max} = 1.19 \pm 0.63 \text{ U/mg}$ $k_{\text{cat}} = 16.5 \pm 8.7 \text{ min}^{-1}$
		TrxR: $K_M \sim 1 \text{ mM}$ , $V_{\max} = 0.08 \text{ U/mg}$	
LAM		$k_2 = 392.3 \pm 43.9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $K_M = 1.2 \text{ mM}$ $V_{\max} = 2.7 \text{ U/mg}$ $k_{\text{cat}} = 35.99 \text{ min}^{-1}$	$k_2 = 862 \pm 48.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $K_M = 342 \text{ }\mu\text{M}$ $V_{\max} = 1.29 \pm 0.86 \text{ U/mg}$ $k_{\text{cat}} = 17.88 \pm 11.88 \text{ min}^{-1}$

**Tabelle 3.9. Ergebnisse der untersuchten Interaktionen von Trx1 und Grx.**

\*Die GSH-abhängige DHA-Reduktion wurde berücksichtigt.

### 3.5 PfAOP

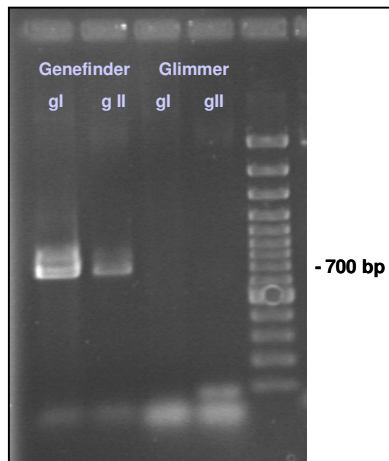
Über das Stichwort *antioxidant* wurde in der Datenbank PlasmoDB die Sequenz für ein *antioxidant protein* in *Plasmodium falciparum* entdeckt (*GeneBank accession number* AY306209). Die annotierte Exonsequenz unterschied sich von den Vorhersagen der Programme Glimmer und Genefinder (letztere identisch mit FullPhat-Sequenz). Gemeinsamkeit der Vorhersagen war die Existenz zweier Exons, die Unterschiede bezogen sich auf Beginn und Länge des ersten Exons.

#### 3.5.1 Identifizierung der Sequenz von AOP

Die folgenden Abschnitte beschreiben die Vorgehensweise bis zum Erhalt des reifen, aktiven AOP, welche aufgrund des Vorhandenseins zweier Signalsequenzen mehrere Schritte von Klonierung, Überexpression und Aktivitätstests umfasste.

Zunächst sollte mit Hilfe einer PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimer OpfAOPvint und OpfAOPh die Transkription des zweiten Exons nachgewiesen werden. Dazu wurden Standard-PCR-Ansätze pipettiert und dem üblichen Temperatur-Zeit-Programm unterzogen, wobei die Annealingtemperatur letztlich auf 50°C herabgesetzt wurde. Die PCR ergab mit den Banken gI und gII das erwartete 510 bp-Produkt ohne weitere Nebenprodukte.

Unter denselben Bedingungen wurde im nächsten Schritt die Richtigkeit der Datenbankvorhersagen bezüglich des ersten Exons untersucht. Zusammen mit dem reverse-Primer OpfAOPh wurden die forward-Oligonukleotide OpfAOPvgen (entsprechend dem Genbeginn nach Genefinder) und OpfAOPvglm (entsprechend dem Anfang nach Glimmer) verwendet. Der Primer der Genefinder-Vorhersage führte zum Produkt der erwarteten Länge (723 bp) mit beiden cDNA-Banken, wie Abb. 3.27 zeigt.



**Abb. 3.27. Verifizierung der AOP-Sequenz nach Genefinder mittels PCR.**

Vorbereitung und Durchführung des 1%igen Agarosegels erfolgte wie beschrieben. Der verwendete Marker ist der GeneRuler™ 100 bp (MBI Fermentas).

Die Richtigkeit des annotierten ersten Exons konnte anhand dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Als mutmaßlich reale Aminosäuresequenz von AOP ergab sich die in Abb. 3.28 dargestellte gesamte Sequenz.

### 3.5.2 Klonierung des AOP-Gens

Unter Verwendung entsprechender Primer mit Schnittenden, OpfAOPvgenB und OpfAOPPhH, wurde das Produkt nun in den Vektor pSKII+ kloniert. Das Start-Methionin wurde nicht mit kloniert, da der später zu verwendende Expressionsvektor pQE30 dieses liefert.

Die Durchführung der PCR erfolgte nach Standardprotokoll mit 50°C Annealing-Temperatur. Beide verwendeten Templates (cDNA-Banken gI und gII) ergaben das gewünschte Produkt, was durch Sequenzierung als das Erwartete bestätigt wurde.

Das PCR-Produkt wurde 2 h bei 37°C verdaut, ansonsten erfolgten Verdau von PCR-Produkt und Vektor und die anschließende Ligation wie beschrieben. Zur Ligation (270 ng Insert und 338 ng Vektor; Insertüberschuss von Faktor 3.8) wurde die T4-Ligase verwendet wie vom Hersteller (MBI) empfohlen.

Ein Klon der transformierten XL1Blue-Zellen wurde sowohl durch Restriktionsverdau als auch durch PCR als korrekt ermittelt. Die Vorgehensweise zur Umklonierung der PfaOP-Sequenz in pQE30 war wie beschrieben; das PfaOPpSK-Plasmid wurde zusätzlich zu *Bam*HI und *Hind*III mit *Sac*II geschnitten, um die Religation zu erschweren. Die eigentliche Ligation wurde mit Hilfe des Ready-to-go™-Kits durchgeführt. Der Erfolg der Umklonierung wurde durch Restriktionsverdau bestätigt.

### 3.5.3 Klonierung und Überexpression der verkürzten Sequenz AOPoS

Die heterologe Expression des AOP-Gens wurde unter diversen Bedingungen getestet. Dazu gehörte die Variation der Temperatur (37°C, 30°C), der Induktions-OD<sub>600</sub> (0.4–0.6), der IPTG-Konzentration (0.3–2 mM) in M15- bzw. XL1Blue-Zellen, z. T. unter Zusatz von Glucose.

Weder die Expressionskontrollen noch Aufreinigungen dieser Expressionen brachten ein positives Resultat.

Die Analyse der *codon usage* (*E. coli* „Codon Usage Analyzer“) ergab, dass 26% der für AOP verwendeten Codons unter einem Schwellenwert von 10% liegen, d. h. in *E. coli* jeweils weniger als 10% der für eine AS benutzten Codons ausmachen. Durch die Verwendung des Rig-Plasmids, das die *codon usage* im Fall von AOP theoretisch auf 12.4% verbessern sollte, konnte jedoch keine Expression des Proteins erreicht werden.

Bei Annahme der Richtigkeit der Genefinder-Sequenz für AOP werden dessen 20 N-terminale AS von Plasmo-DB als Signalpeptid vorhergesagt; darüber hinaus geht das Programm Plasmo-AP von einem Transitpeptid für den Apicoplast aus (5 von 5 Kriterien erfüllt). Auch PATS hält AOP mit einem score von 0.836 (0 = kein Kandidat; 1 = sehr wahrscheinlich Apicoplast-lokalisiert) für ein mögliches Apicoplastenprotein; laut diesem Programm umfasst das allgemeine Signalpeptid die N-terminalen 24 AS. Die Programme TargetP und SignalP errechneten die Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid mit 85 bzw. 92%.

Aufgrund dieser Vorhersagen wurde auch die Klonierung des N-terminal um 24 AS verkürzten Stückes (AOPoS) durchgeführt. Dazu wurde neben OPfAOPhH der Primer OpfAOPB-24 verwendet; als Template diente die klonierte komplette Sequenz. Die Komponenten der PCR wurden dem Standard-Protokoll gemäß eingesetzt. Das Temperatur-Zeit-Programm, welches 30x durchgeführt wurde, enthielt eine 2minütige Extensionszeit pro Zyklus, das Annealing erfolgte bei 58°C. Das PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut und mit Hilfe des Quick-Ligation-Kit direkt in pQE30 kloniert. Die Richtigkeit des Klons wurde mittels Kontrollverdau und Sequenzierung überprüft.

Die darauffolgende Überexpression in M15-Zellen (Vorgehensweise wie beschrieben) war erfolgreich, wenn auch die 1 ml-Kontroll-Pellets dies nicht erkennen ließen. Die Aufreinigung erfolgte wie beschrieben; für 250 ml Kulturvolumen wurde ein Säulenvolumen von 1 ml verwendet. Nach Auftrag des Rohextraktes auf die mit 5 SV US-Puffer äquilibrierte Säule folgte ein Waschschrift von 2 SV US-Puffer, anschließend die Elution mit je 2 SV 30, 50, 75, 150 und 500 mM Imidazol in US-Puffer. Das mit JustBio errechnete Molekulargewicht beläuft sich auf 26.62 kDa, der millimolare Extinktionskoeffizient wurde unter Annahme oxidierter Cysteinreste mit  $\epsilon_{280} = 21.86 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  berechnet.

Das Protein AOPoS zeigte im SDS-Gel eine Doppelbande, eine Eigenschaft, die bereits für TPx1 beobachtet wurde (Rahlf's und Becker, 2001). Durch Zugabe von DTT in 22fachem Überschuss konnte die Doppelbande nicht in eine einzelne überführt werden, und auch nach Aufreinigung unter reduzierenden Bedingungen (2 mM DTT im Pellet) war die Doppelbande noch vorhanden.

### 3.5.4 DTNB-Titration mit AOPoS

Da das aus der Literatur bekannte, homologe Protein aus *Populus trichocarpa* selbst bei Aufreinigung unter nicht-reduzierenden Bedingungen vollständig reduziert ist (2 SH-Gruppen/Monomer (Rouhier *et al.*, 2002), galt ein Test der Frage, ob dies auch für AOPoS nach der standardmäßigen Aufreinigung der Fall ist.

Die Erfassung von SH-Gruppen kann über die Reduktion von DTNB in zwei TNB-Anionen erfolgen, welche bei einer Wellenlänge von 412 nm absorbieren. Die Versuchsbedingungen waren wie unter 3.5.8 beschrieben; mit leichten Modifikationen (TPx-Puffer, 20minütige Inkubation nur *nach* DTNB-Zugabe). In Anwesenheit von 1% SDS wurde eine Netto-Absorption von 0.133 gemessen, was etwa 10  $\mu\text{M}$  TNB, d. h. 10  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen entspricht. Pro Molekül AOPoS wären also 0.5 SH-Gruppen vorhanden. Die unter 3.5.8 geschilderten Versuche zeigen jedoch, dass 1% SDS, wie es von Rouhier *et al.* (2002) verwendet wurde, zur

völligen Denaturierung von AOP nicht ausreicht. Daher ist anzunehmen, dass in AOPoS zumindest eine der beiden SH-Gruppen reduziert vorliegt, die jedoch im nativen Protein nicht oder kaum zugänglich ist.

### 3.5.5 Qualitative Untersuchungen mit AOPoS

Zur Bestimmung möglicher Funktionen von AOPoS wurden verschiedene qualitative Assays durchgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, erfolgten diese Messungen in einem Endvolumen von 0.4 ml bei Raumtemperatur. Es handelte sich stets um gekoppelte Assays, bei denen eine mögliche Aktivität von AOPoS zu einem Verbrauch von NADPH führen sollte, der bei 340 nm spektrophotometrisch gemessen wurde.

Eine eventuelle Funktion als Grx-abhängige Peroxidase wurde untersucht wie in 3.5.9 beschrieben, mit leichten Modifikationen (Konzentrationen von Grx und AOPoS jeweils 1  $\mu\text{M}$ , Verwendung von 70  $\mu\text{M}$  tBOOH als Substrat, Start der Messung durch AOP-Zugabe). Es war hier keine deutliche Aktivität zu verzeichnen. Auch unter veränderten Bedingungen (250  $\mu\text{M}$  GSH, 20  $\mu\text{M}$  AOPoS und 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat) zeigte AOPoS keine Aktivität als Grx-abhängige Peroxidase.

Des Weiteren wurde getestet, ob AOPoS als Glutaredoxin arbeiten kann. Dazu wurde in HEDS-Assay-Puffer 1  $\mu\text{M}$  AOPoS mit 100  $\mu\text{M}$  NADPH, 0.4 U/ml GR und 1 mM GSH gemischt und nach Erfassung der baseline bei 340 nm der Assay mit HEDS *ad* 750  $\mu\text{M}$  gestartet. Verglichen mit der Kontrollaktivität ohne AOPoS ergab sich keine Steigerung der Absorptionsabnahme, AOPoS besitzt also keine Aktivität als Glutaredoxin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verkürzung von AOP auf AOPoS zwar die Überexpression ermöglichte, mit AOPoS jedoch keine deutliche Peroxidase-Aktivität nachweisbar ist.

### 3.5.6 Klonierung der Sequenz für das „reife“ AOP

Da auch AOPoS bei tatsächlicher Lokalisation des Proteins im Apicoplast noch nicht dem reifen Protein entspräche, sondern noch den zweiten Teil der Targetsequenz – das Transitpeptid – beinhalten würde, wurde anhand von BLASTs und damit einhergehenden Alignments versucht, den Start des nativen Proteins zu identifizieren (Abb. A5). Die deutliche Sequenzhomologie zu verschiedenen Prx-Proteinen vom Typ V veranlasste zur Verkürzung des AOPoS N-terminal um weitere 35 AS zu dem putativ reifen Protein (AOPsk).

Zur Klonierung der entsprechenden Sequenz wurde mit Hilfe eines Primers auf den neuen Start, OpfAOPvB, und dem bisher verwendeten OPfAOPhH ein PCR-Produkt von 546 bp Länge generiert (Ansatz und Bedingungen standardmäßig, Annealingtemperatur 50°C). Dieses wurde direkt in pQE30 kloniert. Das entsprechend erhaltene Plasmid wurde anhand von Kontrollrestriktion und Sequenzierung überprüft.

Abb. 3.28 zeigt die verschiedenen bearbeiteten AOP-Varianten.

```
(MRGSHHHHHGS)MRMRRTILIFTVILIPLTFCKNALIKHSINIVSKRGNSKNRFSQKVYESKNIDLENDIKEN
NDLIPNVKVMIDVRNMNNISDTDGSPNDFTSIDTHELFNKKILLISLPGAFTPTCSTKMIPGYEEEEYDYFIKEN
NFDDIYCITNNDIYVLKSWFKSMDIKKIKYISDGNSSFTDSMNMLVDKSNFFMGMRPWRFVAIVENNILVKMFQE
KDKQHNIQTDPYDISTVNNVKEFLKNNQL*
```

**Abb. 3.28. Aminosäuresequenz des PfAOP.**

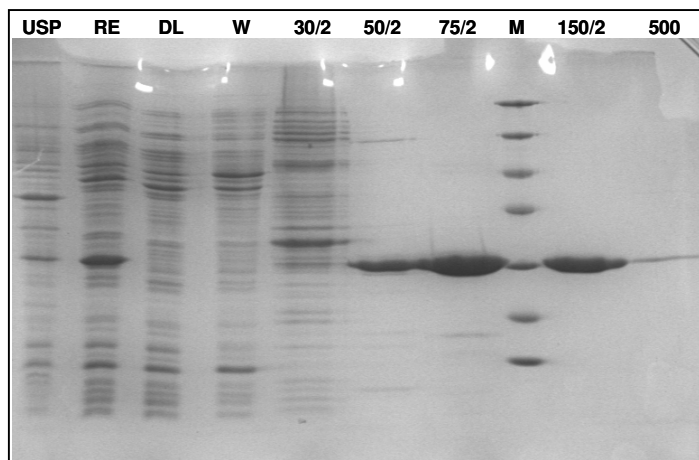
Dargestellt ist die Sequenz voller Länge. Der Abschnitt AOPoS ist grau unterlegt, die Sequenz des reifen Proteins (AOPsk) ist zusätzlich fett gedruckt. Die eingeklammerten Reste werden vom Vektor beigesteuert. An Position 118 (Numerierung vom reifen AOP ausgehend, einschl. Start-M) ist möglicherweise der Datenbankeintrag der Sequenz falsch, denn hier wurde eine Asparagin- (D) statt einer Glutaminsäure (E) festgestellt (unterstrichen).

Die mit Hilfe von JustBio errechneten Parameter für AOPsk sind:

Mw = 22.54 kDa  
 $\epsilon_{280 \text{ nm ox.}}$  = 20.58 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>  
 $\epsilon_{280 \text{ nm red.}}$  = 20.34 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

### 3.5.7 Expression und Reinigung von AOPsk

Die Überexpression mit AOPskpQE30 in M15-Zellen unter den beschriebenen Bedingungen war erfolgreich. Die standardmäßige Aufreinigung (Elutionsprofil wie mit AOPoS) resultierte in sauberem Protein, das in der SDS-PAGE als einzelne Bande bei 25 kDa, also leicht abweichend vom berechneten Molekulargewicht, zu erkennen ist. Eine Doppelbande tritt nicht auf, wie in Abb. 3.29 zu erkennen.



**Abb. 3.29. Aufreinigung von AOPsk.**

Die Fraktionen der Aufreinigung von AOPsk wurden wie beschrieben einer 15%igen SDS-PAGE unterzogen. Die Banden des Markers entsprechen, von oben nach unten, 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 und 14.4 kDa.

Unter Standardbedingungen hatte die Expression eine Ausbeute von 33 – 38 mg/l Kultur. Durch die Verwendung des Rig-Plasmids ergab sich theoretisch (von 22% auf 12% der enthaltenen Codons unter dem

Schwellenwert (10%)), nicht aber praktisch eine Verbesserung.

### 3.5.8 DTNB-Titration mit AOPsk

Aufgrund der unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften von AOPoS und AOPsk war für AOPsk ebenfalls zu klären, ob es sich nach der standardmäßigen Reinigung bereits im reduzierten Zustand befindet, was wegen der zwei vorhandenen Cysteinreste 2 SH-Gruppen pro Molekül bedeuten würde.

20  $\mu$ M AOPsk wurden dazu in HEDS-Puffer 5-20 Minuten im Dunklen inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200  $\mu$ M DTNB *ad* 0.4 ml Endvolumen. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation wurde die Bildung des TNB-Anions bei 412 nm ( $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gemessen. Für jede Probe erfolgte parallel eine Kontrolle ohne AOP, um die die Probe bereinigt wurde.

Die verschiedenen Versuchsanordnungen (nativ/denaturierend; mit/ohne Substrat) zeigt Tabelle 3.10. Es wurden mehrere unabhängige Messreihen durchgeführt, wobei das Protein stets frisch aufgereinigt war (Messung max. 2 Tage nach Reinigung).

		Ø netto- A <sub>412</sub>	[SH-Gruppen] (µM)
Ohne SDS		0.219	<b>16.1 ± 1.5</b>
Mit 1% SDS	Ohne Peroxid	0.25	<b>18.4 ± 0.7</b>
	Mit 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.023	<b>1.7 ± 0.1</b>
	Mit 200 µM tBOOH	0.021	<b>1.5 ± 1</b>
Mit 6 M GuHCl	Ohne Peroxid	0.47	<b>34.6 ± 0.3</b>
	Mit 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *	0.013	<b>1.0</b>

**Tabelle 3.10. DTNB-Titration von AOPsk.**

In 0.4 ml Endvolumen wurden 20 µM AOPsk in HEDS-Puffer mit oder ohne Zusätze 5-20 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der SH-Gruppen durch Zugabe von DTNB ad 200 µM und nochmaliger 20minütiger Inkubation bei 412 nm.

Korrigiert wurde um entsprechende Kontrollen ohne AOPsk, wobei auch die Imidazolkonzentration der AOP-Lösung berücksichtigt wurde. \*Bis auf diesen Assay sind alle Daten Mittelwerte aus 2-5 Messungen.

AOPsk ist direkt nach der Aufreinigung nahezu komplett reduziert, wie aus der DTNB-Titration unter vollständiger Denaturierung ersichtlich (mit GuHCl). Die Zugabe von 1% SDS, wie sie auch in den Versuchen mit dem Pappel-AOP vorgenommen wurde (Rouhier *et al.*, 2002), reicht anscheinend zur völligen Denaturierung nicht aus, wenngleich hier eine etwas höhere SH-Gruppen-Konzentration gemessen wird als ohne SDS. Trotz der nicht völlig exakten Stöchiometrie ist anzunehmen, dass eine der beiden SH-Gruppen im nativen Zustand zugänglich ist. Diese eine nativ zugängliche SH-Gruppe kann sowohl durch tBOOH als auch durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert werden, was eine Peroxidase-Aktivität von AOPsk anzeigt.

### 3.5.9 Enzymkinetische Charakterisierung von AOPsk

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die im Folgenden dargestellten Ergebnisse bei Raumtemperatur in 0.4 ml-Assays mit TrxR-Puffer erlangt. Für das Grx-backup-System wurden stets 150 µM NADPH, 1 mM GSH und 0.5 U/ml GR verwendet. Im Falle des Trx-backup-Systems wurden 150 µM NADPH und 0.2 U/ml TrxR eingesetzt. Nach Zugabe des Elektronendonors und des Peroxiredoxins wurde das Erreichen der baseline abgewartet und der Assay durch Zugabe von 100 µM tBOOH (soweit nicht anders erwähnt) gestartet. Sowohl baseline als auch Kontrollen ohne Elektronendonator bzw. ohne AOP wurden erfasst und ggf. ( $\Delta A > 0.01 \text{ min}^{-1}$ ) abgezogen.

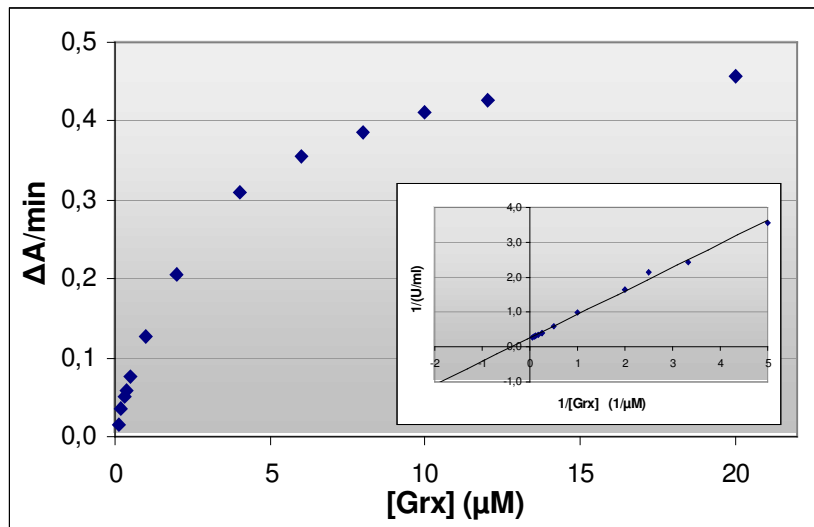
Aufgrund der schnellen Inaktivierung des Peroxiredoxins während der Messung wurden zur Berechnung der Absorptionsabnahme pro Minute nur die Messwerte nach 20 und 30 Sekunden verwendet. Alle gezeigten Daten wurden mehrfach reproduziert.

#### Grx-Abhängigkeit

Zur Bestimmung der Aktivität von AOPsk in Abhängigkeit von der Grx-Konzentration wurden Grx-Konzentrationen zwischen 0.1 und 20 µM verwendet, die Prx-Konzentration betrug 10 µM. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.30 dargestellt. Bei sättigender Grx-Konzentration (20 µM) entsprach die gemessene Aktivität einer spezifischen Aktivität von 0.32 U/mg;  $k_{\text{cat}}$  beträgt  $7.4 \text{ min}^{-1}$ . Die Auftragung der Daten nach Lineweaver-Burk ergab



einen  $K_M = 2.5 \mu\text{M}$  für Grx (Abb.3.31), was mit der halbmaximalen Geschwindigkeit aus den Primärdaten ( $3 \mu\text{M}$ ) gut übereinstimmt. Die katalytische Effizienz von PfaOP mit Grx liegt somit bei  $4.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

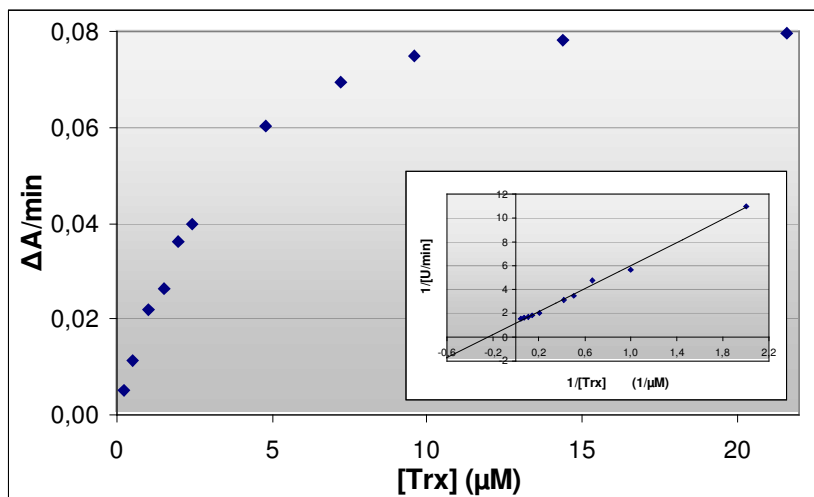


**Abb. 3.30. Grx-Abhängigkeit der Prx-Aktivität.**

Gemessen wurde der durch die Peroxidase-Aktivität von  $10 \mu\text{M}$  AOPsk verursachte NADPH-Verbrauch ( $150 \mu\text{M}$ ) bei  $340 \text{ nm}$  in Anwesenheit von  $0.5 \text{ U/ml}$  GR,  $1 \text{ mM}$  GSH, verschiedenen Grx-Konzentrationen und  $100 \mu\text{M}$  tBOOH. Inset: Reziproke Auftragung der Grx-Variation nach Lineweaver-Burk.

#### Trx-Abhängigkeit

Mit  $10 \mu\text{M}$  AOP wurde die Trx-Konzentration zwischen  $0.3$  und  $22 \mu\text{M}$  variiert; die sonstige Vorgehensweise war wie oben beschrieben. Wie aus Abb. 3.31 ersichtlich, wird auch hier mit etwa  $20 \mu\text{M}$  des Elektronendonors eine Sättigung erreicht. Die mit dieser Trx-Konzentration gemessene Aktivität liegt jedoch lediglich bei  $0.06 \text{ U/mg}$  und ist damit um Faktor  $5.3$  niedriger als mit Grx. Der  $k_{\text{cat}}$  mit Trx errechnet sich zu  $1.3 \text{ min}^{-1}$ , die katalytische Effizienz zu  $0.54 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .



**Abb. 3.31. Trx-Abhängigkeit der Prx-Aktivität.**

Dargestellt ist der bei  $340 \text{ nm}$  gemessene NADPH-Verbrauch von initial  $150 \mu\text{M}$  NADPH, basierend auf der Elektronenweitergabe über  $0.2 \text{ U/ml}$  TrxR und variierende Trx-Konzentrationen an  $10 \mu\text{M}$  AOPsk, welches schließlich  $100 \mu\text{M}$  tBOOH reduziert.

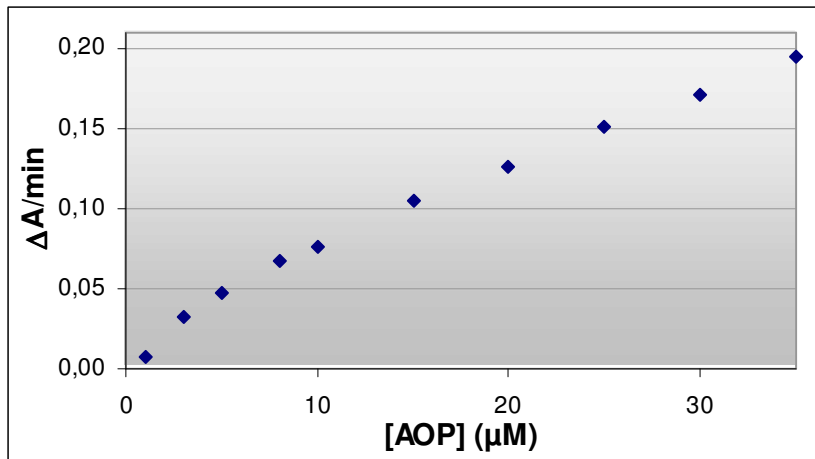
Inset: Auftragung der Trx-Variation nach Lineweaver-Burk.

Anhand der reziproken Auftragung der Primärdaten wurde der  $K_M$  mit  $4 \mu\text{M}$  berechnet (halbmaximale Aktivität in Abb. 3.31 bei  $2.4 \mu\text{M}$ ). Die Affinität zu den beiden Elektronendonoren ist damit, wie auch für PtAOP beobachtet (Rouhier *et al.*, 2001), sehr ähnlich. Die Berechnung von  $K_M$ -Werten geschah in Anlehnung an Rouhier *et al.* (2002), ist jedoch mit Vorbehalt zu sehen, da der Substratüberschuss nicht unter allen Messbedingungen gegeben war.

### Prx-Abhängigkeit mit Grx bzw. Trx

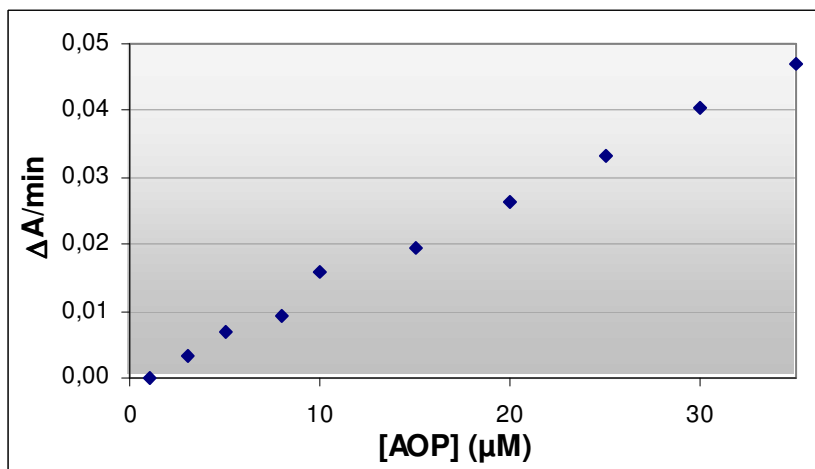
Die Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität von der AOPsk-Konzentration wurde jeweils in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  des Elektronendonors, Grx oder Trx, bestimmt. Die Wahl der Grx- bzw. Trx-Konzentration deutlich unterhalb der Sättigungskonzentration geschah in Anlehnung an die Bedingungen von Rouhier *et al.* (2001). Die Prx-Konzentrationen wurden zwischen 1 und 40  $\mu\text{M}$  variiert.

Für beide backup-Systeme war eine klare Abhängigkeit von der AOP-Konzentration messbar (Abb. 3.32 und 3.33).



**Abb. 3.32. Prx-Abhängigkeit der Aktivität bei 0,5  $\mu\text{M}$  Grx.**

Die Erfassung der Aktivität in Form des NADPH-Verbrauchs bei 340 nm durch die Umsetzung von 100  $\mu\text{M}$  tBOOH wurde mit 150  $\mu\text{M}$  NADPH, 0,5 U/ml GR, 1 mM GSH und 0,5  $\mu\text{M}$  Grx bei variierenden Konzentrationen AOPsk durchgeführt.

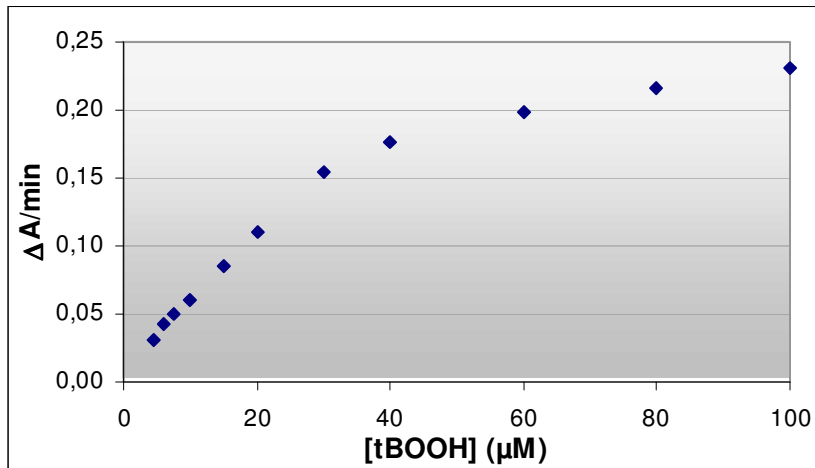


**Abb. 3.33. Prx-Abhängigkeit der Aktivität bei 0,5  $\mu\text{M}$  Trx.**

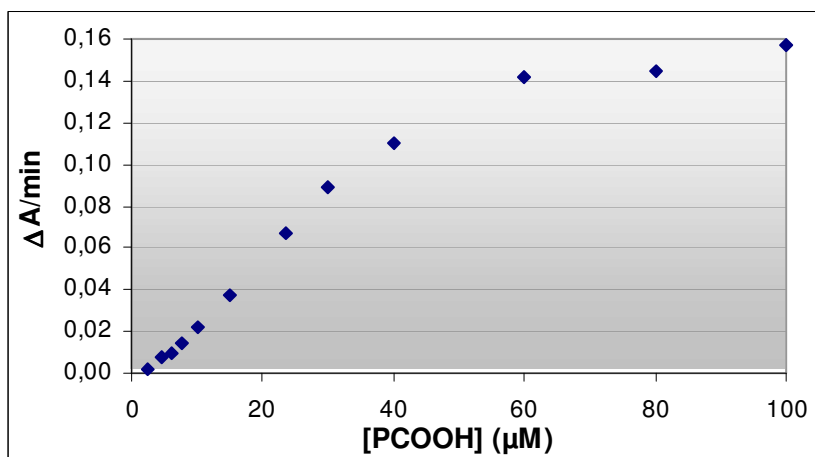
Gemessen wurde die Prx-Aktivität verschiedener AOPsk-Konzentrationen in Anwesenheit von 150  $\mu\text{M}$  NADPH, 0,2 U/ml TrxR, 0,5  $\mu\text{M}$  Trx und 100  $\mu\text{M}$  tBOOH.

### Vergleich verschiedener Substrate

Während  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{CuOOH}$  sich nur mäßig als Substrate für AOPsk eignen, ist neben tBOOH auch die Reduktion von Phosphatidylcholinhydroperoxid (PCOOH) recht effektiv. Für letztere zwei Substrate wurden daher vergleichend Aktivitäten gemessen und unter Verwendung des Grx-Systems Abhängigkeitskurven erstellt. Die dabei verwendeten Bedingungen waren wie in vorigen Abschnitten für das Grx-System beschrieben. Von AOPsk wurden 5  $\mu\text{M}$ , von Grx 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.34 und Abb. 3.35 dargestellt.



**Abb. 3.34. Abhängigkeit der AOPsk-Aktivität von der tBOOH-Konzentration.**



**Abb. 3.35. Abhängigkeit der AOPsk-Aktivität von der PCOOH-Konzentration.**

**Abb. 3.34 und Abb. 3.35.** In Anwesenheit des Grx-Systems bestehend aus 150 μM NADPH, 0.5 U/ml GR, 1 mM GSH und 10 μM Grx wurde in 0.4 ml Endvolumen und TrxR-Puffer die Umsetzung variierender Konzentrationen tBOOH (a.) bzw. PCOOH (b.) durch 5 μM AOPsk bei 340 nm gemessen.

Das Verhalten von AOPsk gegenüber den beiden Peroxiden ist sehr ähnlich. Maximale Aktivität wird mit etwa 100 μM, halbmaximale Geschwindigkeit wird mit ~ 25 μM erreicht. Die Ergebnisse des direkten Vergleichs verschiedener Peroxidsubstrate sind in Tab. 3.11 dargestellt.

	tBOOH	PCOOH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CuOOH
Spezifische Aktivität (U/mg)	0.25	0.18	0.02	0.01

**Tabelle 3.11. Umsetzung verschiedener Hydroperoxide durch AOPsk.**

In Anwesenheit von 10 μM AOPsk und dem Grx-backup-System (150 μM NADPH, 0.5 U/ml GR, 1 mM GSH, 10 μM Grx) wurden je 100 μM Peroxidsubstrat getestet.

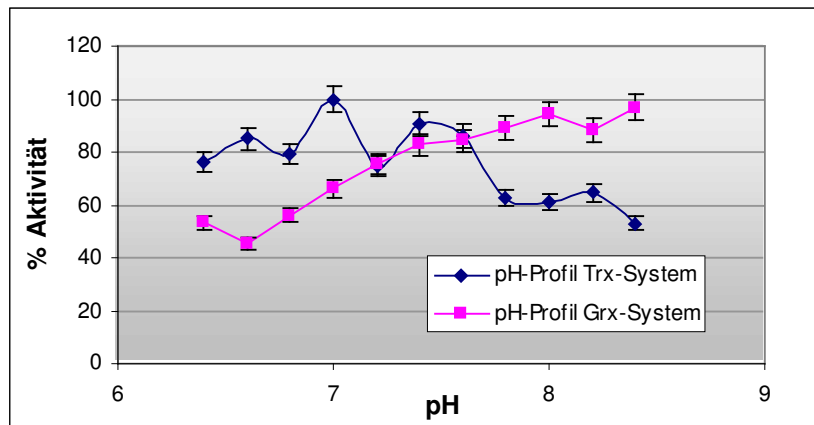
### 3.5.10 pH-Verhalten

Die pH-Profile für die Aktivität von AOPsk wurden mit den beiden backup-Systemen unter Verwendung von 10 μM Trx bzw. Grx erstellt. Die Prx-Konzentration betrug 2 μM (bei Verwendung des Grx-backups) bzw. 10 μM (im Falle des Trx-backups). Gemessen wurde bei pH-Werten zwischen 6.4 und 8.4. Für jede Messreihe wurde die höchste erhaltene Aktivität *ad* 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Für beide Systeme wurden die Ergebnisse zweier Messreihen gemittelt.

Zu erkennen ist mit dem Trx-System ein biphasischer Verlauf des Profils mit Maxima bei pH 7.0 und 7.4. Es kann also von einem breiten pH-Optimum im physiologischen Bereich

gesprochen werden. Bei pH-Werten > 7.6 nimmt die Aktivität drastisch ab. Gegenüber sauren pH-Werten ist das System dagegen toleranter.

Unter Verwendung des Grx-Systems ist, was extreme pH-Werte betrifft, genau das Gegenteil zu beobachten: Im sauren Milieu ist die Aktivität deutlich eingeschränkt, dagegen steigt sie im basischen kontinuierlich an. Im physiologischen pH-Bereich (zwischen 7.2 und 7.6) dagegen sind die Aktivitäten mit beiden Systemen in etwa übereinstimmend.



**Abb. 3.36. pH-Profile von AOPsk mit Trx- bzw. Grx-backup-System.**

Gemessen wurde in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Trx bzw. Grx unter den für die kinetische Charakterisierung beschriebenen Bedingungen. Die Prx-Konzentration betrug 2  $\mu\text{M}$  (Grx-System) bzw. 10  $\mu\text{M}$  (Trx-System).

### 3.5.11 Reduktion von AOPsk durch Plrx

Aufgrund des bislang noch sehr begrenzten Wissens über mögliche *in vivo*-Funktionen des *Plasmodium*-spezifischen Proteins Plasmoredoxin war es nahe liegend, dessen Fähigkeit zur Reduktion von AOPsk zu testen. Bis dahin war neben dem niedermolekularen GSSG und dem artefiziellen Disulfidsubstrat Insulin die Ribonucleotid-Reduktase aus *T. brucei* das einzige Protein, für das Reduzierbarkeit durch PfPlrx gezeigt wurde (Becker *et al.*, 2003).

Für die Erfassung einer Interaktion zwischen PfPlrx und AOPsk wurde eine Endpunktbestimmung als Ansatz gewählt. Grundlage für die Messungen war die Bestimmbarkeit verfügbarer SH-Gruppen durch Bildung des TNB-Anions ( $\epsilon_{412} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) aus DTNB. Reduziertes Plasmoredoxin sollte bei Zugänglichkeit aller Cysteine im nativen Zustand 4 SH-Gruppen pro Molekül besitzen. Bei gegebener Reduzierbarkeit von AOPsk durch Plrx sollten in Anwesenheit von tBOOH Elektronen auf das Peroxid weitergeleitet werden und somit zur Reduktion von DTNB nicht mehr zur Verfügung stehen. Zur Annahme der Elektronentransferkette  $\text{Plrx} \rightarrow \text{AOPsk} \rightarrow \text{tBOOH}$  hatte ferner der Ausschluss einer direkten Reduktion des Peroxids durch Plrx zu erfolgen.

#### Positivkontrolle mit Trx

Da AOPsk Trx als Elektronendonator akzeptiert, wurde als Positivkontrolle ein entsprechender Versuch mit Trx statt Plrx durchgeführt. Dazu wurde Trx1 für 1 h auf Eis mit DTT im Überschuss inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit US-Puffer um Faktor 4 verdünnt *ad* 0.5 mM DTT und über 0.5 ml SV gewaschen (mit 5 SV US) Ni-NTA-Materials gegeben. Nach einem Waschschrift von 5 SV US-Puffer wurde mit 200 mM Imidazol in US-Puffer eluiert und 100  $\mu\text{l}$ -Fraktionen aufgefangen. Nach Konzentrationsbestimmung über  $A_{280}$  wurden die proteinhaltigen Fraktionen gepoolt und nochmals die Trx-Konzentration des Pools bestimmt.

In 100  $\mu\text{l}$ -Ansätzen wurden nun in verschiedenen Kombinationen TrxR-Puffer mit reduziertem Trx, AOPsk und tBOOH gemischt. Trx war in jedem Ansatz *ad* 100  $\mu\text{M}$  enthalten. Wenn verwendet, betrug die AOPsk-Konzentration 40  $\mu\text{M}$  und die tBOOH-Konzentration 200  $\mu\text{M}$ . Die Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 3.12. veranschaulicht. Probe 1 sollte die Reduktion von Trx bestätigen. Probe 4 sollte zeigen, dass in gegebenen Konzentrationen tBOOH nicht von Trx direkt reduziert wird. Für Probe 3, die Trx und AOPsk enthielt, waren zumindest ebenso viele SH-Gruppen zu erwarten wie für die Probe ohne AOPsk (Probe 1). In Probe 2 dagegen sollten die Elektronen von Trx über AOPsk auf tBOOH übertragen werden und daher wenige bis keine SH-Gruppen mehr messbar sein. Die Bestimmung der SH-Gruppen erfolgte nach Verdünnung der Inkubationsansätze mit TrxR-Puffer um Faktor 10. Die Absorption des verdünnten Ansatzes bei 412 nm wurde als Nullwert eingestellt und nach Zugaben von 400  $\mu\text{M}$  DTNB erneut bestimmt. Messungen erfolgten direkt und nach 15 minütiger Inkubation.

Nr. der Probe → Komponente ↓	1	2	3	4
TrxR-Puffer	+	+	+	+
PfTrx1	+	+	+	+
PfAOPsk	-	+	+	-
tBOOH	-	+	-	+
SH-Äquivalente ( $\mu\text{M}$ ) ohne Inkubation	<b>20.5</b>	<b>11.8</b>	<b>21.0</b>	<b>20.1</b>
SH-Äquivalente ( $\mu\text{M}$ ) nach 15 min. Inkubation	<b>20.5</b>	<b>9.1</b>	<b>21.5</b>	<b>18.4</b>

**Tabelle 3.12.**  
**Pipettierschema und**  
**Ergebnisse der SH-**  
**Gruppenbestimmung**  
**der Messreihe Trx →**  
**AOPsk.**

In TrxR-Puffer wurden, je nach Probe, 100  $\mu\text{M}$  vorreduziertes Trx mit 40  $\mu\text{M}$  AOPsk und 200  $\mu\text{M}$  tBOOH gemischt und nach Verdünnung um Faktor 10 durch Zugabe von 400  $\mu\text{M}$

DTNB die SH-Äquivalente bei 412 nm bestimmt.

Wie anhand von Probe 1 ersichtlich, war die Reduktion von Trx mittels DTT erfolgreich, denn es wurden die bei vollständiger Reduktion zu erwartenden 20  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen gemessen (10  $\mu\text{M}$  Trx im Endvolumen, 2 SH-Gruppen pro Molekül). Die leichte Überschätzung der SH-Gruppen-Konzentration ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass keine Bestimmung des Hintergrundes durchgeführt wurde. Die Anwesenheit von AOPsk macht für die Erfassung der SH-Gruppen keinen Unterschied (Probe 3). Anhand von Probe 4 wird deutlich, dass unter gegebenen Bedingungen weder sofort noch nach 15 Minuten eine signifikante Elektronenübertragung von Trx auf tBOOH stattfindet. In Anwesenheit von AOPsk ist das jedoch der Fall, was erwartet und durch Probe 2 gezeigt wurde. Allerdings ist die Übertragung nicht vollständig, wie dies im entsprechenden Assay mit TPx1 und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe 3.6.2) oder auch bei der DTNB-Titration mit AOPsk beobachtet werden konnte. Erklärt werden könnte dies mit der Inaktivierung des Prx durch das Peroxid oder aber damit, dass es sich bei AOPsk in erster Linie um eine Grx-abhängige Peroxidase handelt, während TPx1 ein klassisches Trx-abhängiges Prx ist. Ferner ist der Konzentrationsunterschied (Endkonzentrationen AOPsk 4  $\mu\text{M}$  vs. 8  $\mu\text{M}$  TPx1) zu berücksichtigen, welcher angesichts der für beide Proteine beobachteten Inaktivierung durch Peroxide möglicherweise nicht zu vernachlässigen ist.

### Versuch zur Reduktion von AOPsk durch Plrx

Nachdem mittels Trx die Funktionstauglichkeit des Versuchsaufbaus sichergestellt war, wurden für das eigentliche Experiment die Reduktion von Plrx mittels DTT und anschließende Separation über Ni-NTA-Agarose vorgenommen wie für Trx1 beschrieben. Der Proteingehalt der eluierten Fraktionen wurde bei 280 nm gegen 200 mM Imidazol in US-Puffer gemessen ( $\epsilon_{280} = 31.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und die proteinhaltigen Fraktionen gepoolt. Anschließend wurden nach nochmaliger Proteinbestimmung des Pools verschiedene Inkubationsansätze in TrxR-Puffer vorbereitet. PfPlrx war in allen Proben-Ansätzen in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  vorhanden; die Kontrollen dienten der Erfassung möglicher Reaktionen ohne Plrx. Von AOPsk wurde in den entsprechenden Ansätzen 40  $\mu\text{M}$  verwendet, die tBOOH-Konzentration betrug 200  $\mu\text{M}$ . Tabelle 3.13 gibt die Pipettierschemata für Proben (P)- und Kontrollansätze (K) wieder. Messungen erfolgten direkt und nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Dazu wurden jeweils 40  $\mu\text{l}$  des Inkubationsansatzes mit TrxR-Puffer auf 400  $\mu\text{l}$  Endvolumen verdünnt und durch Zugabe von DTNB *ad* 400  $\mu\text{M}$  die in der Lösung vorhandenen und zugänglichen SH-Gruppen über die Entstehung von TNB-Anionen bei 412 nm bestimmt.

Nr. der Probe / Kontrolle →	P1	P2	P3	P4	K1	K2	K3	K4
Komponente ↓								
Plrx	+	+	+	+	-	-	-	-
AOPsk	-	+	+	-	-	+	+	-
tBOOH	-	+	-	+	-	+	-	+
SH-Äquivalente* t = 0 ( $\mu\text{M}$ )	<b>38.3</b> ± 3.4	<b>26.4</b> ± 4.4	<b>38.1</b> ± 3.3	<b>37.1</b> ± 3.2	<b>4.6</b> ± 0.5		<b>6.1</b> ± 0.7	<b>4.6</b> ± 0.5
SH-Äquivalente* t = 15 ( $\mu\text{M}$ )	<b>37.3</b> ± 2.5	<b>21.1</b> ± 3.5	<b>36.8</b> ± 3.1	<b>33.3</b> ± 3.3	<b>Siehe t = 0</b>			

**Tabelle 3.13. Zusammensetzung der Proben- und Kontrollansätze zur Erfassung der Interaktion Plrx → AOPsk und Ergebnisse der Messungen.**

Je nach Ansatz wurden 100  $\mu\text{M}$  reduziertes Plrx mit 40  $\mu\text{M}$  AOPsk und 200  $\mu\text{M}$  tBOOH in TrxR-Puffer gemischt. Ein Aliquot des Inkubationsansatzes wurde mit TrxR-Puffer um Faktor 10 verdünnt und zur Erfassung der SH-Äquivalente bei 412 nm mit 400  $\mu\text{M}$  DTNB versetzt. P1-4: Probe 1-4. K1-4: Kontrolle 1-4. Die Unterschiede der Kontrollen K1, K2 und K4 waren vernachlässigbar, daher wurden die Absorptionswerte der Proben um einen Durchschnittskontrollwert (4.6  $\mu\text{M}$  SH) korrigiert. Kontrollwerte nach 15minütiger Inkubation wiesen keine Unterschiede zu denen an t = 0 gemessenen Werten auf. Die aufgelisteten SH-Gruppenkonzentrationen ergeben sich aus Division der Nettoabsorption bei 412 nm mit dem millimolaren Extinktionskoeffizient des TNB<sup>-</sup> ( $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

\* Alle Werte stellen Durchschnitte aus 4-5 unabhängigen Messungen dar. Für jede Messreihe wurden die SH-Gruppenkonzentrationen berechnet und diese anschließend gemittelt.

Wie bei vollständiger Reduktion von Plrx durch DTT erwartet, wurden für Probe 1 (entsprechend Reaktion Plrx → DTNB) 40  $\mu\text{M}$  TNB-Anion entsprechend 40  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen detektiert. Die 4 Thiole des Plrx-Moleküls sind somit nativ zugänglich und redoxaktiv. In Anwesenheit von AOPsk (Probe 3) wurden die Elektronen letztlich ebenfalls quantitativ auf DTNB übertragen. Eine erwähnenswerte Autoxidation durch die 15 minütige

Inkubation fand nicht statt. Probe 4 sollte ausschließen, dass Plrx selbst bereits zur Reduktion von tBOOH in der Lage ist.

Bei sofortiger Messung war nahezu keine Interaktion festzustellen (37.1  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen vorhanden), und auch nach 15minütiger Inkubation hatte nur eine begrenzte Oxidation stattgefunden (3.8  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen; bei Berücksichtigung von  $\sim 1$   $\mu\text{M}$  Autoxidation (Probe 1 und 3) 2.8  $\mu\text{M}$ ). Die direkte Interaktion zwischen Plrx und tBOOH ist also deutlich geringer als zwischen Plrx und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe 3.6.2). Da jedoch auch in der eigentlichen Probe während der Inkubationszeit nur eine geringe Weiterreaktion stattfand (5.3  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen), scheint eine Berücksichtigung dennoch ratsam. Dadurch verringert sich die auf das Prx zurückführbare, zeitabhängige Oxidation in P2 auf 1.5  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen in 15 Min. Die spontane Elektronenweiterleitung von Plrx über AOPsk auf tBOOH bewirkte den Verlust von 11.7  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen. Nach 15 Minuten sind annähernd 20  $\mu\text{M}$  SH-Äquivalente übertragen, was einem vollständigen Reaktionsablauf entspricht, da zwar alle 4 SH-Gruppen des Plrx potentiell redoxaktiv sind, jedoch nur zwei zum putativen aktiven Zentrum gehören.

Aufgrund dieser Daten kann also festgehalten werden, dass Plrx als Elektronendonator für AOPsk dienen kann, des weiteren, dass tBOOH im Gegensatz zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  weder spontan noch zeitabhängig deutlich durch Plrx reduziert wird. Schließlich wird durch die Ergebnisse auch die Annahme zweier katalytisch aktiver Cysteinreste in Plrx gestützt.

### 3.5.12 Qualitative Untersuchungen zur Funktion von AOPsk

#### Test der DHA-Reduktase-Aktivität von AOPsk

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit festgestellten unspezifischen Dehydroascorbatreduktase-Aktivität der PfTPx1 (siehe 3.6.3) wurde diese auch für AOPsk getestet. In diesem Zusammenhang erwies sich das Grx-backup-System als ungünstig, da PfGrx selbst, wie im entsprechenden Teil der Arbeit besprochen und für andere Glutaredoxine aus der Literatur bekannt, DHA reduzieren kann (Wells *et al.*, 1990). Mit dem Trx-System musste ebenfalls eine Hintergrundreaktion in Kauf genommen werden, da Dehydroascorbat auch mit PfTrx1 interagiert (siehe 3.4.2). Unter den gewählten Bedingungen war die Reaktion aber schwach genug, um die Beobachtung einer eventuellen Verstärkung durch AOPsk zuzulassen.

In einem Endvolumen von 0.4 ml wurden in TrxR-Puffer zunächst 10  $\mu\text{M}$  Trx durch 0.1 U/ml TrxR in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  NADPH reduziert. Dann erfolgte die Zugabe von AOPsk *ad* 40  $\mu\text{M}$  und nach Einstellung der baseline der Start des Assays mittels 80  $\mu\text{M}$  Dehydroascorbat.

Der bei 340 nm gemessene NADPH-Verbrauch wurde durch die Anwesenheit von 40  $\mu\text{M}$  AOPsk im Vergleich zur entsprechenden Prx-freien Kontrolle nicht signifikant verstärkt. Die Erhöhung der NADPH-Konzentration auf 200  $\mu\text{M}$  und der DHA-Konzentration auf 2 mM brachte keine Veränderung des Ergebnisses. AOPsk hat demnach keine DHA-Reduktase-Aktivität.

#### Test einer Ascorbat-Peroxidase-Aktivität von AOPsk

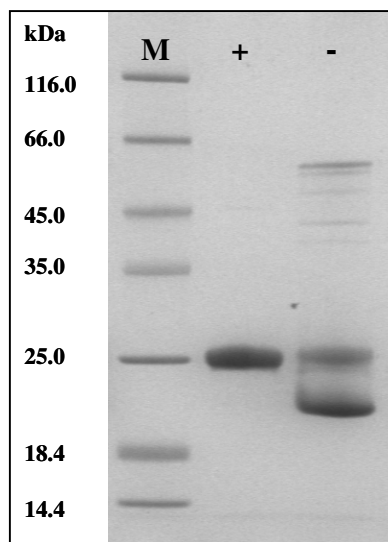
Ascorbat-abhängige Peroxidasen stellen bei Pflanzen einen Teil des Ascorbat-Glutathion-Zyklus dar, der der Peroxidengiftung in Chloroplasten, aber auch in Mitochondrien dient

(Chew *et al.*, 2003). Es wurde daher überprüft, ob AOPsk eine solche Funktion besitzt. Dazu wurde in einem 0.4 ml-Assay in TrxR-Puffer der Umsatz von 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  AOPsk und 100  $\mu\text{M}$  tBOOH bei 265 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge wurde der millimolare Extinktionskoeffizient von Ascorbat mit  $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  angenommen (z.B. Chew *et al.*, 2003). Die Abnahme von 1.5  $\mu\text{M}$  Ascorbat pro Minute im Kontrollassay ( $\Delta A = -0.0215 \text{ min}^{-1}$ ) wurde durch die genannte Konzentration AOPsk nicht verstärkt.

Unter den gegebenen Bedingungen ist AOPsk nicht als Ascorbatperoxidase aktiv.

### 3.5.13 Oligomerisierung / FPLC-Verhalten

Bei reduzierender SDS-PAGE von AOPsk zeigt sich nur eine Bande, ist dagegen kein Reduktionsmittel ( $\beta\text{-ME}$  / DTT) zugegen, ergeben sich zum einen die Doppelbande, zum anderen in geringem Maße auch Banden, die möglicherweise Dimerformen entsprechen (Abb. 3.37). Um zu testen, ob auch nativ solche Formen existent sind, wurden Gelfiltrationen durchgeführt.



**Abb. 3.37. Reduzierende/nicht-reduzierende SDS-PAGE von AOPsk.** Auf ein 15%iges SDS-Gel wurden jeweils 5  $\mu\text{g}$  AOPsk in An- bzw. Abwesenheit von  $\beta\text{-ME}$  im Probenpuffer aufgetragen. Markerbanden von oben nach unten: 116.0 kDa, 66.2 kDa, 45.0 kDa, 35.0 kDa, 25.0 kDa, 18.4 kDa, 14.4 kDa.

#### Gelfiltration mit AOPsk

Zur Untersuchung des nativen Oligomerisierungszustandes von AOPsk wurden Gelfiltrationen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde die HiLoad-Säule Superdex 75 (Amersham Pharmacia) mit mindestens 2.5 SV des Laufpuffers äquilibriert; anschließend wurden 1.5-2 mg Protein in einem Volumen von 0.4-0.6 ml aufgegeben. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min über 1 SV ( $\sim 120 \text{ ml}$ ), wobei in 2 ml-Portionen fraktioniert wurde. Die

verwendeten Zusätze zur Proteinlösung und erhaltene Peaks sind in Tabelle 3.14 aufgelistet.

Unter allen Bedingungen vorhanden ist ein Peak entsprechend  $\sim 37 \text{ kDa}$  (mit Superdex 200 39 kDa) und fast immer auch einer entsprechend 53 kDa. Die 53 kDa-Form tritt stets nur in sehr geringen Anteilen (max. 11%) auf; zu erkennen ist jedoch die Tendenz einer Zunahme unter Oxidation bzw. hoher NaCl-Exposition. Bei Behandlung des Proteins mit tBOOH bzw. hohen Konzentrationen NaCl erscheint ferner ein Peak im Ausschlussvolumen. Das entsprechende Molekulargewicht liegt  $> 250 \text{ kDa}$ , da diese Form auch bei Verwendung einer Superdex 200-Säule im Ausschlussvolumen eluierte. Nach der SDS-PAGE zu urteilen, handelt es sich bei allen drei Formen um AOP; dem errechneten  $M_w$  zufolge (22.54 kDa) stellt der 37 kDa-Peak eher das Dimer (errechnet 45.08 kDa) dar. Diese Annahme wurde durch die Aufklärung der Kristallstruktur bestätigt (Sarma *et al.*, 2005). Sowohl Dimer als auch Multimer scheinen über nicht-kovalente Wechselwirkungen zustande zu kommen, da unter denaturierender SDS-PAGE entweder nur die Monomerbande auftritt oder diese den



Hauptanteil hat. Der geringe Dimeranteil in Abb. 3.37 stellt wahrscheinlich ein Oxidationsartefakt dar.

Zusätze	Peak 1		Peak 2		Peak 3	
	MG (kDa)	% der Peakfläche	MG (kDa)	% der Peakfläche	MG (kDa)	% der Peakfläche
/	37.3	94	53.8	3		
2 mM DTT 1h inkubiert	36.0	89	/	/	/	/
2 mM tBOOH 1h inkubiert	36.7	74	52.5	11	AV	11
3x1h Dialyse gg. 30 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 8	36.3	83	52.5	8	AV	9

**Tabelle 3.14. Bedingungen und Ergebnisse der Gelfiltrationen mit AOPsk.**

Zur Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens von AOPsk wurden 1.5-2 mg Protein unter Verwendung verschiedener Zusätze auf eine äquilibrierte Superdex 75-Säule aufgegeben. Als Laufpuffer wurde US-Puffer, pH 8.0 benutzt (Ausnahme: Lauf mit NaCl, hier wurden 30 mM Tris, 1.5 mM NaCl, pH 8.0 eingesetzt). Mit einer Flussrate von 1 ml/min wurde über 1 Säulenvolumen eluiert, wobei 2 ml-Fractionen aufgefangen wurden.

Die Doppelbande, die mit AOPoS immer präsent war, zeigt sich mit AOPsk im Gel nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Letzteres führt zu der Annahme, dass es sich dabei zumindest im Fall von AOPsk um ein Oxidationsresultat handelt. Da in der Gelfiltration nicht vorhanden, scheint die Oxidation ein Artefakt des der SDS-PAGE vorangehenden Behandlungsprozesses zu sein.

#### Massenspektrometrie-Analyse

Um die Identität und Beschaffenheit der beiden unter nicht-reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel erhaltenen Banden näher zu untersuchen, wurden diese aus dem Gel ausgestochen, tryptisch verdaut und der Massenspektrometrie unterzogen.

Es stellte sich heraus, dass es sich in beiden Fällen um AOPsk handelt. Die eindeutig identifizierbaren Peptide decken in der unteren Bande 73% der AOP-Sequenz ab, in der oberen Bande beträgt die Abdeckung 61%. Leider konnte jedoch die Modifikation, die zur Entstehung der unteren Bande geführt hat, über diese Methode nicht nachgewiesen werden: Alle zugeordneten Peptide sind in beiden Banden identisch; es ist daher eher unwahrscheinlich, dass die untere Bande ein Spaltprodukt darstellt, wie bei der TPx aus humaner Erythrozyten-Plasmamembran der Fall (Cha *et al.*, 2000). Dagegen konnten die Peptide, die die Cysteinreste enthalten und möglicherweise in der unteren Bande über eine Disulfidbrücke verbunden sind, nicht gefunden werden.

### 3.5.14 Kristallisation

Die Kristallisation von AOPsk wurde zunächst mit Proteinkonzentrationen zwischen 7.0 und 11.6 mg/ml (in der Proteinlösung) unter den Standardbedingungen (Crystal Screen- Kits I und II, dabei 600 µl CS-Lösung + 200 µl H<sub>2</sub>O für Reservoir; 2 µl Proteinlösung + 2 µl Reservoir; Ansatz bei RT, Aufbewahrung bei RT oder 4°C) versucht, wobei das Protein entweder in US-Puffer, pH 8.0 (z. T. mit etwa 50 mM Imidazol) oder in 100 mM Hepes, 50 mM KCl, pH 7.4 vorlag. Unter diesen Bedingungen wurde auch der Zusatz von 2 mM DTT bzw. 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(bezogen auf die Proteinlösung) getestet. In allen Fällen war rasche Präzipitation, meist schon während der Präparation des Tropfens, festzustellen. Eine Verbesserung bezüglich der Stabilität des Tropfens und schließlich auch erfolgreiche Kristallisation resultierte aus der Kombination der Dialyse des Proteins gegen 30 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0, Zusatz von 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Proteinlösung und Präparation des Kristallansatzes mit vorgekühlten Materialien auf Eis. Unter diesen Bedingungen konnten dann auch höhere Proteinkonzentrationen (bis 20.5 mg/ml) und höhere Reservoirkonzentrationen (bis 750  $\mu$ l CS-Lösung + 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O ohne sofortige Präzipitation getestet werden.

Besonders schöne Kristalle wurden unter den Bedingungen erzielt, die in Tabelle 3.15 aufgelistet sind. Diese wurden in der Gruppe von Dr. P. A. Karplus (Department of Biochemistry & Biophysics, Oregon State University, Corvallis, OR, USA) der Röntgenstrukturanalyse unterzogen.

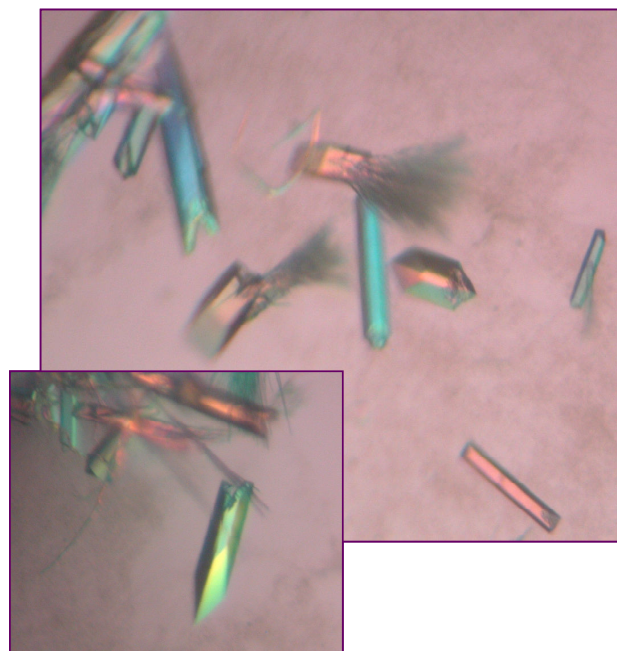
Proteinkonz. (mg/ml)	Screen	Zusätze zum Tropfen	Tropfen ( $\mu$ l)
14	CS I # 40	Additive Screen 2 # 23	2 + 2 + 1
14	CS I # 40	Additive Screen 2 # 18	2 + 2 + 1
14	CS I # 40	Additive Screen 2 # 16	2 + 2 + 1
14	CS I # 40	Additive Screen 2 # 15	2 + 2 + 1
14	CS I # 40	Additive Screen 2 # 20	2 + 2 + 1
14	CS I # 40	Additive Screen 2 # 19	2 + 2 + 1
12	CS I # 40	/	2 + 2
10	CS I # 40	/	2 + 2
15	CS I # 40	/	2 + 2
15	CS II # 26	Additive Screen 2 # 17	2 + 2 + 1

**Tabelle 3.15.**  
**Kristallisationsbedingungen der zur Röntgenstrukturanalyse verschickten Kristalle.**

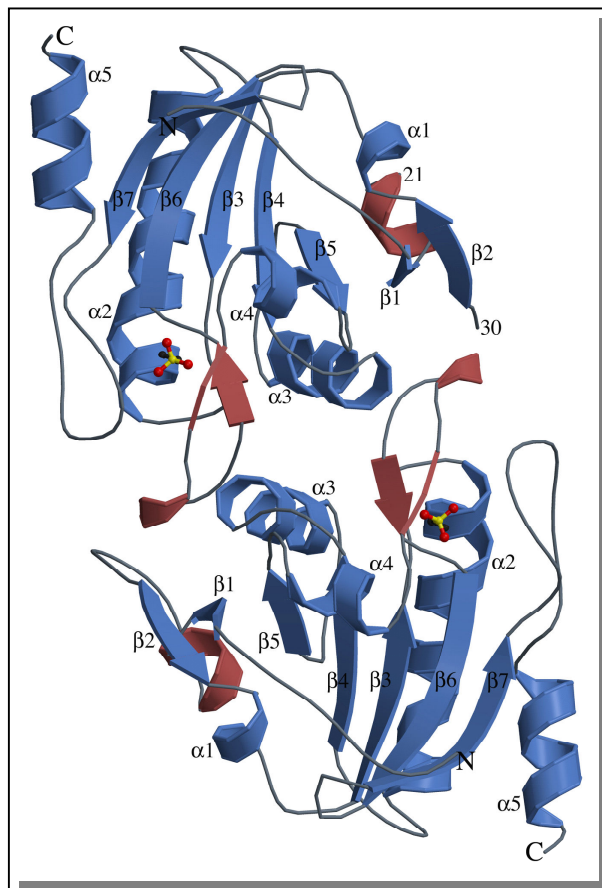
Das Protein lag stets in 30 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 vor. Vor der Präparation der Ansätze wurden der Proteinlösung 14 mM  $\beta$ -ME zugefügt. Das Reservoir wurde aus 600  $\mu$ l Crystal Screen-Lösung und 200  $\mu$ l *aq. dest.* hergestellt. Die verwendeten Lösungen waren auf 4°C temperiert; Präparation von Reservoir und Tropfen ebenso wie die Aufbewahrung der Ansätze erfolgten ebenfalls bei 4°C.

**Abb. 3.38. Kristalle des AOPsk.**

Die verwendete Proteinlösung enthielt 14 mg/ml AOPsk in 30 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 mit 14 mM  $\beta$ -ME. Für den Tropfen wurden 2  $\mu$ l dieser Lösung mit 2  $\mu$ l Reservoir vermischt und mit 1  $\mu$ l der Lösung # 23 aus dem Additive Screen 2 versetzt. Das Reservoir enthielt 600  $\mu$ l CS I # 40 und 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Die Präparation erfolgte auf Eis mit auf 4°C vorgekühlten Materialien. Der Ansatz wurde bei 4°C aufbewahrt.



Mittels Röntgenstrukturanalyse und *molecular replacement* konnte die Struktur von AOPsk bei einer Auflösung von 1.8 Å gelöst werden (Sarma *et al.*, 2005). Anhand der mittlerweile 12 bekannten Prx-Strukturen wurden gemeinsame Elemente des *Prx fold* aufgezeigt. Im Zentrum dieser Struktur befinden sich 7  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die von 5  $\alpha$ -Helices umgeben werden. Die erste Windung der  $\alpha$ 2-Helix bildet den *C<sub>p</sub>-loop*, der das peroxidative Cystein (C59) enthält. Die weiteren, in allen Prx konservierten, katalytisch bedeutsamen Reste finden sich auch in PfaOP (Pro52, Thr56, Arg137). PfaOP ist das erste Prx, in dessen Kristallstruktur das peroxidative Cystein als Sulfonsäure (CysSO<sub>3</sub>H) vorliegt. Eine weitere Besonderheit ist das sogenannte  $\alpha$ -Aneurisma, eine Insertion aus nur einem AS-Rest innerhalb der dem C59 folgenden Windung. Die Lokalisation des C85 innerhalb eines zentralen  $\beta$ -Faltblattes stützt



die Annahme, dass PfaOP mechanistisch ein 1-Cys-Prx darstellt. PfaOP liegt im Kristall als Dimer vor, und sowohl *light scattering*-Experimente als auch die Gelfiltration zeigen, dass diese Struktur auch in Lösung dominiert. Die *interface* des Dimers ist vom sog. A-Typ (*alternate*) und basiert auf *loop*-Strukturen, während der *interface* vom B-Typ  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zugrunde liegen. Dekamer-bildende Prx verwenden beide *interface*-Strukturen.

#### Abb. 3.39. Strukturmodell des PfaOP.

Dargestellt ist das AOP-Dimer;  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die allen bekannten Prx-Strukturen gemeinsam sind, haben blaue Farbe; AOP-spezifische Insertionen sind rot dargestellt. Die *active site*-Cysteinreste, die als Sulfonsäure vorliegen, sind im Kalottenmodell gezeichnet (Sarma *et al.*, 2005).

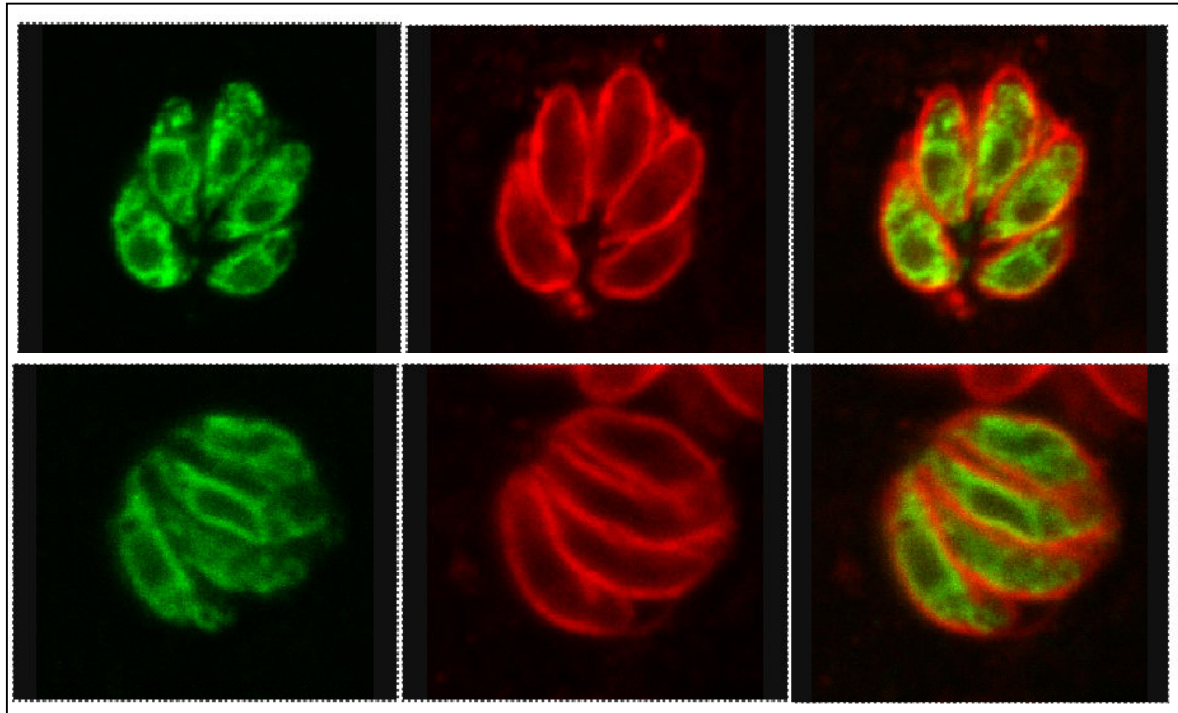
### 3.5.15 Intrazelluläres Targeting

Da entsprechende Computerprogramme mit hoher Wahrscheinlichkeit den Apicoplasten als subzelluläres Ziel von PfaOP angaben, wurde die genaue Lokalisation des Proteins in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Soldati (Department of Genetics & Microbiology, Faculty of Medicine, University of Geneva, CMU, Switzerland) mittels des verwandten Organismus *Toxoplasma gondii* untersucht (Nickel *et al.*, Manuskript eingereicht). Dazu wurde zunächst die N-terminale Sequenz von PfaOP (AS-Reste 1-66) einschließlich des putativen zweiteiligen Targeting-Signals über PCR amplifiziert (als Template diente das erste klonierte PfaOP-Konstrukt) und in den Vektor pTGFPTyHx kloniert. Letzterer ist ein Abkömmling von pTGFPHx, bei dem downstream des GFP ein Ty-1-tag einkloniert wurde (Delbac *et al.*, 2001). Parallel dazu wurde über PCR aus genomischer *Toxoplasma*-DNA das analoge Tg-Gen identifiziert und in den Vektor PT8SOD3TyHx kloniert.

Anschließend erfolgte die Transfektion der Vektoren zu Tachyzoiten des Tg-Stammes RHhxgprt<sup>r</sup> mittels Elektroporation (Soldati, 1993). Transformanden wurden vermehrt und

durch indirekte Immunfluoreszenz auf die Expression der Transgene hin untersucht. Die auf Objektträger fixierten und permeabilisierten Parasiten wurden mit Anti-Ty1-Antikörpern und Myosin-*light chain* (MLC)-1-Antikörpern inkubiert. Mit Hilfe der MLC-1-Antikörper wurde die Pellikula der Parasiten sichtbar gemacht (Herm-Gotz *et al.*, 2002), während die Anti-Ty-Antikörper die subzelluläre Lokalisation des Ty-getagten Proteins zeigen sollten.

Die Behandlung mit Anti-Ty-1-tag-Antikörpern resultierte sowohl bei den pT8PfAOP<sup>1-66</sup>GFPTy-exprimierenden als auch bei den pT8TgAOPTy-exprimierenden Parasiten in einer starken perinukleären Färbung, wie sie für das Endoplasmatische Retikulum charakteristisch ist.



**Abb. 3.40. Immunfluoreszenz mit Tg-Tachyzoiten.**

Oben: Überexpression des Tg-AOP. Unten: Überexpression des GFP-Fusionsproteins mit PfAOP-leader-Sequenz. Grün: Anfärbung des überexprimierten Proteins mittels Ty-Antikörper. Rot: Anfärbung der Myosin-*light chain*. Zweifarbig: Overlay.

### 3.6 Charakterisierung des erweiterten Substratspektrums der Pf-Thioredoxinperoxidase1 (PFTP<sub>x1</sub>)

#### 3.6.1 Ermittlung der Grx-abhängigen Peroxidase-Aktivität der PFTP<sub>x1</sub>

Kürzlich wurden einige pflanzliche Grx-abhängige Peroxiredoxine charakterisiert (Rouhier *et al.*, 2001; Bréhélin *et al.*, 2003), außerdem bakterielle Enzyme, die Fusionsproteine aus Prx und Grx darstellen (Pauwels *et al.*, 2003; Rouhier and Jaquot, 2003). Wenngleich diese Peroxiredoxine zur Klasse der TypV-Prx gehören, so stellte sich bei näherer Betrachtung der Literatur doch die Frage, ob nicht für manche andere Prx-Proteine die Grx-abhängige Aktivität bisher schlicht übersehen wurde. Für die bislang als Thioredoxinperoxidase charakterisierte PFTP<sub>x1</sub> wurde dieser Test deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewissermaßen nachgeholt.

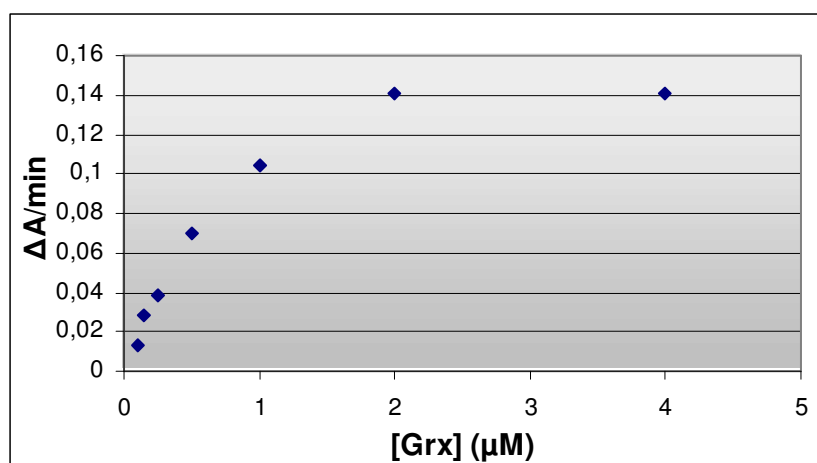
Die heterologe Expression und Reinigung der PfTPx1 erfolgte wie unter 3.6.4. beschrieben. Da sich das Enzym bei Lagerung verändert, womit sowohl die Verschiebung kinetischer Parameter als auch das Auftreten einer charakteristischen Doppelbande im SDS-Gel einhergeht (Rahlfs und Becker, 2001), wurde für die hier durchgeführten Messungen stets frisch gereinigtes Enzym verwendet. Die Durchführung der Assays erfolgte bei 37°C in HEDS-Puffer, da in diesem Puffer auch die Aktivität von Grx gemessen wird. Zur Erfassung der Grx-Abhängigkeit der Reaktion wurden in 400 µl Endvolumen 200 µM NADPH, 1 mM GSH, 0.7 U/ml PfGR mit unterschiedlichen Grx-Konzentrationen inkubiert. Nach Erreichen einer baseline erfolgte die Zugabe von 40 µM PfTPx1 und wiederum nach Einstellung der baseline der Start des Assays mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Die Messung der TPx-Abhängigkeit erfolgte mit 0.5 µM Grx bei variierenden PfTPx1-Konzentrationen.

Für Vergleichszwecke wurde parallel unter gleichen Puffer- und Temperaturbedingungen die Peroxidase-Aktivität mit dem Thioredoxin-backup-System gemessen. Letzteres bestand aus 200 µM NADPH, variierenden PfTrx1-Konzentrationen, 0.1 U/ml PfTrxR und 0.25 µM PfTPx1 zur Bestimmung der Trx-Abhängigkeit. Zur Messung der TPx-Abhängigkeit wurden analog zu den Assays mit Grx 0.5 µM Trx verwendet.

Der GSH-abhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abbau und dessen Hemmung durch PfTPx1 wurden durch Kontrollen ohne Grx, welches in den verwendeten Konzentrationen keinen eigenen Einfluss hat, berücksichtigt. Das Trx-backup-System betreffend wurden die gemessenen Absorptionsabnahmen um die Trx1-abhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Degradation berichtigt. Alle dargestellten Messergebnisse wurden mehrfach reproduziert.

Tatsächlich ließ sich unter den beschriebenen Untersuchungsbedingungen eine Grx-abhängige Aktivität der PfTPx1 messen;  $V_{\max}$  dieser Reaktion wurde mit  $31.4 \pm 2$  mU/mg berechnet. Der mittels Lineweaver-Burk-Plot ermittelte  $K_M$  für Grx liegt bei 0.837 µM. Es ergibt sich ein  $k_{\text{cat}}/K_M$  von  $14.51 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



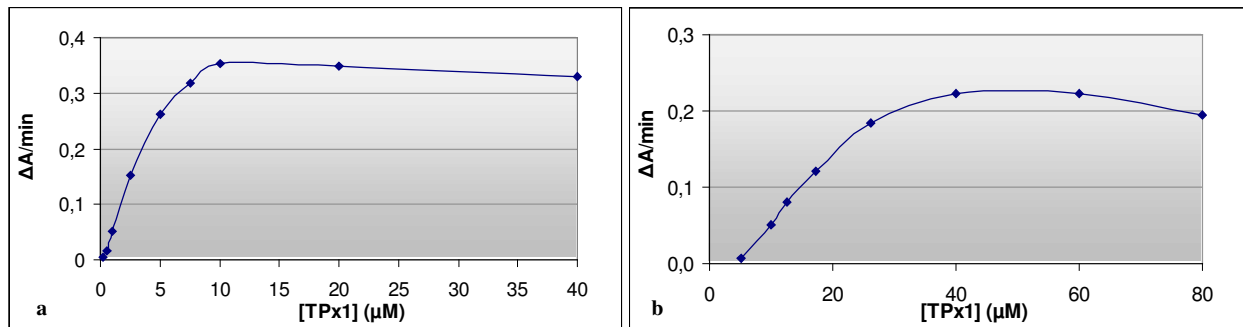
**Abb. 3.41. Grx-Abhängigkeit der PfTPx1.**

Bei 37°C wurde die durch 40 µM TPx1 katalysierte Reduktion von 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anhand des Verbrauchs von 200 µM NADPH über das backup-System aus 0.7 U/ml PfGR, 1 mM GSH und variierenden Grx-Konzentrationen gemessen.

Zwar ist mit dem parallel gemessenen Trx-backup-System die Aktivität

beträchtlich höher (1.91 U/mg), nichtsdestotrotz zeigen die Messungen, dass PfTPx1 Grx-abhängige Peroxidase-Aktivität besitzt und damit das erste typische 2-Cys-Prx ist, für das eine solche festgestellt wurde. Darüber hinaus ist die Affinität für Grx deutlich höher als für Trx, für das der  $K_M$  in den Parallelmessungen mit 22.5 µM bestimmt wurde.

Zum Vergleich der Grx- und Trx-abhängigen Aktivitäten wurde zudem die TPx-Abhängigkeit in Anwesenheit von 0.5  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Elektronendonors erfasst. Die Ergebnisse mit dem Grx-backup-System wurden um die entsprechenden Kontrollen ohne Grx korrigiert.



**Abb. 3.42. TPx-Abhängigkeit mit 0.5  $\mu\text{M}$  Trx (a) bzw. Grx (b).**

In Anwesenheit von 0.5  $\mu\text{M}$  Trx bzw. Grx wurde die Peroxidase-Aktivität verschiedener TPx1-Konzentrationen gemessen. Die Zusammensetzung der backup-Systeme und die Vorgehensweise waren wie für die Elektronendonoren-Abhängigkeiten beschrieben.

Der x-Achsen-Schnittpunkt der Aktivitätskurve mit dem Grx-backup außerhalb des 0-Punktes ist mit der Eigentümlichkeit der Kontrollen zu erklären, die mit abnehmender TPx-Konzentration steigen, dadurch, dass die beobachtete Hemmung des GSH-abhängigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abbaus sinkt. Daraus kann eine leichte Unterschätzung der Aktivität mit niedrigen TPx-Konzentrationen resultiert haben.

Für beide Elektronendonoren ist eine klare Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Die beobachtete Sättigung zeigt das Limit des backup-Systems auf. Die Begrenzung durch die verwendete TrxR-Konzentration wurde jedoch ausgeschlossen. Aus Abb. 3.43 ist ferner zu erkennen, dass sich ein Anstieg der TPx-Konzentration mit dem Trx-backup stärker bemerkbar macht. Zwischen 0 und 5  $\mu\text{M}$  TPx1 beträgt die Steigung unter Grx-Verwendung 0.0013, mit Trx dagegen das 40fache.

### 3.6.2 Reduktion der PfTPx1 durch PfPlrx

Analog zur Versuchsreihe mit AOPsk war auch für PfTPx1 die Untersuchung einer möglichen Interaktion mit PfPlrx ein interessanter Versuchsansatz. Auch hierfür wurde die für AOPsk beschriebene Endpunktbestimmung herangezogen, allerdings unter Verwendung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  anstelle von tBOOH, da ersteres das präferierte TPx1-Substrat darstellt. Bei gegebener Reduzierbarkeit der PfTPx1 durch Plrx sollten in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Elektronen auf das Peroxid weitergeleitet werden und durch DTNB nicht mehr erfassbar sein. Auch hier war zur Annahme der Elektronentransferkette  $\text{Plrx} \rightarrow \text{TPx1} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  der Ausschluss einer direkten Reduktion des Peroxids durch Plrx nötig.

#### Positivkontrolle mit Trx

Da Trx1 der klassische Elektronendonator für TPx1 ist, wurde als Positivkontrolle zunächst ein entsprechender Versuch mit Trx statt Plrx durchgeführt. Dazu wurde PfTrx1 vorreduziert, wie in 3.5.11 erläutert. In 100  $\mu\text{l}$ -Ansätzen wurden nun in verschiedenen Kombinationen TrxR-Puffer mit reduziertem Trx1, TPx1 und  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemischt. Trx1 war in jedem Ansatz *ad* 100  $\mu\text{M}$

enthalten. Wenn verwendet, betrug die TPx1-Konzentration 80  $\mu\text{M}$  und die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration 200  $\mu\text{M}$ . Tabelle 3.16 gibt die Zusammensetzung der Proben wieder.

Nr. der Probe → Komponente ↓	1	2	3	4
TrxR-Puffer	+	+	+	+
PfTrx1	+	+	+	+
PfTPx1	-	+	+	-
tBOOH	-	+	-	+
SH-Äquivalente ( $\mu\text{M}$ ) ohne Inkubation	22	5.4	18.7	19.3
SH-Äquivalente ( $\mu\text{M}$ ) nach 15 min. Inkubation	20.5	5.0	18.4	6.4

**Tabelle 3.16. Pipettierschema und SH-Gruppenbestimmung der Messung der Trx→TPx1-Interaktion.**

Die Komponenten wurden zu folgenden Konzentrationen verwendet: PfTrx1: 100  $\mu\text{M}$ ; PfTPx1: 80  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 200  $\mu\text{M}$ . Zu den Zeitpunkten  $t = 0$  und  $t = 15$  min wurden Aliquots der Inkubationsansätze um Faktor 10 verdünnt und mittels 400  $\mu\text{M}$  DTNB die darin verfügbaren Reduktionsäquivalente bestimmt.

Die Bestimmung der SH-Gruppen erfolgte nach Verdünnung der Inkubationsansätze mit TrxR-Puffer um Faktor 10. Die Absorption des verdünnten Ansatzes bei 412 nm wurde als Nullwert eingestellt und nach Zugaben von 400  $\mu\text{M}$  DTNB erneut bestimmt. Messungen erfolgten direkt und nach 15 minütiger Inkubation.

Mit Probe 1 wurde die vollständige Reduktion von Trx nachgewiesen. Die leichte Überschätzung der SH-Gruppen (22  $\mu\text{M}$  bei 20  $\mu\text{M}$  durch Trx erreichbaren) ergibt sich aus dem nicht berücksichtigten Hintergrund. Probe 3 enthielt erwartungsgemäß annähernd genauso viele SH-Gruppen. Die geringe Differenz zu Probe 1 könnte damit zu erklären sein, dass Elektronen, die zunächst auf TPx1 übertragen wurden, bereits auf Spuren von im Ansatz vorhandenen Substraten weitergeleitet wurden. Probe 4 zeigt, dass in verwendeten Konzentrationen zwar nicht sofort eine Elektronenübertragung von Trx auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgt; nach 15 Minuten hat diese jedoch in deutlichem Ausmaß stattgefunden. Probe 2 bestätigt die effektive Weiterleitung der Elektronen über TPx1 auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die bereits bei sofortiger Messung abgeschlossen ist. Die verbleibenden 5  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen können wiederum auf Hintergrundabsorption zurückgehen.

#### Versuch zur Reduktion von TPx1 durch Plrx

Die Reduktion und Reinigung von PfPlrx erfolgte wie für den entsprechenden AOPsk-Versuch beschrieben. Es wurden folgende Inkubationsansätze in TrxR-Puffer präpariert:

Nr. der Probe / Kontrolle → Komponente ↓	P1	P2	P3	P4	K1	K2	K3
TrxR-Puffer	+	+	+	+	+	+	+
PfPlrx	+	+	+	+	-	-	-
PfTPx1	-	+	+	-	-	+	+
$\text{H}_2\text{O}_2$	-	+	-	+	-	+	-
SH-Äquivalente ( $\mu\text{M}$ ) zu $t = 0$ min	38.8 $\pm 0.5$	26.0 $\pm 0.5$	39.0 $\pm 1.1$	39.2 $\pm 0.9$	<b>Keine signifikanten Unterschiede (4.7-5.2 SH- Äquivalente)</b>		
SH-Äquivalente ( $\mu\text{M}$ ) zu $t = 15$ min	38.6 $\pm 0.9$	19.5 $\pm 0.9$	37.6 $\pm 1.2$	26.3 $\pm 3.1$			

**Tabelle 3.17. Zusammensetzung der Inkubationsansätze zur Messung der Reduktion von TPx1 durch Plrx und Ergebnisse.**

In TrxR-Puffer wurden je nach Ansatz 100  $\mu\text{M}$  PfPlrx, 80  $\mu\text{M}$  PfTPx1 und 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gemischt und

nach Verdünnung um Faktor 10 die SH-Äquivalente mit 400  $\mu\text{M}$  DTNB bei 412 nm erfasst. Die Werte stellen Mittel aus drei Messreihen dar.

PfPlrx war in allen Proben-Ansätzen in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  vorhanden; die Kontrollen dienten der Erfassung möglicher Reaktionen ohne Plrx. Von PfTPx1 wurde in den entsprechenden Ansätzen 80  $\mu\text{M}$  eingesetzt, die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration betrug 200  $\mu\text{M}$ .

Die Vorgehensweise bei den Messungen war wie für AOPsk beschrieben (siehe 3.5.11). Die Unterschiede der Kontrollen waren vernachlässigbar, daher wurden die Absorptionswerte der Proben um einen Durchschnittskontrollwert korrigiert. In Tabelle 3.17 sind die anhand des millimolaren Extinktionskoeffizienten von  $\text{TNB}^-$  errechneten SH-Äquivalente aufgelistet.

In Probe 1 wurden annähernd 40  $\mu\text{M}$  TNB-Anion entsprechend 40  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen detektiert, woraus zu schließen ist, dass Plrx vollständig reduziert vorlag und alle enthaltenen Cysteinreste redoxaktiv sind. Die Anwesenheit von TPx1 (Probe 3) veränderte das Ergebnis nicht, und auch eine erwähnenswerte Autoxidation durch die 15minütige Inkubation fand nicht statt. Probe 4 zeigt, dass bei sofortiger Messung auch noch keine Interaktion  $\text{Plrx} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  festzustellen ist (39.2  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen vorhanden), zeitabhängig jedoch eine Reduktion des Peroxides stattfindet, bei der hier immerhin fast 13  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen verbraucht wurden. Diese langsame direkte Interaktion zwischen Plrx und  $\text{H}_2\text{O}_2$  muss bei der Betrachtung des Zeitverlaufs der eigentlichen Probe berücksichtigt werden. In dieser (Probe 2) war spontan eine Abnahme der SH-Gruppen um 13  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen, was bedeutet, dass eine Elektronenübermittlung von Plrx über TPx1 zum Peroxid stattgefunden haben muss. Nach 15 min ist ein Verlust weiterer 6.5  $\mu\text{M}$  SH-Gruppen feststellbar, womit die *active site*-Cysteine des Plrx (20  $\mu\text{M}$  im Assay) vollständig oxidiert sein dürften. Hier ist allerdings schwer zu beurteilen, welchen Weg die Elektronen genommen haben. Aufgrund der relativ starken Inaktivierung der TPx1 durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  erscheint es begründet, diesen zeitabhängigen Elektronentransfer eher der direkten Reaktion  $\text{Plrx} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  zuzuschreiben.

Durch dieses Experiment können die Aussagen getroffen werden, dass eine langsame Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Plrx selbst stattfindet und v. a., dass Plrx als Elektronendonator für TPx1 dienen kann.

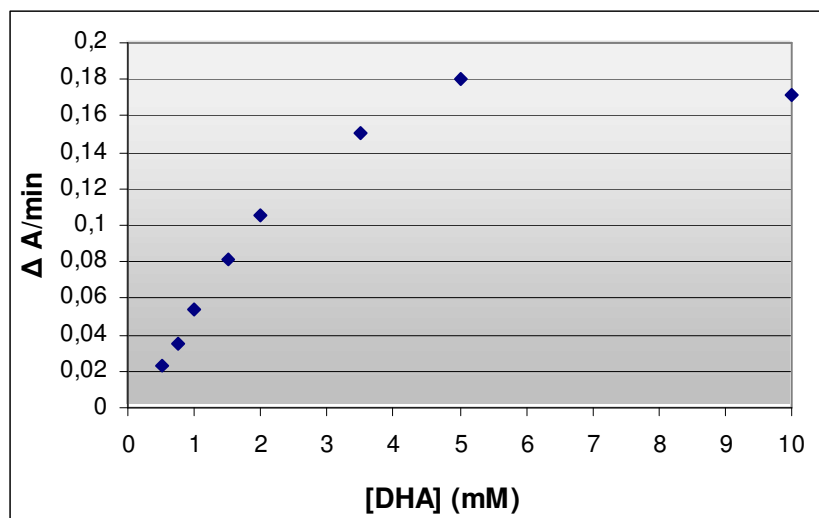
### 3.6.3 Feststellung der DHA-Reduktase-Aktivität von PfTPx1

Die Erforschung des Ascorbatstoffwechsels von *Plasmodium* ist aus mehreren Gründen interessant: Zum einen wurden in infizierten Erythrozyten Veränderungen des Ascorbatstoffwechsels beobachtet (Srivastava *et al.*, 2001; Iheanacho *et al.*, 1993; Stocker *et al.*, 1986), zum anderen scheint für verwandte Organismen (Trypanosomen, Pflanzen) der Ascorbatstoffwechsel von nicht geringer Bedeutung (Clark *et al.*, 1994; Wilkinson *et al.*, 2002; Shimaoka *et al.*, 2003). In Anbetracht des enormen oxidativen Stresses, dem der Parasit ausgesetzt ist, wäre es nur nahe liegend, hätte *Plasmodium* einen eigenen Ascorbathaushalt oder könnte zumindest das Ascorbat des Wirtes für sich nutzen.

Eine DHA-Reduktase-Aktivität ist in der Literatur zwar für Peroxiredoxine nicht beschrieben, wohl aber für verschiedene thiolhaltige Proteine, wie Grx und PDI (GSH-abhängig) (Xu und Wells, 1996) und TrxR und Trx (NADPH-abhängig) (May *et al.*, 1997; Morell *et al.*, 1997). Da im Rahmen dieser Arbeit bereits festgestellt wurde, dass die PfTrxR nicht zur DHA-Reduktion fähig ist, wohl aber PfTrx1 und PfGrx, war es begründet, zu untersuchen, ob auch PfTPx1 Ascorbat umsetzt bzw. die Trx-abhängige Reduktion noch steigert.



Dazu wurden 20  $\mu\text{M}$  TPx1 in HEDS-Puffer bei 37°C mit einem backup-System aus 200  $\mu\text{M}$  NADPH, 10  $\mu\text{M}$  Trx1 und 0.1 U/ml TrxR bis zur Einstellung einer baseline inkubiert. Gestartet wurden die Messungen durch Zugabe von DHA in variierenden Konzentrationen *ad* 0.4 ml Endvolumen. Die Beurteilung der DHA-Reduktase-Aktivität erfolgte anhand des NADPH-Verbrauchs, der bei 340 nm gemessen wurde. Die Absorptionsabnahme pro Minute wurde um den jeweiligen ohne TPx1 erfassten Kontrollwert (zustande kommend durch die Reaktion  $\text{Trx1} \rightarrow \text{DHA}$ ) korrigiert. Zur Ermittlung der TPx-Abhängigkeit der Reaktion, die ebenfalls bei 37°C erfolgte, wurden variierende Konzentrationen TPx1 verwendet und der Start der Messung durch Zugabe von DHA *ad* 2 mM vorgenommen. Auch bei dieser Messreihe wurde die Hintergrundaktivität berücksichtigt. Wie aus Abb. 3.43 ersichtlich, ist PfTPx1 in der Lage, DHA zu reduzieren bzw. die Reduktion durch Trx1 zu steigern.

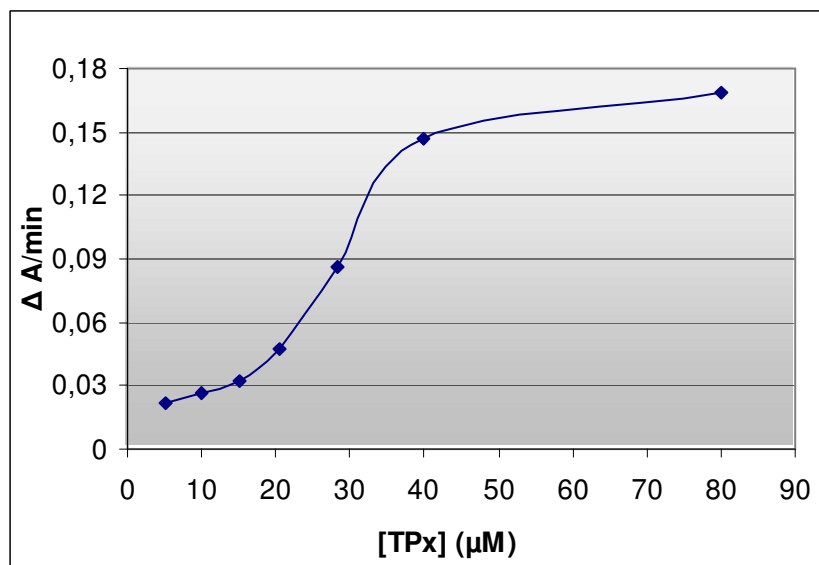


**Abb. 3.43. Substrat-Abhängigkeit der Reduktion von DHA durch PfTPx1.**

Mittels 200  $\mu\text{M}$  NADPH, 0.1 U/ml TrxR und 10  $\mu\text{M}$  Trx1 wurden 20  $\mu\text{M}$  TPx1 reduziert und anschließend die Reduktion verschiedener DHA-Konzentrationen bei 340 nm über den NADPH-Verbrauch gemessen.

Maximale Aktivität wird unter gegebenen Bedingungen mit 5 mM DHA erreicht und errechnet sich

zu 0.063 U/mg. Halbmaximale Geschwindigkeit ergibt sich mit etwa 1.75 mM DHA. Darüber hinaus war eine klare Abhängigkeit der Reaktion von der TPx1-Konzentration messbar (Abb. 3.44).



**Abb. 3.44. TPx-Abhängigkeit der Reduktion von DHA.**

Unter Verwendung von 200  $\mu\text{M}$  NADPH, 0.1 U/ml TrxR und 10  $\mu\text{M}$  Trx1 wurde die Reduktion von 2 mM DHA durch verschiedene TPx1-Konzentrationen bestimmt.

Aufgrund der Existenz von Ascorbat-abhängigen Peroxidasen in Pflanzen (Hossain und Asada, 1984) und in Trypanosomen (Wilkinson

*et al.*, 2002) wurde an dieser Stelle auch getestet, ob PfTPx1 Ascorbat als Elektronendonator

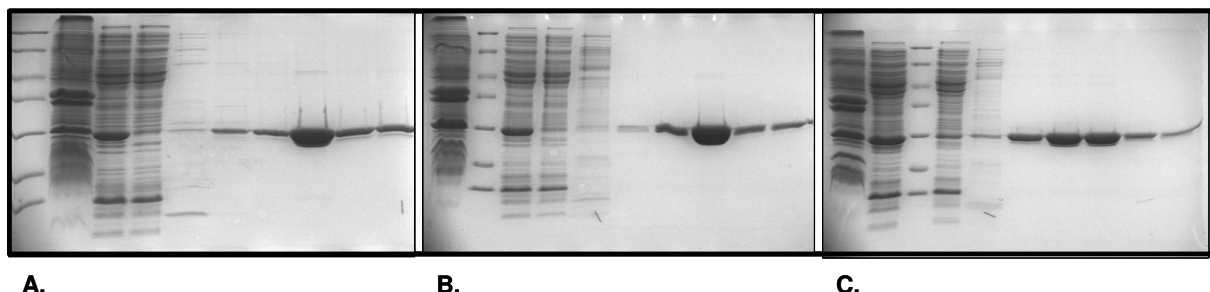
zur Reduktion von Peroxiden verwenden kann. Dazu wurden bei Raumtemperatur in einem Assayvolumen von 0.4 ml 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat in TrxR-Puffer mit 20  $\mu\text{M}$  TPx1 inkubiert. Nach Messung der baseline wurde der Assay mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gestartet und die Abnahme des Ascorbat bei 265 nm verfolgt. Zur Berechnung des Ascorbatverbrauchs wurde ein Extinktionskoeffizient von Ascorbat  $\epsilon_{265} = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  verwendet. Allerdings war in Anwesenheit von TPx1 keine stärkere Absorptionsabnahme zu beobachten als mit der entsprechenden Kontrolle ohne TPx. Es kann also gesagt werden, dass unter den gewählten Bedingungen die PFTPx1 keine Ascorbat-Peroxidase-Aktivität ausübt.

### 3.6.4 Mutagenese zu den Formen C74A und C170A

Um die Bedeutung der Cysteinreste C74 und C170 der PFTPx1 zu untersuchen, wurden mittels *site-directed mutagenesis* entsprechende Einzelmutanten generiert. Für die PCR-Ansätze, die ansonsten dem in der Einleitung beschriebenen Standard-Ansatz entsprachen, wurden 30 ng Template-Vektor (PFTPx1pQE30) und 3 U *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet; die Primer waren OPFTPx1C74Aforward und reverse (C74A) bzw. OPFTPx1C170Aforward und reverse (C170A). Temperatur- und Zeitbedingungen waren wie beschrieben, die Annealingtemperatur betrug 60.5°C (C74A) bzw. 59.1°C (C170A), die Extensionszeit 10 min (berechnet 8.1 min).

Die Ansätze wurden mittels Qiagen PCR-Purification-Kit gereinigt, *Dpn1*-verdaut und direkt zu *E. coli*- XL1Blue-Zellen transformiert wie beschrieben. Die Richtigkeit präparierter Klone wurde durch Sequenzierung überprüft. Zur Überexpression erfolgte die Umtransformation in M15-Zellen. Erste und zweite Vorkultur wurden hergestellt wie gewohnt; die Hauptkultur wurde 4%ig angeimpft und mit Carbenicillin *ad* 50  $\mu\text{g/ml}$  und Kanamycin *ad* 25  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Die Induktion erfolgte nach Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.7; das übrige *Procedere* war wie beschrieben.

Die Reinigung der Enzymformen über Ni-NTA-Agarose erfolgte wie üblich. Das Protein wurde nach Waschschritten von je 3 SV US-Puffer und 50 mM Imidazol in US-Puffer mit je 3 x 1 SV 75, 200 und 500 mM Imidazol in US-Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden mittels 15%iger SDS/PAGE kontrolliert. Wie aus Abb. 3.45 ersichtlich, eluierten alle drei Formen zuverlässig und sauber ab einer Imidazolkonzentration von 75 mM.



**Abb. 3.45. Reinigungsprofile der PFTPx1 WT (A.), C74A (B.) und C170A (C.).**

Die Proben des Reinigungsverlaufs wurden vorbereitet wie gewohnt und in einem 15%igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Einzelbilder zeigen von links nach rechts, die Markerspur außer Acht lassend, die Fraktionen USP, RE, DL, W, 50/2, 75/2, 200/1, 200/2, 200/3 und 500/2.

Während die C74A-Mutante hinsichtlich Stabilität und Ausbeute bei der Reinigung sich nicht deutlich vom WT unterschied, präzipitierte die C170A-Mutante entweder bereits bei der Reinigung, spätestens aber während der Konzentrierung. Nach der Feststellung, dass diese Instabilität weniger mit pH- oder Salzbedingungen zusammenhing, sondern vielmehr mit dem Oxidationszustand des Enzyms, konnte die Stabilität durch Reinigung unter reduzierenden Bedingungen erheblich verbessert werden. Im Folgenden wurden daher die Reinigungen aller Enzymformen in Anwesenheit von DTT durchgeführt. Dazu wurde 1 mM DTT zu den Zellsuspensionen gegeben. Die Rohextrakte wurden um Faktor 2 verdünnt, um die Kompatibilität des Ni-NTA-Materials für DTT (0.5 mM) nicht zu überschreiten. Äquilibrierungs- und Elutions-Puffer enthielten 0.2 mM DTT. Alle Elutionsfraktionen wurden mit DTT *ad* 10 mM Endkonzentration aufgefangen. Die Proteinkonzentration der sauberen, gepoolten und konzentrierten Fraktionen wurde bei 280 nm bestimmt, wobei die errechneten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{280} = 21.98 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für den WT und  $\epsilon_{280} = 21.86 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für die Mutanten) verwendet wurden. Unter Einbeziehung der berechneten Molekulargewichte (23.206 g/mol für den WT und 23.174 g/mol für die Mutanten) ergaben sich Proteinausbeuten von 15-25 mg/l Kultur.

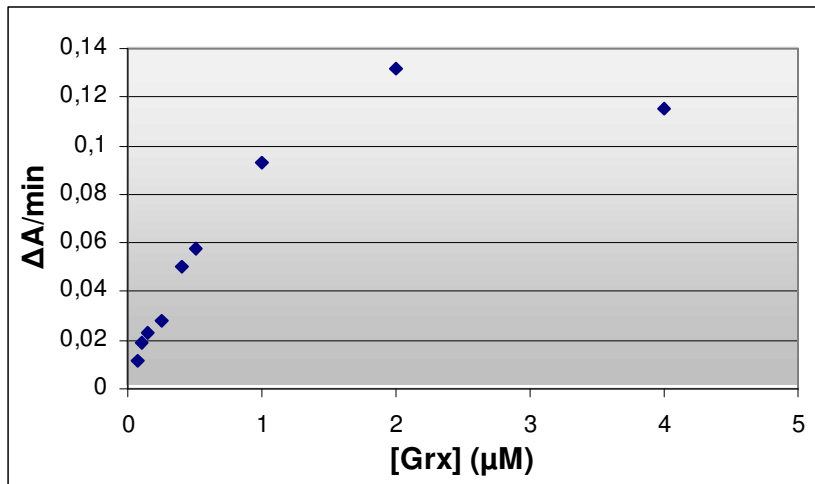
### 3.6.5 Kinetische Charakterisierung der Mutanten

Die vergleichende Messung der enzymatischen Aktivitäten von WT-Enzym und Mutanten erfolgte unter denselben Bedingungen wie unter 3.6.1 beschrieben. Die Grx-Abhängigkeit wurde mit 40  $\mu\text{M}$  der jeweiligen TPx-Form bestimmt. Für die Ermittlung der Trx-Abhängigkeit wurden im Falle des WT und der C74A-Mutante 0.25  $\mu\text{M}$ , im Falle der C170A-Form 10  $\mu\text{M}$  Enzymprotein verwendet. Auch die Korrektur der gemessenen Absorptionsabnahmen um die entsprechenden Kontrollwerte erfolgte wie unter 3.6.1 erklärt; ebenso wurden die Enzymproteine für die Messungen frisch präpariert.

Die Aktivität des WT mit Grx als Elektronendonator wurde bereits in Abb. 3.41 gezeigt. Beide Mutanten stellten sich mit Grx als ähnlich aktiv heraus (Abb. 3.46 und Abb. 3.47).

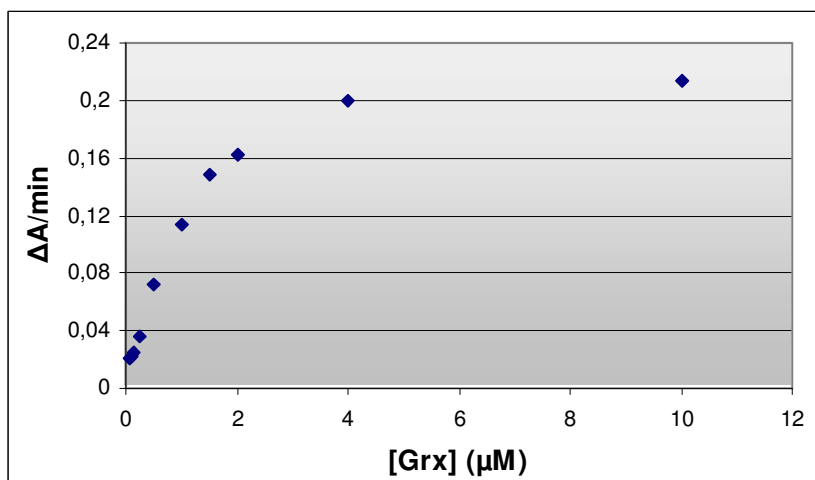
Die erlangten Daten verdeutlichen, dass für die Grx-abhängige Aktivität der PFTPx1 weder C74 noch C170 notwendig ist und lassen vermuten, dass für die Nutzung von Grx als Elektronendonator die Präsenz des peroxidativen Cysteins ausreicht. Letzteres erfordert jedoch Bestätigung durch die Doppelmutante C74/170A.

$V_{\text{max}}$  der TPx1C74A wurde mit  $25.8 \pm 2.8 \text{ mU/mg}$  und damit leicht niedriger gemessen als die des WT ( $31.4 \text{ mU/mg}$ ), die maximale Aktivität der C170A-Form betrug  $32.9 \pm 4.1 \text{ mU/mg}$ . Anhand der Auftragung nach Lineweaver-Burk wurden die  $K_{\text{M}}$ -Werte mit 0.861  $\mu\text{M}$  (C74A), 0.897  $\mu\text{M}$  (C170A) und 0.837  $\mu\text{M}$  (WT) ermittelt. Zur Verwendung der  $K_{\text{M}}$ -Werte ist zu sagen, dass ihre Berechnung im Fall der Peroxiredoxine grenzwertig ist, da einige Vertreter nicht der Michaelis-Menten-Kinetik folgen (Hofmann *et al.*, 2002). Nichtsdestotrotz wurden des öfteren erfolgreich Michaelis-Menten-Parameter für Prx bestimmt und veröffentlicht, so auch für PFTPx1 (Rahlf's und Becker, 2001; Akerman und Müller, 2003). Da die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Messungen einer Sättigungskinetik folgten, werden auch die entsprechenden Parameter angegeben. Die katalytische Effizienz, dargestellt durch  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ , beträgt für C74A  $11.59 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , für C170A  $14.19 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**Abb. 3.46. Grx-Abhängigkeit der TPx1C74A.**

Bei 37°C wurde die durch 40 μM TPx1C74A katalysierte Reduktion von 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anhand des Verbrauchs von 200 μM NADPH über das backup-System aus 0.7 U/ml PfGR, 1 mM GSH und variierenden Grx-Konzentrationen gemessen.



**Abb. 3.47. Grx-Abhängigkeit der TPx1C170A.**

Vorgehensweise analog Legende zu Abb. 3.46.

Bezüglich der Akzeptanz von Trx als Elektronendonator waren die Ergebnisse mit den drei Enzymformen deutlich verschieden, was schon daran erkennbar ist, dass für die Messungen mit C170A 40x

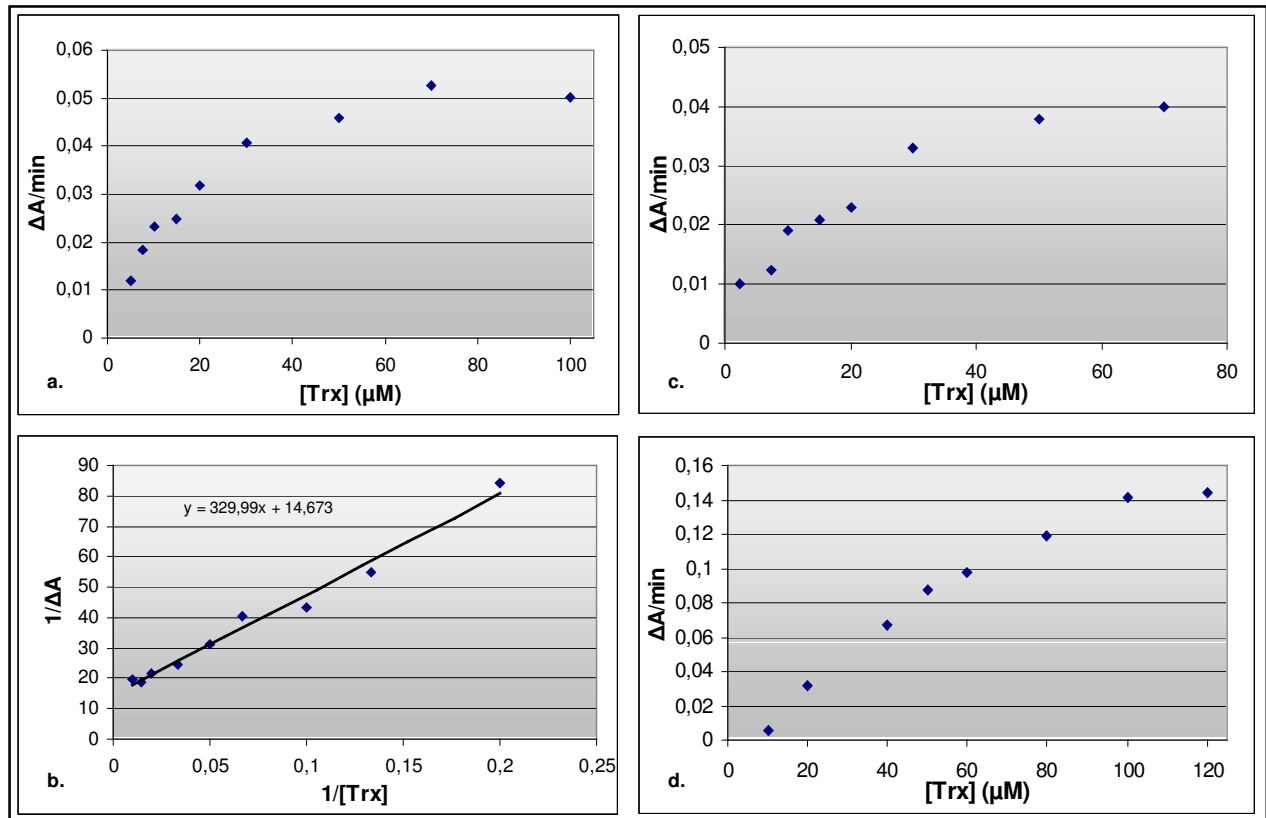
mehr Enzym verwendet werden musste als für die anderen beiden Formen. Für das WT-Enzym (Abb. 3.48.a) wurden 1.91 U/mg als maximale Aktivität gemessen und der  $K_M$  errechnete sich zu 22.5 μM. Es ergab sich ein  $k_{cat}/K_M$ -Verhältnis von 32.86 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

Wiederum unterschieden sich die Parameter der C74A-Form kaum von denen des WT ( $K_M$  = 24.5 μM) (Abb. 3.48.c). Die maximale Aktivität lag mit  $1.62 \pm 0.2$  U/mg erneut leicht unter der des WT; für die katalytische Effizienz ergaben sich 25.14 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Die Mutation des C74 bedeutet also eine Verringerung der Aktivität auf 80-85% des WT-Enzyms sowohl mit Grx als auch mit Trx.

Die Affinität der C170A-Mutante für Trx lag 1.8 bis 8.3fach niedriger als die des WT-Enzyms (je nach Präparation  $K_M$  zwischen 40 und 187 μM). Die maximale Aktivität betrug nur  $0.26 \pm 0.03$  U/mg, entsprechend 14% der WT-Aktivität (Effizienz: 2-11%) (Abb. 3.48.d).

In Anbetracht dieser Ergebnisse kann gesagt werden, dass das C-terminale Cystein der PfTPx1 das für die Trx-abhängige Aktivität wichtigere, wenngleich für das qualitative Vorhandensein der Aktivität nicht absolut essentiell ist.

Hier wäre noch zu klären, ob C74 im Fall der C170A-Form das C-terminale Cystein zu einem gewissen Ausmaß ersetzen kann oder ob auch die Doppelmutante C74/170A noch ebenso viel Aktivität zeigen würde wie C170A, womit die Trx-Verwendungsmöglichkeit der TPx1 nur vom peroxidativen Cystein abhinge.



**Abb. 3.48. Abhängigkeit der Aktivität des WT-Enzyms (a. und b.) bzw. der Mutanten C74A (c.) und C170A (d.) von der Trx-Konzentration.**

Auftragung der Absorptionsabnahme bei 340 nm gegen die Trx-Konzentration (a., c., d.) und entsprechende Auftragung nach Lineweaver-Burk (b). In Anwesenheit variierender PfTrx1-Konzentrationen, 200 μM NADPH und 0.1 U/ml PfTrxR wurde die Peroxidaseaktivität von 0.25 μM (WT, C74A) bzw. 10 μM (C170A) PfTPx1 mit 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bestimmt. Für jede Trx1-Konzentration erfolgten Korrekturen um die Peroxiddegradation ohne TPx1.

### 3.6.6 Untersuchung der Oligomerisierung der PfTPx1

Abhängig von Cysteinresten und deren Oxidationszustand zeigen Peroxiredoxine ein charakteristisches Oligomerisierungsverhalten (Hofmann *et al.*, 2002). Im Falle der typischen 2-Cys-Proteine wechseln sich Dimer und Dekamer während des katalytischen Zyklus ab (Nogoceke *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 2002).

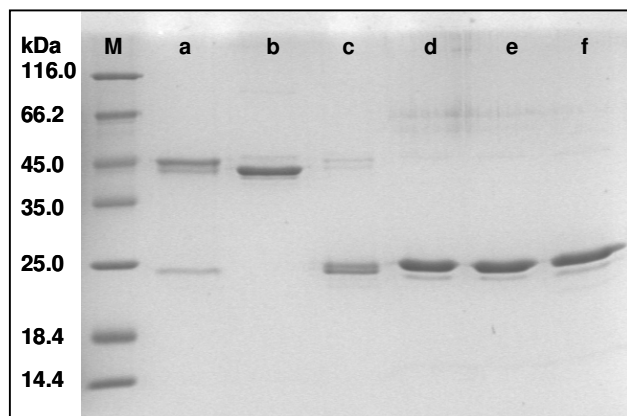
An Aggregatformen der nativen PfTPx1 wurden per Gelfiltration unter reduzierenden Bedingungen das Dekamer und in Abwesenheit von DTT ein höheres Oligomer (möglicherweise Dodekamer; 400 kDa) nachgewiesen. Beide Formen zeigten sich als enzymatisch aktiv (Akerman und Müller, 2003). In der entsprechenden Veröffentlichung wird leider nichts zu den für die Gelfiltration gewählten Bedingungen bzgl. pH, Salzkonzentration, Proteinkonzentration und Anwesenheit bestimmter Kationen (wie Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) ausgesagt, obwohl aus der Literatur hervorgeht, wie groß die Bedeutung dieser Faktoren auf die Oligomerisierung von Prx ist (Kitano *et al.*, 1999; Kristensen *et al.*, 1999; Chauhan und Mande, 2001; Kato *et al.*, 1985; Allen und Cadman, 1979).

Die im Rahmen dieser Arbeit mit PfTPx1 dargestellten Gelfiltrationen erfolgten mit 50 mM Na-Phosphat, 100 mM NaCl, pH 7.4; das Protein lag auch in diesem Puffer vor. Es wurden jeweils 2 mg Protein in etwa 500 μl Volumen auf eine äquilibrierte Sephadex 200-Säule gegeben und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert.

Mit allen drei Enzymformen ergab sich in Anwesenheit von 10 mM DTT ein einzelner Peak entsprechend einem Molekulargewicht von 130-147 kDa (entsprechend 5.6-6.3 Molekülen), der möglicherweise als das Dekamer interpretiert werden kann. Die Inkubation mit 5 mM GSSG über Nacht, die den Zweck verfolgte, das oxidierte Protein vor der Überoxidation zu schützen, hatte beim WT keinen Einfluss auf das Ergebnis. Mit der C170A-Form trat neben dem vorherrschenden „Dekamer“ ein höher aggregierter Peak auf (262.4 kDa; 11.3 Moleküle), der auch vorhanden war, wenn älteres Enzym ohne DTT verwendet wurde (251.4 kDa; 10.8 Moleküle). Die ältere Enzymcharge ohne DTT zeigte ferner einen dritten, anteilmäßig größten Peak im Ausschlussvolumen, das „Dekamer“ hatte den zweitgrößten Anteil an der Gesamtpeakfläche. Älteres WT-Protein zeigte sich vorwiegend als Dekamer, aber auch hier war ein höheres Oligomer detektierbar (371.3 kDa; 16 Moleküle). Die Resultate mit C74A (+10 mM DTT / älteres Enzym ohne DTT) entsprachen denen des WT-Proteins.

Neben der Gelfiltration erfolgte auch die Analyse des Oligomerisierungsverhaltens mittels 15%iger SDS-PAGE. Dazu wurden pro Spur 2 µg Protein aufgetragen, einmal ohne und einmal mit DTT im Probenpuffer.

Das Gel (Abb. 3.49) zeigt, dass unter denaturierenden Bedingungen kein Dekamer existiert, die Dimer-Dimer-Assoziation ist demnach wie erwartet nicht-kovalenter Art. In reduzierter Form sind sowohl WT als auch Mutanten monomerisch, dagegen bilden WT und C74A in Abwesenheit von DTT fast vollständig das Dimer aus, während C170A weiterhin als Monomer erscheint. Dies deutet darauf hin, dass die C170 an der Dimerisierung beteiligt ist und C74 diese Funktion nicht übernehmen kann.



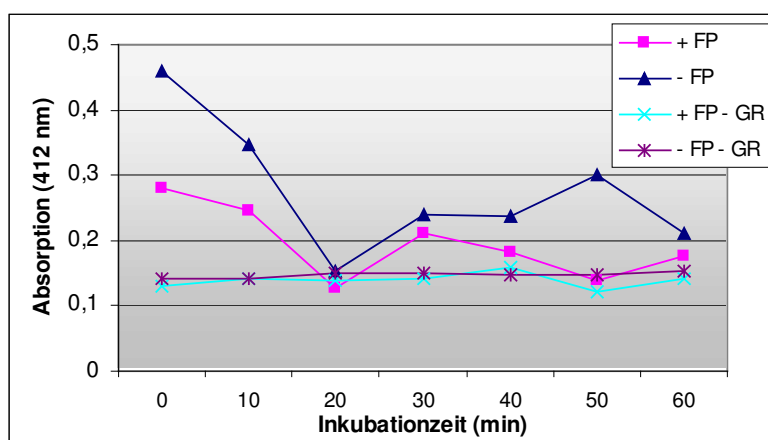
**Abb. 3.49. Verhalten der PFTPx1-Formen in der 15%igen, denaturierenden SDS-PAGE.**

Pro Spur wurden je 2 µg Protein ohne DTT (a – c) bzw. mit DTT (d – f) der TPx1-Formen WT (a und d), C74A (b und e) und C170A (c und f) aufgetragen.

### 3.7 Untersuchung der Hemmung verschiedener (Pf-)Proteine durch Hämin (Ferriprotoporphyrin IX, FPIX)

#### 3.7.1 Hemmung der Glutathionreduktasen durch FPIX

Die Hemmung der Hefe-GR durch FPIX ist schon seit längerem beschrieben (Aft und Müller, 1985). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diese Untersuchung auf die PfGR erweitert und um wichtige Kontrollen ergänzt werden. In einem ersten Experiment wurde die Reproduktion dieser Ergebnisse vorgenommen. Dazu erfolgte die Inkubation von 10 mU kommerziell erworbener Hefe-GR in 100 mM NaPhosphat, pH 7.5 mit 200  $\mu$ M NADPH in An- bzw. Abwesenheit von 25  $\mu$ M FPIX. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde 1 mM GSSG hinzugefügt. Die Einwirkungszeit der verbleibenden GR-Aktivität auf das Substrat GSSG wurde durch Zugabe von 0.5% SDS und 20  $\mu$ M EDTA auf 40 Sekunden begrenzt. Die während dieser Zeit gebildete GSH-Menge wurde anschließend mittels DTNB (Stammlösung 10 mM in Methanol) *ad* 1 mM und 1.1 ml Endvolumen bei 412 nm bestimmt ( $\epsilon_{412}$  des TNB-Anions = 13.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Damit unterschied sich der hier beschriebene Assay hinsichtlich der Bedingungen nur durch die geringeren Konzentrationen Hefe-GR und NADPH vom Original (72 mU/ml und 300  $\mu$ M). Allerdings wurde das Experiment um entsprechende Kontrollen ohne GR erweitert, da bei 340 nm eine Reaktion zwischen NADPH und Hämin festgestellt wurde. Die Ergebnisse der Reproduktion sind in Abb. 3.50 gezeigt.



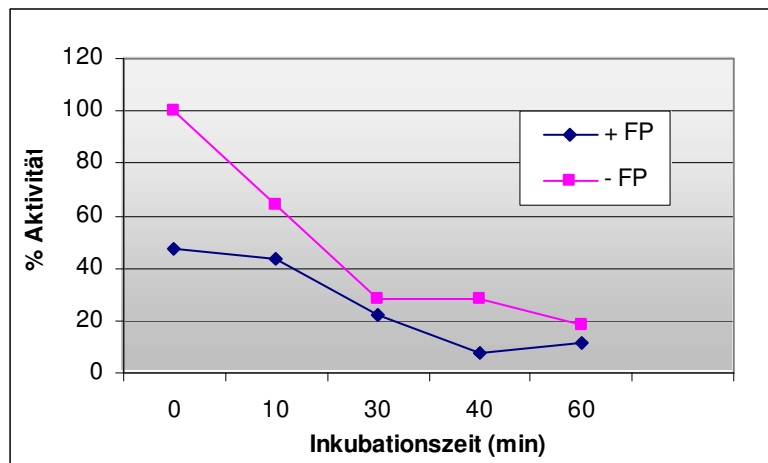
**Abb. 3.50. Hemmung der Hefe-GR durch 25  $\mu$ M FPIX im Assay nach Aft und Müller.**

10 mU Hefe-GR wurden mit 200  $\mu$ M NADPH und ggf. 25  $\mu$ M FPIX inkubiert; anschließend wurde die GR-Restaktivität durch 1 mM GSSG über 40 s gefordert. Das entstandene GSH wurde mit 1 mM DTNB bei 412 nm bestimmt. Kurve pink: Restaktivität der Hefe-GR nach Inkubation mit FP. Kurve blau: Kontrolle ohne FP; gibt die Inaktivierung durch andere

Assaykomponenten und Verdünnung wieder. Kurven türkis bzw. violett zeigen die TNB-Bildung in Ansätzen ohne GR mit bzw. ohne FP.

Die Hintergrundreaktion ohne Enzym ist mit und ohne FP ähnlich. Ohne deren Berücksichtigung (Aft und Müller, 1985) wurde somit die absolute Aktivität der Proben überschätzt, an der Berechnung der Hemmung ändert sich jedoch nichts. Abb. 3.51 zeigt die um Kontrollen ohne Enzym bereinigten Kurven.

Die Aktivität des Ansatzes ohne FP zum Zeitpunkt  $t = 0$  min ( $\sim 20$  mU/ml) wurde *ad* 100% gesetzt. Die Linearität des Aktivitätsabfalls, die von Aft und Müller beobachtet wurde, war hier nicht so deutlich ausgeprägt. Aus den Angaben von Aft und Müller geht nicht klar hervor, ob der Zeitverlauf der Probe ohne FP mit einbezogen wurde, weshalb der direkte Vergleich der Ergebnisse schwer fällt.



**Abb. 3.51. Bereinigte Enzymaktivitäten im Assay nach Aft und Müller.**

Absorptionswerte der Kurve + FP aus Abb. 3.50 wurden um die der Kurve + FP - GR korrigiert, die der Kurve - FP um die Werte von Kurve - FP - GR. Dargestellt sind die prozentualen Aktivitäten bezogen auf den Wert des Ansatzes ohne FP zum Zeitpunkt  $t_0$ .

Anhand der hier gewählten Darstellung wird jedoch deutlich, dass auch ohne FP im Zeitverlauf ein erheblicher Aktivitätsverlust stattfindet. Dieser ist auf die Destabilisierung der GR durch NADPH und die Verdünnung im Assay zurückzuführen. Ein deutlicher Hemmeffekt durch FP ist nur zwischen 0 und 20 Minuten Inkubationszeit zu vermerken.

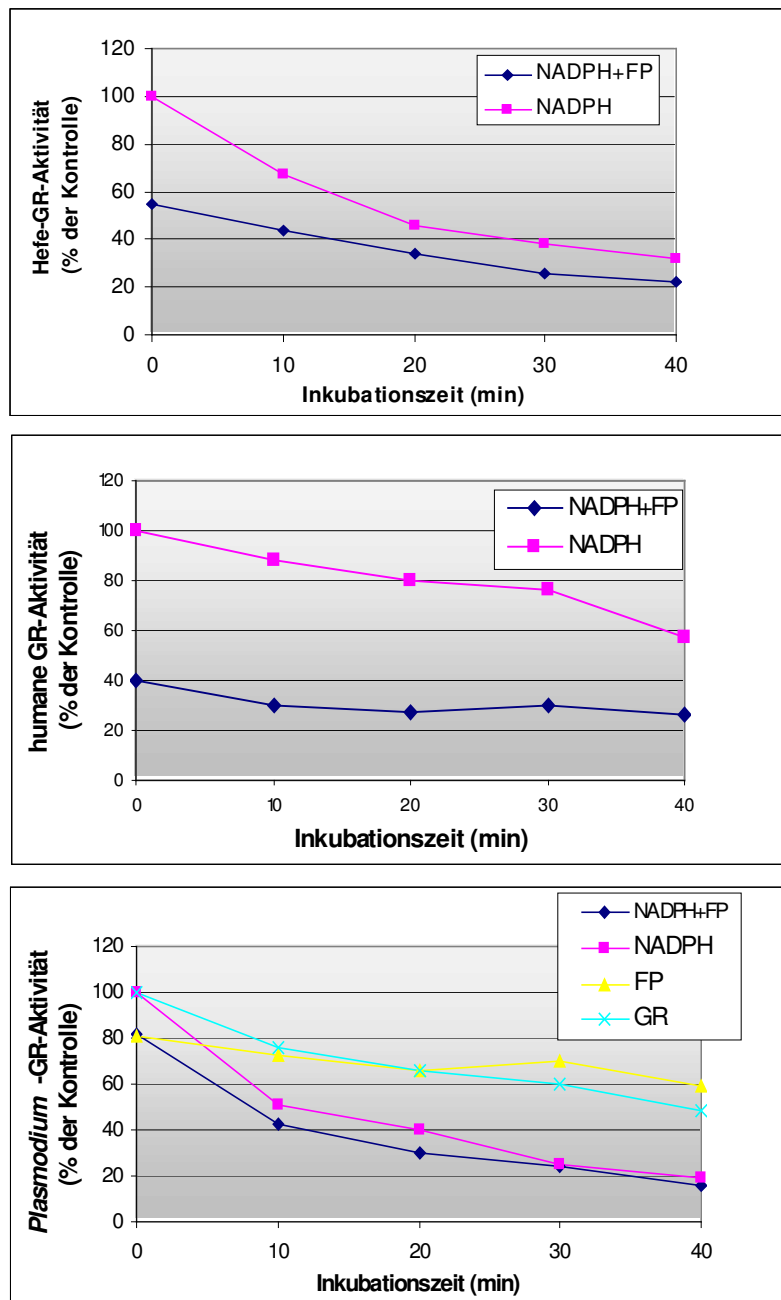
In den weiteren Untersuchungen wurde die Hemmung durch FP direkt im GR-Assay gemessen. In diese Bestimmungen wurden nun neben dem Hefe-Enzym auch PfGR und humane GR miteinbezogen. In jedem Fall wurde eine entsprechende Kontrollmessung ohne FP durchgeführt. Für PfGR erfolgten zwei weitere Kontrollen:

- eine mit FP, aber ohne NADPH, um zu sehen, ob für einen hemmenden Effekt des FP eine Vorreduktion des Enzyms nötig ist,
- die andere ohne beide genannten Komponenten, um den schädigenden Effekt der Verdünnung zu erfassen bzw. um die Destabilisierung durch NADPH zu verhindern.

Die Ergebnisse zeigt Abb. 3.52. Die Restaktivität bezieht sich auf die Probe ohne FP an  $t = 0$ . Die Messung mit Hefe-GR ergab eine gute Übereinstimmung zu der Messmethode nach Aft und Müller. Der Vergleich der drei Glutathionreduktasen zeigt, dass das plasmodiale Enzym gegenüber FP am wenigsten empfindlich ist – die sofortige Hemmung beträgt nur etwa 20%. Die zeitabhängige Inhibierung ist dagegen stark ausgeprägt: Nach 40minütiger Inkubation sind 80% der Aktivität gehemmt. Die Annäherung der Kurven mit und ohne FP zeigt, dass dieser Inkubationseffekt nahezu ausschließlich auf die Destabilisierung durch NADPH und nicht auf FP zurückzuführen ist.

Die humane GR weist genau gegensätzliche Charakteristika auf: Während die Inkubationszeit für dieses Enzym die vergleichbar geringste Rolle spielt, ist die sofortige Hemmung durch FP mit einem Verlust von 60% der Aktivität am stärksten.





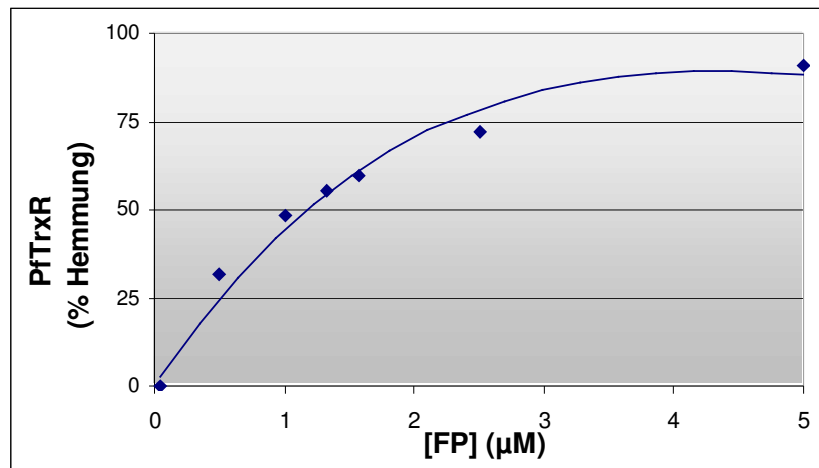
**Abb. 3.52. Hemmung der Hefe-GR (a), humanen GR (b) und PfGR (c) durch 25 µM FP.**

Etwa 10 mU/ml des jeweiligen Enzyms wurden in TrxR-Puffer mit 100 µM NADPH in An-/Abwesenheit von 25 µM FP inkubiert. Der Start der Messung bei 340 nm erfolgte durch Zugabe von GSSG *ad* 1 mM und 0.5 ml Endvolumen. Im Falle der Kontrollen ohne NADPH wurde dieses erst nach der Inkubation zugegeben. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte aus 3-4 Messungen. Die Hintergrundreaktion zwischen FP und NADPH, die unter den gewählten Bedingungen ein  $\Delta A$  von  $0.007 \text{ min}^{-1}$  verursachte, wurde hier nicht berücksichtigt, da diese Intensität nur für die erste Inkubationsminute galt. Auswirkungen hat diese Interaktion auf die Assays mit FP, die zum Zeitpunkt  $t = 0$  gemessen wurden und auf alle Messwerte der PfGR-Kontrolle mit FP, bei denen NADPH erst direkt vor Start der Messung zugegeben wurde (alle Messpunkte der gelben Serie und auf den ersten blauen Messpunkt). So kann diese Hintergrundreaktion erklären, warum die Probe mit FP z. T. stärker aktiv ist (nach 30 bzw. 40 Minuten) als die Kontrolle, die nur GR enthielt. Ebenfalls vernachlässigbar war der in der Literatur beschriebene GSH-abhängige Hämabbau (Atamna und Ginsburg, 1995).

### 3.7.2 Hemmung der Pf-Thioredoxinreduktase durch FPIX

Als das wichtigste regenerierende Enzym des Trx-Systems wurde auch die PfTrxR auf eine mögliche Beeinträchtigung durch FP untersucht.

Nach initialen qualitativen Tests wurde durch Variation der FP-Konzentration der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt. Dazu wurde verfahren wie bei Campanale *et al.* beschrieben (2003). Der  $IC_{50}$ -Wert wurde mit  $1.25 \text{ µM}$  bestimmt (Abb. 3.53). Konzentrationen über  $5 \text{ µM}$  steigerten den Hemmeffekt nicht weiter.



**Abb. 3.53. Bestimmung der  $IC_{50}$ -Konzentration für FPIX an PfTrxR.**

Die Hemmung von 2-10 mU/ml PfTrxR durch 0.5 bis 25  $\mu$ M FP wurde in TrxR-Puffer und 0.5 ml Endvolumen mit 20  $\mu$ M Trx anhand des Verbrauchs von initial 100  $\mu$ M NADPH bei 340 nm ermittelt. Gestartet wurde durch Zugabe von Trx; eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses durch NaOH wurde ausgeschlossen. Dargestellt sind Mittelwerte aus vier Messreihen.

Analoge Assays, die mit NADPH gestartet wurden, resultierten in einer deutlich geringeren Hemmung; der  $IC_{50}$  wurde in diesem Fall erst mit 10 bis  $>25$   $\mu$ M FPIX erreicht.

Mit 3 mM DTNB als Substrat wurde in Anwesenheit von 25  $\mu$ M FP bei Start mit NADPH eine 90%ige Inhibierung beobachtet. Auch mit DTNB war eine Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch FP gegeben, der  $IC_{50}$  (bei Start mit NADPH) betrug hier etwa 5  $\mu$ M. In den Assays, in denen  $> 5$   $\mu$ M FP verwendet wurden, erfolgte die Bereinigung der gemessenen Absorptionsabnahmen um die jeweils parallel gemessene Kontrolle ohne PfTrxR zur Berücksichtigung der Hintergrundreaktion  $FP \leftrightarrow NADPH$ , die bei 25  $\mu$ M maximal  $0.013 \text{ min}^{-1}$  entsprach.

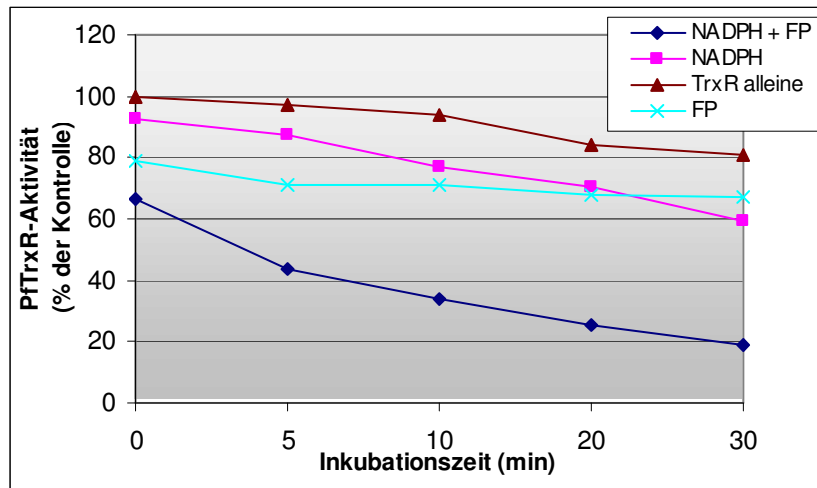
Die Abhängigkeit des Ausmasses der Hemmung vom Redoxzustand des Enzyms deutet, das erste Substrat NADPH betreffend, auf einen unkompetitiven Mechanismus hin, wie er bereits für die PfGST beobachtet wurde (Harwaldt *et al.*, 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Hemmstärken je nach verwendetem zweiten Substrat kann vermutet werden, dass FP dessen Bindung beeinflusst. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die stärkere Hemmung mit DTNB durch die höhere NADPH-Konzentration in diesem Assay (200  $\mu$ M) zustande kommt, wodurch FP mit höherer Wahrscheinlichkeit auf vorreduziertes Enzym trifft. Eine Beeinträchtigung der Substratbindung kann entweder durch Konkurrenz um den Zugang zum aktiven Zentrum hervorgerufen werden oder durch allosterische Bindung an das Enzym, die eine Konformationsänderung zulasten der Substratbindung verursacht. Aufgrund der geringeren Affinität der TrxR für DTNB wäre die stärkere Hemmung hiermit durchaus mit einem kompetitiven Mechanismus durch FP erklärbar.

Die Charakterisierung des Hemmtyps wurde mit etwa 7 mU/ml TrxR unter Verwendung des physiologischen Substrates Trx durchgeführt. Dazu wurden zunächst  $K_M$ -Werte für Trx in Anwesenheit verschiedener FP-Konzentrationen (0, 1.25, 2 und 4  $\mu$ M) bestimmt. Die Trx-Konzentration wurde dazu jeweils zwischen 1.25 und 20  $\mu$ M variiert. Statt mit Trx wurde in diesem Fall mit NADPH gestartet.

Der  $K_M$ -Wert ohne Einwirkung von FP wurde mit 10.7  $\mu$ M ermittelt, was mit früheren Messungen übereinstimmt (10.4  $\mu$ M; Kanzok *et al.*, 2000). In Anwesenheit der  $IC_{50}$ -Konzentration an FPIX lag der  $K_M$  bei 23.4  $\mu$ M, was in etwa einer Verdopplung entspricht

und damit zur Annahme eines kompetitiven Hemmmechanismus führt. Die Berechnung des  $K_i$ -Wertes ergab  $1.2 \mu\text{M}$  (Variation zwischen  $0.98$  und  $1.48 \mu\text{M}$ ).

Darüberhinaus wurde die Zeitabhängigkeit der Hemmung ermittelt, die in Abb. 3.54 dargestellt ist.



**Abb. 3.54. Zeitabhängigkeit der TrxR-Hemmung durch FPIX.**

8.4 mU/ml PfTrxR wurden mit  $100 \mu\text{M}$  NADPH und  $1.25 \mu\text{M}$  FPIX in verschiedenen Kombinationen für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert und anschließend die Restaktivität mit 20 bzw.  $40 \mu\text{M}$  Trx bestimmt. Zu den Inkubationsansätzen ohne NADPH wurde letzteres direkt vor Beginn der Messung zugegeben. Als Bezugspunkt zur Berechnung diente die Aktivität des Inkubations-

ansatzes ohne Zusätze zu  $t = 0$ . Dargestellt sind Mittel zweier Messungen.

Zeitabhängigkeit ist insbesondere für die gleichzeitige Inkubation mit NADPH und FP gegeben: Während die initiale Restaktivität noch 67% betrug, lag sie nach 30 Minuten nur noch bei 19%. Die Einwirkung von FP alleine veränderte dagegen die Aktivität im Zeitverlauf kaum (79% Restaktivität in  $t_0$  vs. 67% zu  $t_{30}$ ).

Anhand dieser Daten kann vermutet werden, dass neben dem kompetitiven Wirkmodus des FP zusätzlich eine kovalente bzw. irreversible Komponente existiert. Beiden ist gemeinsam, dass ihre Ausprägung mit vorreduziertem Enzym am stärksten ist.

### 3.7.3 Hemmung von Pf-Glutaredoxin durch FP

Der Einfluss von FP auf PfGrx wurde im HEDS-Assay ermittelt, der mit  $200 \text{ mU/ml}$  GR und  $20 \text{ nm}$  Grx durchgeführt wurde wie beschrieben. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte aus 3 Messungen: Die Aktivität von Grx1 in Abwesenheit von FP, gemessen als NADPH-Verbrauch pro Minute, entsprach  $5 \text{ mU/ml}$  und wurde *ad* 100% gesetzt.  $25 \mu\text{M}$  FP resultierten in einer Aktivitätsabnahme um 70%. Messungen mit 10 bzw.  $5 \mu\text{M}$  FP bestätigten die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung – die Inhibierung betrug 51 bzw. 27%.

Mögliche Nebenreaktionen wurden durch die jeweilige Kontrolle ohne Grx abgedeckt. Die GSH-abhängigen FP-Degradation, von Atamna und Ginsburg (1995) beschrieben und eine mögliche Hintergrundinteraktion des Assays, wurde dennoch gesondert bestimmt. Dazu wurden  $1 \text{ mM}$  GSH und  $25 \mu\text{M}$  FP für 5 Minuten bei RT in HEDS-Puffer inkubiert und anschließend das verbrauchte GSH durch Endpunktbestimmung mit  $100 \mu\text{M}$  NADPH und  $200 \text{ mU/ml}$  GR ermittelt. Die Interaktion  $\text{NADPH} \leftrightarrow \text{FP}$  wurde berücksichtigt; eine mögliche direkte Reduktion von FP durch die relativ hoch konzentrierte GR wurde ausgeschlossen. Die pH-Abhängigkeit des GSH-abhängigen FP-Abbaus (bei pH 7.0 maximal, bei pH 8.0 dagegen kaum mehr messbar; Atamna und Ginsburg, 1995) konnte hier bestätigt werden (HEDS-Puffer pH 8.0; GSH-Verbrauch =  $2.3 \text{ nmol/ml} \times \text{min}$ ).

Weitere Kontrollversuche lassen vermuten, dass FP selbst in den Assays ohne Einwirkung einer anderen Assay-Komponente eine Veränderung seines Spektrums erfährt, die bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  zu einer Absorptionsabnahme von schätzungsweise  $0.009 \text{ min}^{-1}$  führt. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die Hemmung durch FP grundsätzlich eher unterschätzt wurde und die ermittelten prozentualen Werte als Minimalwerte angesehen werden können. Diese Absorptionsabnahme wird durch unterschiedliche Komponenten verstärkt (Tabelle 3.17). Die gezeigten Daten kommen durch systematische Tests zustande, nachdem eine Untersuchung der Hemmung von PFTPx1 durch FP aufgrund starker Hintergrundreaktionen der entsprechenden Assaykomponenten nicht möglich war.

Kombination →	0	1	2		3		4		5	
ASSAY-KOMPONENTE ↓			K	P	K	P	K	P	K	P
NADPH (ad 100 $\mu\text{M}$ )			x	x	x	x	x	x	x	x
TrxR (ad 10 mU/ml)					x	x			x	x
Trx (ad 10 $\mu\text{M}$ )							x	x	x	x
FP (ad 25 $\mu\text{M}$ )	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ad 200 $\mu\text{M}$ )		x		x		x		x		x
<b><math>\Delta\text{A}/\text{min}</math></b>	<b>0.009</b>	<b>0.028</b>	<b>0.019</b>	<b>0.198</b>	<b>0.019</b>	<b>0.197</b>	<b>0.019</b>	<b>0.107</b>	<b>0.013</b>	<b>0.073</b>
<b><math>\Delta\text{A}/\text{min}</math> korrigiert</b>				<b>0.179</b>		<b>0.178</b>		<b>0.088</b>		<b>0.06</b>

Tabelle 3.18. Pipettierschemata und Ergebnisse der Untersuchung einer Interaktion  $\text{FP} \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ .

Erkennbar ist die vielfach beschriebene (u. a. Ribeiro *et al.*, 1997), peroxidvermittelte FP-Degradation (Probe 1), die durch die Anwesenheit von NADPH synergistisch verstärkt wird (Probe 2). Probe 4 deutet auf die FP-Bindungs-fähigkeit von Trx hin – das Protein scheint als FP-Puffer zu wirken und somit den Abbau zu vermindern. Der fehlende Einfluss der TrxR (Probe 3) ist wahrscheinlich in der geringen Konzentration begründet (ca.  $0.16 \mu\text{M}$ ). Durch ihre Anwesenheit zusätzlich zu Trx ergibt sich jedoch eine weitere Verringerung der Absorptionsabnahme (Probe 5).

## 4 Diskussion

### 4.1 Thioredoxine und Thioredoxin-ähnliche Proteine aus *Plasmodium falciparum*

Für *Plasmodium falciparum* war bislang nur ein Thioredoxin bekannt, das aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit als Trx1 bezeichnet wird. Es erfüllt mit seinen 13 kDa und der *active site*-Sequenz WCGPC die sequenziellen Anforderungen an ein klassisches Trx. Auch die übrigen Charakteristika - Substrateigenschaft an PfTrxR ( $K_M = 10.4 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 3100 \text{ min}^{-1}$  ( $K_M$  an der hTrxR =  $2 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 3300 \text{ min}^{-1}$ )) (Kanzok *et al.*, 2000) und Ribonukleotidreduktase (Rahlfs *et al.*, 2003) - sind gegeben. Trx1 besitzt ein mittleres Redoxpotential von -270 mV (pH 7.4, 25°C) und reduziert Glutathiondisulfid ( $k_2 = 650 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei pH 7.4 und 25°C) (Kanzok *et al.*, 2000).

Vergleicht man PfTrx1 mit Säuger-Trx, so ergibt sich eine höhere Ähnlichkeit zu cytosolischen als zu mitochondrialen Vertretern. In Anbetracht der starken Belastung von Pf mit ROS ist die Existenz weiterer, eventuell kompartimentierter Thioredoxine wahrscheinlich.

Sind die im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten und bearbeiteten Trx-ähnlichen Proteine wirkliche Thioredoxine?

Sie besitzen alle in etwa eine Trx-typische Größe (15.69, 16.1, 14.08, 19.15 kDa einschließlich His-tag) und wurden über Blasts mit der Sequenz des PfTrx1, d. h. über Sequenzhomologie zu diesem typischen Trx entdeckt. Die Ähnlichkeit aller Trx-Proteine aus Pf zusammengenommen ist jedoch nur mäßig (Abb. A3). Allerdings zeigen auch Säuger-Trx-Formen lediglich 25-35% Identität. Das kürzlich beschriebene humane TRP14 beispielsweise ist dem hTrx1 noch weniger ähnlich (20% Identität; Jeong *et al.*, 2004).

Im Trx-*active site*-Motiv (W)CGPC(K) werden Tryptophan und Lysin meist als optional betrachtet. Das übrige Motiv CGPC hat von den neu identifizierten Pf-Proteinen nur Tlp1. Die Abfolge CAPC (PfTlp2) wird von verschiedenen Autoren als alternativ zur CGPC-Sequenz aufgeführt (Nogoceke *et al.* 1997; Alphey *et al.*, 2003). Jacquot *et al.* beschreiben die Sequenz WC[G/P]PC (2002). Allgemein werden z. T. Glycin und Prolin als nicht zwingend notwendig angesehen (Gromer *et al.*, 2004). In diesem Fall bliebe lediglich CXXC als Kernmotiv übrig, womit alle hier beschriebenen Pf-Proteine Trx sein könnten. Die typische Thioredoxinstruktur, die eng mit der CXXC-Sequenz verknüpft ist, bildet ein weiteres Trx-Kriterium. Den sog. *thioredoxin fold*, bestehend aus 5 zentralen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen umgeben von 4  $\alpha$ -Helices, besitzen jedoch nicht nur die Trx im engeren Sinne, sondern zahlreiche andere Proteine, die zumeist auch ein CXXC-Motiv beinhalten (Glutaredoxine, Proteindisulfidisomerasen etc.). Diese Faltung ist für die beschriebenen Proteine zwar zu mutmaßen, aber nicht näher untersucht.

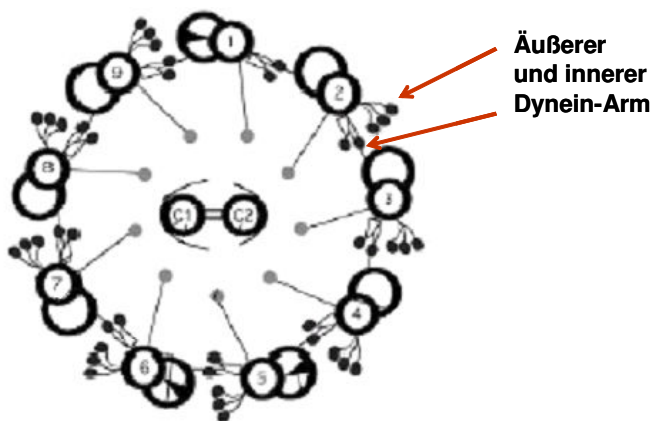
Trx im eigentlichen Sinne wurde über seine Funktion bei der DNA-Synthese entdeckt (Holmgren, 1989). Die Reduktion der Ribonukleotidreduktase wurde bislang für keines der neuen Pf-Proteine getestet. Diese Eigenschaft ist jedoch ebenfalls nicht Trx-spezifisch: Auch Glutaredoxine und möglicherweise weitere Proteine mit CXXC-Motiv und *thioredoxin fold* können als Elektronendonoren für RiboR dienen.

Für die hier vorgenommene Bezeichnung der neuen Pf-Proteine als Trx oder Tlp (*Thioredoxin-like protein*) gab die Reduzierbarkeit durch TrxR den Ausschlag.

In Säuger-Trx1 sind einige strukturell bedeutsame AS konserviert (Spyrou *et al.*, 1997); diese sind jedoch in keinem PfTrx vollständig enthalten (Tabelle A2).

#### 4.1.1 *Thioredoxin-like protein 1 (Tlp1)*

Die wie Trx1 auf Chromosom 14 befindliche Sequenz für Tlp1 zeigt im Blast deutliche Ähnlichkeit zu der *intermediate chain* des Dynein-Moleküls aus *Ciona intestinalis* und der *Dynein-light chain* von *Chlamydomonas reinhardtii*. Dyneine sind Proteinmultimere mit ATPase-Aktivität, die mit den Mikrotubuli assoziiert vorliegen und als molekulare Motoren für Flagellenbewegung und intrazellulären Transport fungieren.



**Abb. 4.1. Schematische Darstellung eines flagellaren Axonems im Querschnitt.** Nach Silflow und Lefebvre, 2001. Die Nummerierung bezeichnet die äußeren Mikrotubulus (Mt)-Doubletten; c1 und c2 bilden das zentrale Mt-Paar.

Der äußere Arm des flagellaren Dyneins von *Chlamydomonas* besteht aus drei schweren, die ATPase-Aktivität beinhaltenden Ketten, zwei mittleren (*intermediate*) und 8 verschiedenen leichten Ketten (Silflow und Lefebvre, 2001). Zwei dieser leichten Ketten (Mw 14 bzw. 16 kDa) gehören zur Thioredoxin-Superfamilie: Sie besitzen das CGPC-Motiv und können über Phenylarsenoxid gereinigt werden, was als Nachweis der Redoxaktivität dient. Letztere ist, wie gezeigt wurde, auch im nativen Molekül (äußerer Arm) vorhanden. Die physiologische Funktion insbesondere des Trx-Motivs ist noch nicht völlig geklärt. Thiolgruppen spielen jedoch eine wichtige Rolle für die ATPase-Aktivität des Dyneins (Patel-King *et al.*, 1996). Der Einfluss des Redoxzustandes von SH-Gruppen auf die Aktivität des *outer arm* wurde nachgewiesen (Harrison *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass mittlere und leichte Ketten an der Regulation der Dynein-Aktivität beteiligt sind, ebenso wie an der Bindung der „Fracht“ (Vesikel, Organellen) (Silflow und Lefebvre, 2001).

Sadek *et al.* (2003) nehmen für die Thioredoxin-Familie eine Unterteilung vor in Proteine, die ausschließlich aus der Trx-Domäne bestehen (Gruppe I, z.B. hTrx1) und Fusionsproteine mit weiteren Domänen (Gruppe II). Zur zweiten Gruppe werden die o. g. *Chlamydomonas*-Proteine DLC14 und 15 gerechnet, des Weiteren die spermatid-spezifischen Proteine Sptrx-1 und -2, die *dynein intermediate chain* IC1 aus dem Sperma-Axonem des Seeigels und die IC3 von *Ciona intestinalis*. Alle genannten Proteine werden assoziiert mit Mikrotubulus (Mt)-Strukturen gefunden und besitzen C-terminal zur Thioredoxin-Domäne eine oder mehrere

Nucleosiddiphosphat (NDP)-Kinase-Domänen (Padma *et al.*, 2001). NDP-Kinasen katalysieren den Transfer von  $\gamma$ -Phosphaten zwischen Nucleosiden und Nucleosidi- bzw. -triphosphaten. Ein Blast der annotierten Peptide von Pf mit der bekannten Pf-NDK zeigte zwar auch ein kurzes ähnliches Fragment von Chromosom 14, das zugehörige Peptid enthält aber laut „CD“ (*Conserved Domain*)-Search keine Kinase-Domäne.

Die Trx-Domäne des humanen Tx12 (Mw = 36.9 kDa, Trx-Domäne 105 AS; Sadek *et al.*, 2003), ebenfalls einem Mitglied der Gruppe II, zeigt im Insulin-Assay weder mit DTT als Reduktionsmittel noch mit dem TrxR-System Aktivität. Lediglich im Kompetitionsassay mit Trx1 und dem TrxR-System konnte eine leichte, aber konzentrationsabhängige Wirkung von Tx12 festgestellt werden: Bei äquimolarem Verhältnis der beiden Trx-Proteine ergab sich eine etwa 10%ige Hemmung verglichen mit dem Assay ohne Tx12. Tlp1 zeigt in entsprechendem Assay keine Hemmung der Trx1-Reduktion, mit DTNB als Substrat war jedoch sogar eine Aktivierung festzustellen.

Im humanen System wurde kürzlich eine weitere Verbindung zwischen Cytoskelet und Trx-System nachgewiesen: Tubulin, Baustein der Mikrotubuli, sowie die Neuronen-spezifischen Mt-assoziierten Protein Tau und *microtubule-associated protein 2* sind reich an SH-Gruppen und bilden unter Peroxynitrit- oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung Disulfidbrücken aus. Dadurch wird die Mt-Assemblierung beeinträchtigt. Alle drei Proteine können durch das Trx-System, Tubulin sogar auch durch das Grx-System reduziert werden. Während Peroxynitrit-Exposition die Mt-Polymerisierung bei Schweinehirn-Tubulin hemmt, kann der Vorgang mit Hilfe des Glutaredoxin-Systems wieder normalisiert werden (Landino *et al.*, 2004a). Es ist demnach davon auszugehen, dass die Mt-Polymerisierung redox-abhängig reguliert wird (Landino *et al.*, 2004b). Für PfTlp1 war jedoch unter den gewählten Bedingungen keine Interaktion mit dem Grx-System feststellbar.

Im Cytoplasma von Pf-Merozoiten ist Dynein v. a. in der späten Merogonie, kurz vor Freisetzung der Merozoiten nachweisbar (Fowler *et al.*, 2001). In Anbetracht der hohen Teilungsrates und der starken Kompartimentierung des Organismus ist eine große Bedeutung eines gut ausgebildeten und eng regulierten intrazellulären Transportsystems wahrscheinlich. Es ist denkbar, dass das hier identifizierte Tlp1 mit einer *light chain* von Pf-Dynein identisch ist. BLAST-Vergleiche des Pf-Genoms mit mittleren und schweren Dynein-Ketten aus *Chlamydomonas* ergaben ebenfalls deutliche Treffer.

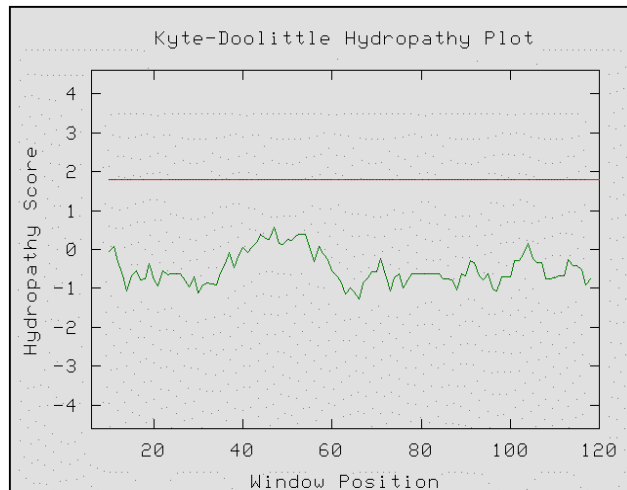
Dass das Disulfid-Vorhersageprogramm „Disulfind“ keine Verbrückung für die Tlp1-Sequenz findet, könnte anzeigen, dass Tlp1 tatsächlich nicht als klassisches Trx fungiert, sondern vielmehr als Regulationsprotein.

Das humane Sptrx-1 besitzt zahlreiche Phosphorylierungsstellen, was seine Bedeutung als Regulationsfaktor (noch) wahrscheinlicher macht (Miranda *et al.*, 2001). Laut „Prosit“ besitzt auch Tlp1 neben dem Trx-Motiv modifizierbare Domänen, zu denen verschiedene Phosphorylierungs-, aber auch Sulfatierungsstellen gehören (Tabelle A3). Darüberhinaus sind in der Sequenz zusätzliche Cysteine vorhanden (C69, 83 und 102), die Bedeutung für Interaktionen haben könnten, wie es bei Säuger-Trx der Fall ist (Powis und Montfort, 2001).

Das Alignment in Abb. A3 lässt ferner die Möglichkeit zu, dass Tlp1 etwas kürzer ist als bisher angenommen. Die Abfolge IDEHL passt sehr gut zur Schlusssequenz von Trx2 (IKKHL).

#### 4.1.2 *Thioredoxin-like protein 2 (Tlp2)*

Das Pf-*Thioredoxin-like protein 2* besitzt die mutmaßliche *active site* CAPC. Die Expression des Proteins war sowohl heterolog *in vivo* als auch *in vitro* schwierig. Bei beiden Methoden ist das Protein deutlich mit dem Pellet assoziiert, was auf Membranständigkeit hindeutet. Der Hydrophobizitätsplot indiziert dies jedoch nicht (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2. Kyte-Doolittle-Plot der Aminosäuresequenz von Tlp2.**

Im Kyte-Doolittle-Plot (Kyte und Doolittle, 1982) erhält jede Aminosäure einen score zwischen 4.5 (sehr hydrophob) und -4.5 (sehr hydrophil). Regionen, die sich über dem als rote Linie gekennzeichneten score von 1.8 befinden, zeigen mögliche Transmembranregionen an.

Das Protein zeigt allgemeine Redoxaktivität im Insulin-Assay, ist jedoch nicht durch PfTrxR reduzierbar, woraus die Bezeichnung Tlp resultierte. Zusätzlich zu den Cysteinresten an Position 53 und 56

findet sich Cys17. Das Programm „Disulfind“ sagt für diese Konstellation eine Disulfid-Bildung zwischen C17 und C53 vorher.

Kürzlich wurde ein humanes Transmembranprotein mit Trx-Motiv beschrieben, welches CPAC lautet (Matsuo *et al.*, 2004). Diese Abfolge wird als für TMX (*Transmembrane trx-related protein*) einzigartig bezeichnet. Das Protein ist 30 kDa groß, besitzt ein N-terminales Signalpeptid (26 AS) und ist im ER lokalisiert. Das Protein besitzt kein typisches Retentionssignal für das ER. Es konnte Aktivität im Insulin-Assay gezeigt werden, ebenso wie im *scrambled RNase-assay*. Bei letzterem wird die Fähigkeit getestet, aufgrund inkorrekt Disulfidbindungen inaktive RNase zu renaturieren. Die Autoren vermuten daher eine Funktion bei der Proteinfaltung ähnlich der PDI. Es wurden Orthologe in verschiedenen Spezies gefunden, die ebenfalls das CPAC-Motiv besitzen und integrale Membranproteine zu sein scheinen (Matsuo *et al.*, 2004). Das aufgrund des sehr ähnlichen *active site*-Motivs durchgeführte Alignment (Abb. A4) fällt zwar nur geringfügig positiver aus als der Vergleich TMX ↔ Trx1 (28 \* vs. 26\*), deutlich besser ist mit Tlp2 jedoch die Übereinstimmung am N-Terminus, d. h. mit dem Signalpeptid des TMX (rot unterlegt). Vorhersageprogramme hatten für Tlp2 kein Signalpeptid gefunden. Zieht man, abgeleitet von Abb. A4, die ersten 21 AS der Sequenz doch als SP in Betracht, ändert sich konsequenterweise die Disulfidbrücken-Vorhersage zugunsten eines *active-site*-Disulfids. Diese Änderung könnte die fehlende Aktivität des bisher untersuchten Tlp2-Proteins im TrxR-Assay (vorläufige Ergebnisse; nicht gezeigt) erklären. Das nicht alignte Fragment in der Mitte der TMX-Sequenz entspricht in etwa der mutmaßlichen Transmembrandomäne des Proteins (nach „DAS“-*Transmembrane Prediction Server*).

Für weitere Untersuchungen wäre interessant, ob auch Tlp2 die Missfaltung von RNase im PDI-Assay korrigieren kann. Neben der typischen PDI-Funktion ist auch die umgekehrte



Richtung, die Reduktion von Disulfidbrücken denkbar, um abzubauen Proteine zu entfalten und so der ERAD (*ER-associated degradation*) zugänglich zu machen (Matsuo *et al.*, 2004).

Ein Blast des *Plasmodium*-Genoms mit TMX findet allerdings Sequenzen mit deutlich stärkerer Ähnlichkeit; so befindet sich z. B. auf Chromosom 13 ein Fragment mit 48 Übereinstimmungen zu TMX (*active site*-Motiv WCSHC).

Eine weitere Lokalisationsmöglichkeit ergibt sich aus den Vorhersagen der Programme „PlasMit“ und „MitoProt“. Sie errechnen für Tlp2 eine mitochondriale Lokalisation (91% bzw. 0.861 *probability score*).

### 4.1.3 Thioredoxin 2 (Trx2) und Thioredoxin 3 (Trx3)

Die beiden hier beschriebenen neuen Thioredoxine aus Pf werden mit unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit als Apicoplast-lokalisiert vorhergesagt (Trx2: nur „PATS“ *Neural Network* positiv; Trx3: auch Plasmo-AP positiv).

Über Trx dieser speziellen Organelle ist noch nichts bekannt, wohl aber über das Thioredoxin-System in den verwandten Chloroplasten. Die wohl wichtigste Aufgabe der dort lokalisierten Trx ist die Redoxregulation lichtabhängig arbeitender Enzyme der Kohlenstoffassimilation. Einzigartig ist das Chloroplasten-Trx-System aufgrund seiner reduktiven Seite: Nicht  $\text{NADP}^+$  dient als Elektronendonator, sondern das Protein Ferredoxin (Fd), welches die Elektronen direkt von Photosystem I erhält (Vollmer *et al.*, 2001). Neben der Trx-Reduktion, katalysiert durch die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR), kann  $\text{NADP}^+$  über die Ferredoxin- $\text{NADP}^+$ -Reduktase (FNR) der Elektronenakzeptor sein (Pandini *et al.*, 2002). Der Elektronenfluss über die FNR kann auch in die umgekehrte Richtung erfolgen und Fd als Reduktionsmittel für andere plastidäre Enzyme dienen (Vollmer *et al.*, 2001). Für *Toxoplasma gondii* wurde ein plastidäres Reduktionssystem aus Ferredoxin und FNR identifiziert (Vollmer *et al.*, 2001; Pandini *et al.*, 2002); für Pf ist bislang lediglich das Ferredoxin charakterisiert.

Eine weitere Besonderheit im Chloroplast ist das Vorkommen vier verschiedener Trx-Varianten mit spezifischen Aufgaben in einer Organelle. So kann beispielsweise Trx *f* bei der Aktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase nicht durch Trx *m* ersetzt werden (Jacquot *et al.*, 2002; Collin *et al.*, 2003). Die Bezeichnung Trx *m* rührt von der Aktivierung der Malatdehydrogenase (MDH); diese Funktion kann jedoch auch von den anderen Trx ausgeführt werden (Collin *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 1999). Die dritte Form, Trx *x*, ähnelt der Sequenz nach bakteriellen Homologen und zeigte sich als der effektivste Elektronendonator für das Trx-abhängige 2-Cys-Prx aus *Arabidopsis* (Collin *et al.*, 2003). Trx *y* wurde erst kürzlich beschrieben und zeichnet sich durch hohe Konservierung in photosynthetischen Organismen aus. Trx *y* stellt das erste plastidäre Trx dar, welches die Fructose-1,6-bisphosphatase aktivieren kann, nicht aber die NADP-MDH. Darüber hinaus unterscheidet sich Trx *y* hinsichtlich Hitze- bzw. Kältestabilität und pH-Toleranz deutlich von anderen Trx (Lemaire *et al.*, 2003). Die Spezifität der Plastid-Trx ist nicht allein durch mögliche Unterschiede der Redoxpotentiale erklärbar (Collin *et al.*, 2003). Die Reduktion der Chloroplast-Trx durch cytosolische NTR erfolgt nur mit geringer Effizienz (Lemaire *et al.*, 2003).

In Anbetracht der zahlreichen Regulationsfunktionen von Trx im Chloroplast und der Spezifität der verschiedenen Proteinvarianten ist es denkbar, dass der verwandte Apicoplast trotz Verlust der Photosynthese-Fähigkeit ein oder mehrere Trx besitzt. Trx2 und 3 werden durch die bekannte PfTrxR nur schlecht reduziert; die  $K_M$ -Werte liegen für beide Proteine deutlich über 100  $\mu$ M. Falls es sich tatsächlich um Plastid-Proteine handelt, verwundert dies angesichts der wahrscheinlich cytosolischen Lokalisation der PfTrxR nicht. Es wäre für die Zukunft interessant, zu testen, ob Trx2 und 3 durch das PfFd reduzierbar sind.

Zur Einordnung der Pf-Trx in die pflanzlichen Trx-Gruppen wurden mehrere Alignments durchgeführt, deren Anzahl Übereinstimmungen (\* in der Darstellung) in Tabelle 4.1 aufgeführt sind:

	PfTrx1	PfTrx2	PfTrx3
AtTrx <i>m1</i>	33	35	26
AtTrx <i>f1</i>	37	27	29
AtTrx <i>x</i>	33	35	36
AtTrx <i>y1</i>	34	26	32
AtTrx <i>y2</i>	33	31	27
AtTrx <i>o1</i>	40	33	39
AtTrx <i>h1</i>	39	28	28
PfTrx1		33	32

**Tabelle 4.1. Übereinstimmungen zwischen Trx aus *Arabidopsis thaliana* (At) und Pf.**

Die jeweils höchsten Übereinstimmungen sind grau hinterlegt

PfTrx1 zeigt die stärkste Übereinstimmung mit dem cytoplasmatischen (Trx *h1*) und dem mitochondrialen (Trx *o1*) Ortholog. Zwar ist für die neuen Pf-Proteine die Identität zu den pflanzlichen Verwandten nicht ganz so hoch, die

Proteine ordnen sich aber sehr gut übereinander an, wie das Beispiel verdeutlicht:

PfTrx2	MKKYIFFFLFSFIN---FFFVYDVT---CTKEVTSTNDDPLTPLNRFDKYYLRMFKKVPR
AtTrxm1	MAAYTCTSRPPIISIRSEMRIASSPTGSFSTRQMFVSLPESSGLRTRVLSLSSLSKNSRVSR
	* * .: : . . * .*: : : * . :. .*. . * .:*. *
PfTrx2	LQQ-----NGSNIING-----VNMKNTVIVLYFFAKWCQACTMQSTEMDKLQKY
AtTrxm1	LRRGVICEAQDTATGIPVVDNSTWDSLVLKADEPVFVDFWAPWCGPCKMIDP IVNELAQK
	*: : . * : : * . * : : : * : * * .*. * .. : : * :
PfTrx2	YGKRIYLLKVDLKDKNESLARKFSVKSLPTI ILLKNKTMLARKDHFVSSNDLIALIKKHL
AtTrxm1	YAGQFKFYKLNTPATPGQYGVRSIPTIMIFVNGEKKDTIIGAVSKDTLATSINKFL
	*. : : : * : : * : . : . : : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

**Abb. 4.3. Alignment von PfTrx2 mit dem Trxm1 aus At.**

Vorhersageprogramme zur Lokalisation zeigen die Spaltstelle des möglichen Signalpeptids, machen aber keine Angabe zur Länge des Transitpeptides, welches für das Apicoplast-Targeting verantwortlich ist. Das Alignment von PfTrx3 mit AtTrxy1 könnte möglicherweise einen Hinweis auf die Sequenz des reifen Trx3 geben (Abb. 4.4).

Erstaunlich ist hier die Übereinstimmung im grün unterlegten Bereich. Wie bereits erwähnt, ist bei den Proteinen vom Typ *y* nicht nur das *active site*-Motiv, sondern die gesamte Sequenz vergleichsweise hoch konserviert. Während die putativen Signalpeptide noch recht heterogen sind, beginnt die hohe Sequenzähnlichkeit mit dem N-Terminus des mutmaßlich reifen At-Proteins. Insbesondere der grau unterlegte Bereich ist in der *y*-Gruppe streng konserviert

(meist VEAKKQ; Lemaire *et al.*, 2003). PfTrx1 und 2 besitzen genannte Abfolge nicht. Da bislang nur die um das SP verkürzte Trx3-Sequenz exprimiert wurde, ist für weitere Untersuchungen auch eine zweifach verkürzte Variante interessant.

PfTrx3	MALICIGSVCFSLFHIGVILLIINYFSSHIKKIFPSFFKNPNKKEIDKHIGNI	<u>LEAKRK</u>
AtTrxy1	MASISLSSSTVPSLNS--KESGVSASFAS--RSISAVKFQFPVRR-----	<u>TEAKKQ</u>
	** *...* .. :: :. ** :.* . *: * :. :***::	
PfTrx3	NKQLEQSIYIELKNTGSLNQVFSSTQNSSIVIKFGAVWCKPCNKIKEYFKNQLN--YYV	
AtTrxy1	T-----F--D-SFEDLLVNS-DKPVLVDYYATWCGPCQFMVPIILNEVSETLKDKI	
	. : *::::: .: ::::::: *.** **: : ::: : :	
PfTrx3	TLVDIDVDIHPKLNQHNIALPTFEFYFNLNNEWVLVHTVEGANQNDIEKAFQKCYCLEK	
AtTrxy1	QVVKIDTEKYPSIANKYKIEALPTFILFKDGE----PCDRFEGALTAKQLIQRIEDSLKV	
	:*.**.: :*.: ::::*:***** : : : . .*** . : .*:	
PfTrx3	AK	
AtTrxy1	KP	

**Abb. 4.4.** Alignment von PfTrx3 mit dem Trx y1 aus At.

Die Ähnlichkeit der N-Termini in den Abb. 4.3 und 4.4 unterstreicht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei Trx2 und 3 um plastidäre Formen handelt.

Laut „PlasMit“, einem Vorhersage-Programm speziell für mitochondriale Proteine aus Pf, sind beide Trx zu 99% keine mitochondrialen Proteine; „MitoProt“, ein allgemeines Programm, bestätigt die geringe Wahrscheinlichkeit für Trx2 und findet für Trx3 eine Wahrscheinlichkeit von 48%. Für Trx3 fällt jedoch die gute Übereinstimmung zum mitochondrialen At-Protein auf (Tabelle 4.1). Die Ähnlichkeit des Trx3 sowohl mit plastidärem als auch mitochondrialem AtTrx ist nicht widersprüchlich: Für pflanzliche Proteine ist bereits das duale Targeting zu diesen beiden Organellen beschrieben (Laloi *et al.*, 2001). Trx3 ist mit 19.15 kDa einschl. His-tag das größte der hier beschriebenen Trx-Proteine. Geht man vom Gesamtprotein aus, umfasst es 180 AS; nimmt man das Motiv LEAK als Start der reifen Sequenz an, sind es 121 AS. Das mitochondriale Trx der Ratte ist 166 bzw. 106 AS lang (Mw = 18.2 bzw. 12.2 kDa) (Spyrou *et al.*, 1997). Die Länge des möglichen SP ist damit sehr ähnlich. Auch das mitochondriale Trx aus dem Schweineherz ist mit einem Molekulargewicht von 18 kDa etwas größer als cytosolische Homologe (Bodenstein und Follman, 1990). Für pflanzliche mitochondriale Trx werden Funktionen bei der Cytochrom c-Bildung („Reifung“, Bindung von Häm an Apocytochrom c), der Redoxkontrolle verschiedener Enzyme (z. B. Citratsynthase und Alternative Oxidase) und der Reduktion von Prx in Betracht gezogen (Laloi *et al.*, 2001). Defizienz von mitochondrialem Trx führt bei Säugern zur Apoptose, nicht nur aufgrund mangelnder ROS-Entgiftung sondern auch über die Beteiligung des Proteins an Gen- und Enzymregulation (Tanaka *et al.*, 2002). Die Regulation des Apoptose-Enzyms Caspase wird über Trx vermittelt (Ueda *et al.*, 1998). Dass auch Pf-Parasiten wahrscheinlich Apoptose eingehen können, wurde kürzlich beschrieben (Deponte und Becker, 2004).

Wenn auch die Apicoplast-Vorhersage für Trx2 nicht ganz eindeutig war, so sind sich doch die Programme über die Existenz eines Signalpeptids in beiden Sequenzen einig. Es ist

demnach zumindest der Eintritt in das Endomembransystem wahrscheinlich. Das C-terminale Motiv KKHL in Trx2 erinnert deutlich an ein ER-Rückhaltesignal, welches im allgemeinen KDEL lautet (Wilkinson *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist auch die Abfolge KKXX als Signalmotiv für ein ER-Protein beschrieben (Baunaure *et al.*, 2004). Für Trx2 ergibt sich eine interessante Parallele zu PfAOP, da in beiden Fällen eine Apicoplast-Lokalisation in Betracht kommt, für AOP jedoch eine ER-Lokalisation gezeigt wurde (siehe 3.5.15).

Trx3, für das nach bisherigen Erläuterungen sowohl Apicoplast- als auch Mitochondrium-Lokalisation nicht auszuschließen ist, könnte nach der Vorhersage von „Predotar“ auch ein ER-Protein sein (*probability score* = 0.51; die Interpretationsanweisungen besagen, dass für eine Sequenz, für die ohnehin Targeting angenommen wird, bereits ein score von 0.2 aussagekräftig sein kann).

Ein allgemeiner BLAST mit PfTrx2 findet v. a. verschiedene Säuger-Trx2 (Trx2 bezeichnet in Säugerorganismen das mitochondriale Trx) und Proteindisulfidisomerasen. Die Suche nach konservierten Domänen („CD“-*Search*) zeigt neben der Trx-Domäne auch die der COG3118-Familie (*Thioredoxin domain-containing proteins*) und eine Gruppe von PD-Isomerasen. Beides könnte auf eine Lokalisation und Bedeutung von Trx2 im ER hinweisen.

Mit der Trx3-Sequenz dagegen taucht die PDI-Domäne nicht auf; dem BLAST kann kein Verwandtschaftsgrad zu einer bestimmten Trx-Gruppe entnommen werden.

Für Pf sind vier PDI-Gene annotiert, ein weiteres wird von Bozdech und Ginsburg postuliert. Darüberhinaus besteht die Annotation eines Gens für Ero1p (Oxidoreduktin), welches die PDI oxidiert und somit regeneriert. Mit der Sequenz der klassischen, charakterisierten PDI (*Gene ID*: MAL8P1.17) zeigt Trx2 deutliche Ähnlichkeit (41\* vgl. mit 27\* im Alignment PDI ↔ Trx1). Während Trx1 im Alignment mit PDI über deren N-terminaler katalytischer Domäne angeordnet wird, „align“ Trx2 v. a. mit der katalytischen Domäne im C-Terminus.

PDI besitzt *in vitro* sowohl Oxidase- als auch Isomerase-Aktivität. Letztere, welche die Reduktion von Disulfidbrücken anderer Proteine beinhaltet, ist *in vivo* zwar, wie für Hefe gezeigt wurde, nicht überlebensnotwendig, aber vorhanden (Xiao *et al.*, 2004). Somit kommen als Funktion für ein ER-lokalisiertes Trx sowohl die PDI-Aktivität selbst in Betracht als auch die elektronenliefernde Rolle bei der Isomerase-Aktivität der charakteristischen PDI. Ebenfalls denkbar wäre die Redoxregulation der verschiedenen Funktionen der PDI, wie sie für das Säuger-ER-Protein ERdj5 postuliert wird (Cunnea *et al.*, 2003). Für dieses Protein, das eine Trx-Domäne besitzt, wird ferner eine vorbereitende Funktion für ERAD in Betracht gezogen: Um Proteine, die sich nicht richtig falten, diesem ER-assoziierten Proteinabbau (Brodsky und McCracken, 1999) zugänglich zu machen, müssen sie wieder entfaltet werden. Die dazu nötige Disulfidreduktion könnte auch eine Funktion eines ER-Trx sein.

Eine mögliche duale Lokalisation von Trx in Apicoplast und ER wird gestützt durch Studien mit AtTrx (Marchand *et al.*, 2004). Verschiedene Proteindisulfidisomerasen wurden als Trx-Targets identifiziert, darunter auch die FKBP-Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase, die sich im Thylakoid-Lumen befindet. Eine Proteomanalyse der dort lokalisierten Proteine lässt auch die Präsenz eines m-Typ-Trx vermuten, welches als Elektronendonator wirken könnte (Peltier *et al.*, 2002). Zu den weiteren Targets des AtTrx gehören neben Enzymen von Calvin-Zyklus, Aminosäure-Stoffwechsel und auch Proteine der ROS-Abwehr, wie das chloroplastische Typ II-Prx (Bréhélin *et al.*, 2003), Peptidmethionin-Sulfoxidreduktase, Dehydroascorbat-

Reduktase, Ascorbat-Peroxidase und GST. In Anbetracht der Lokalisationsmöglichkeiten für das hier beschriebene PFAOP (Apicoplast, ER) erscheint die Existenz eines Trx als Elektronendonator in beiden Kompartimenten sinnvoll.

Ebenfalls interessant für Überlegungen bezüglich Pf ist die beobachtete intensive Interaktion von Trx mit Ferredoxin (Marchand *et al.*, 2004). Es ist demnach nicht unwahrscheinlich, dass ein plastidäres PfTrx in Pf auch durch PfFd reduziert werden kann.

Insgesamt sind 10 der identifizierten Trx-Targets cytosolisch, 2 mitochondrial, 21 dagegen im Chloroplast lokalisiert (Marchand *et al.*, 2004). Die potentielle Bedeutung von Trx für den Chloroplast erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass der verwandte Apicoplast ebenfalls Trx beinhaltet.

In Säuger-Organismen ist neben der Existenz der ubiquitären Trx-Systeme 1 (cytosolisch) und 2 (mitochondrial) das gewebespezifische Vorkommen erwähnenswert. So besitzen Spermien mehrere spezifische Trx-Proteine, von denen eines (SPTRX-3) im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Jiménez *et al.*, 2004). Während der Spermio-genese unterliegt die Keimzelle drastischen morphologischen und biochemischen Veränderungen. Dabei entstehen einzigartige Strukturen wie beispielsweise das Akrosom, welches sich aus Golgi-Vesikeln formiert. Die Situation ist der von Pf nicht ganz unähnlich. Auch dieser Organismus ist hochstrukturiert und das Material für die sekretorischen Organellen entstammt dem Golgi-Apparat (Topolska *et al.*, 2004).

Was eine mögliche Regulationsfunktion der PfTrx2 und 3 betrifft, so besitzt Trx2 innerhalb der Sequenz des reifen Proteins keine Cysteinreste zusätzlich zum aktiven Zentrum, es enthält aber einige Motive, die für posttranslationale Modifikationen in Frage kommen, darunter mehrere Phosphorylierungs- und N-Glycosylierungsstellen und eine Amidierungsstelle (Tabelle A4).

Wird die Sequenz des putativ reifen Proteins zugrunde gelegt, sagt das Programm „Disulfind“ eine Disulfidbrücke im *active site*-Motiv voraus. Für Trx3 verbindet Disulfind in der Gesamtsequenz die Cysteinreste 5 und 102 bzw. 10 und 99, während bei Annahme des Startmotivs LEAK die Reste des WCKPC-Motivs verbrückt werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass die hier bearbeitete Sequenz noch nicht das reife Protein darstellt, sondern Trx3 in der Tat ein Transitpeptid besitzt. Trx3 hat ein weiteres Cystein in der reifen Proteinsequenz (Position 175 bzw. 116) und somit eine potentielle Redoxregulations- oder Oligomerisierungsstelle. Darüber hinaus werden von „Prosit“ neben mehreren Phosphorylierungsmöglichkeiten eine N-Glycosylierungs- und eine N-Myristoylierungsstelle ermittelt (Tabelle A5).

Für die Gene von Trx2 und 3 ebenso wie für Tlp2 sind Daten zur Transkription im Verlauf des Zellzyklus verfügbar (Bozdech und Ginsburg, 2003). Tlp2 und Trx3 (Expressionsdaten beziehen sich allerdings auf falsche Sequenzvorhersage) werden demnach wahrscheinlich, genau wie Trx1, im frühen Schizont am stärksten transkribiert. In dieser Phase befindet sich die Transkription des Trx2-Gens im Minimum. Letztere ist bereits direkt nach der Invasion hoch, bleibt während des Ringstadiums stark und nimmt im Trophozoit schnell ab.

Die TrxR-Transkription ist im Schizont am intensivsten. Für Trx1 und 3 wird das mögliche regenerierende Enzym demnach parallel exprimiert. In Bezug auf Trx2 könnten diese Daten

anzeigen, dass TrxR nicht der physiologische Elektronendonator ist, was mit der hier beschriebenen geringen Affinität gut übereinstimmt. Dass gerade für Trx2 schon direkt nach Invasion hohe Expression angenommen wird, spricht möglicherweise für eine Apicoplast-Lokalisation, da das Plastid funktionell mit dem Invasionsprozess in Verbindung gebracht wird (He *et al.*, 2001). Die vorhandenen Expressionsdaten indizieren für die PDI-Formen und Ero1p maximale Transkriptionsintensität im Schizontenstadium (Bozdech und Ginsburg, 2003). Dies stellt eine weitere Übereinstimmung zu Trx2 dar und könnte wiederum für die ER-Lokalisation oder duales Targeting sprechen.

Bei diesen Überlegungen ist zu beachten, dass starke Transkription nicht zwingend hohe Proteinmenge oder -aktivität bedeutet. Die Transkriptionslevel der TPx1, deren Bedeutung für die antioxidative Verteidigung nachgewiesen wurde (Komaki-Yasuda *et al.*, 2003), zeigen zwar einen breiten Peak; dieser korreliert interessanterweise jedoch nicht mit dem Transkriptionsmaximum des bisher angenommenen elektronenliefernden Systems (Trx1 und TrxR).

Für Hinweise auf mögliche *in vivo*-Funktionen der hier beschriebenen Trx ist in jedem Fall die Bestimmung der Redoxpotentiale interessant. Die PDI z. B. besitzt zwar auch das Trx-Motiv CXXC, katalysiert jedoch aufgrund ihres hohen Redoxpotentials (-180 mV) v. a. die Disulfid-Bildung (Jeong *et al.*, 2004).

Die fehlende (Tlp1 und 2) oder nur mäßige (Trx2 und 3) Reduktion durch PfTrxR könnte zum einen darin begründet sein, dass diese nicht der physiologische Elektronendonator ist, und es weitere, möglicherweise kompartimentierte TrxR in Pf gibt. Die Spezifität für eine Reduktase ist vom humanen System beschrieben: Während Trx1 (cytosolisch) und Trx2 (mitochondrial) gleich gut von der cytosolischen (TrxR1) und der mitochondrialen (TrxR2) TrxR-Form reduziert werden, ist das humane *Trx-related protein* TRP14 lediglich Substrat für TrxR1 (Jeong *et al.*, 2004). Es besteht auch die Möglichkeit, dass Trx2 und 3 nicht in erster Linie Thioredoxine sind, d. h. der physiologische Elektronendonator keine TrxR ist. Eine andere Erklärung für eine schlechte Reduzierbarkeit wäre eine Funktion, die keiner kontinuierlichen Regeneration bedarf.

Die für Pflanzen-Trx beschriebene funktionale Spezifität ist auch beim Säuger-Organismus zu finden. So wird TRP14 zwar durch TrxR1 reduziert, kann aber seinerseits nicht als Elektronendonator für RiboR, Prx oder MetSR dienen (Jeong *et al.*, 2004). Umgekehrt wurde beobachtet, dass TRP14 in HeLa-Zellen einen stärkeren Effekt auf die Signalkaskade zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung ausübt als Trx1 (Jeong *et al.*, 2004b). Auch die direkten Targetproteine sind unterschiedlich. Als ein Interaktionspartner von TRP14 wurde u. a. LC8 identifiziert. Dabei handelt es sich um eine *light chain* des cytoplasmatischen Dynein-Komplexes. Da LC8 sowohl mit IF- $\kappa$ B $\alpha$  als auch mit Bim, einem Mitglied der Bcl-2-Familie interagiert, kann vermutet werden, dass LC8 als Vermittler der TRP14-Wirkungen auf NF- $\kappa$ B-Aktivierung als auch Apoptose fungiert (Jeong *et al.*, 2004b).

Es ist denkbar, dass Tlp1 analog zu LC8 ein multifunktionales regulatorisches Protein darstellt, dessen Interaktionen sich nicht auf Cytoskelet-Funktionen beschränken, sondern auch allgemeine Signaltransduktionen beeinflussen.

Für die beschriebenen Trx-Proteine ist ferner selbst im Falle einer Lokalisation im gleichen Zellkompartiment davon auszugehen, dass ihre Funktionen nicht völlig redundant sind.

Für weitere Untersuchungen ist die Erforschung sowohl des physiologischen Elektronendonors als auch der Zielproteine vorzunehmen. So ist z. B. zu testen, ob PfAOP durch eines der neuen Trx effizienter reduziert wird als durch Trx1. Zunächst sind jedoch Expression und Reinigung zu optimieren.

## 4.2 PfTrxR – Genvariation und Hemmung

### 4.2.1 N-terminal veränderte TrxR-Formen

Für die humane, Mäuse- und Ratten-TrxR1 existieren verschiedene mRNA-Varianten, die sich hinsichtlich des 5'-Endes unterscheiden. Sie kommen durch alternatives Spleißen der ersten drei Exons zustande, und die entsprechenden Schnittstellen sind in den drei Organismen konserviert (Sun *et al.*, 2001b). Die Autoren vermuten darin einen generellen Mechanismus zur Herstellung verschiedener mRNA-Isoformen, der zur beobachteten Heterogenität von Säuger-Trx-Reduktasen beiträgt. Die unterschiedlichen Transkriptionsstarts werden nämlich auch auf die Proteinebene übertragen. Für die N-terminale Domäne der längsten Maus-TrxR1-Variante konnte bislang keine Homologie zu anderen Proteinen gefunden werden, und die Funktion dieser Form ist noch nicht bekannt. Generell werden die Funktionen der diversen mRNA-Formen in der Regulation der Expression und der Ermöglichung verschiedener subzellulärer Lokalisationen des Enzyms gesehen. Letzteres ist z. B. für die hTrxR3 der Fall: Auch hier existieren drei unterschiedliche mRNA-Formen, von denen eine ein mitochondriales Signalpeptid beinhaltet. Bei einer zweiten Form ist die gemeinsame Sequenz um lediglich 5 Aminosäuren verlängert; diese wird als cytosolische Variante angesehen, während der dritten Spleissvariante möglicherweise regulatorische Funktion zukommt (Sun *et al.*, 2001b). Rundlöf *et al.* fanden bei der Untersuchung verschiedener Zelltypen insgesamt 21 verschiedene hTrxR1-Transkripte, die in 5 unterschiedlichen Isoformen mit differierenden N-Termini resultieren. Eine Form beinhaltet eine Grx-Domäne (2004). Durch die Spleissvarianten wird das Targeting zu Cytoplasma, Mitochondrien und Nucleus erreicht. Dass eine alternative Spleissvariante der TrxR1 als Modulator Östrogen-abhängiger Genaktivierung eine spezielle eigene Funktion hat, wurde von Damdimopoulos *et al.* gezeigt (2004).

Das TrxR2-Gen kann ebenfalls in mitochondrialen und cytosolischen Varianten resultieren, abhängig von der Verwendung des N-terminalen Exons, das für das mitochondriale Targetsignal codiert (Rundlöf und Arnér, 2004).

Auch die mRNA der *Drosophila melanogaster*-TrxR1 existiert in zwei unterschiedlichen Formen, bei denen es sich ebenfalls um alternative Spleissprodukte handelt. Hier ist das Transkript der kürzeren in dem der längeren Variante nahezu komplett (bis auf das Start-M) enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Extension der längeren Form als mitochondriales Signalpeptid fungiert. Beide Formen sind für die Überlebensfähigkeit der Fliege essentiell (Missirlis *et al.*, 2002). Erst kürzlich wurde duales Targeting zu Cytosol und Mitochondrien für beide TrxR aus Arabidopsis (NTRA und B) gezeigt (Reichheld *et al.*, 2005). *Anopheles gambiae* besitzt 3 Isoformen der TrxR, die durch Spleissvarianten eines Gens entstehen (Bauer *et al.*, 2003).

Watanabe *et al.* berichten, die Gene von *Plasmodium* betreffend, nicht nur von einer ausgeprägt langen 5'-*untranslated region* (UTR; im Durchschnitt 346 Nukleotide), sondern auch von einer hohen Diversität der Transkriptionsstarts (2002). Beide Eigenschaften bergen wiederum erweiterte Möglichkeiten der Genexpression und -regulation. Die von Watanabe und Kollegen angestellten Untersuchungen beschränken sich auf die mRNA-Ebene – ob sich die Diversität auch auf Proteinebene findet, bleibt unklar.

Aufgrund der Kenntnisse über die Isoformen der humanen und vor allem der *Drosophila*-TrxR wurde im Rahmen dieser Arbeit die Sequenz N-terminal des bekannten PfTrxR-Gens untersucht und ein längerer orf als bisher angenommen identifiziert. Diese Extension des 5'-Endes um 228 bp konnte in der *bloodstage*-cDNA-Bank nachgewiesen werden; es erfolgten Klonierung der Sequenz und heterologe Expression der gesamten, um 76 AS verlängerten PfTrxR. Die Affinität für Trx, DTNB und NADPH der alternativen Enzymform unterscheidet sich nicht von der des herkömmlichen Enzyms.

Ursprünglich mit dem Ziel, Kristallansätze herzustellen, wurde die Sequenz der altPfTrxR ohne His-tag kloniert, exprimiert und über 2',5'-ADP-Sepharose gereinigt. Das so erhaltene Enzym besaß die Größe der herkömmlichen Enzymform, und das Fehlen der Extension wurde mittels N-terminaler Sequenzierung bestätigt.

Ob *E. coli*, der keine Signalsequenzen für die Lokalisierung in Kompartimenten kennt, die N-terminale Verlängerung ohne Schutz durch den His-tag tatsächlich nicht translatiert oder erst posttranslational abspaltet, bleibt unklar. Wie der Parasit mit dieser nachweislich existenten Transkriptisoform verfährt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse ebenfalls nicht abschliessend beantwortet werden. Sowohl das Vorkommen ungewöhnlich langer 5'-UTR's als auch mehrerer Transkriptvarianten für ein Protein sind für *Plasmodium* beschrieben (Watanabe *et al.*, 2002). In diesem Fall besteht die Möglichkeit, dass der N-terminalen Extension eine Modulationsfunktion für die Genexpression zukommt. Dennoch ist nicht auszuschliessen, dass der Parasit das verlängerte Transkript vollständig translatiert und somit eine alternative Form des PfTrxR-Proteins generiert.

#### 4.2.2 Inhibitoren der PfTrxR

Während für manche Bakterienspezies und Hefe das Trx-System entbehrlich ist, ist es für das Überleben von Pf unerlässlich. Dies wurde kürzlich mit entsprechenden TrxR-*knock outs* demonstriert (Krnajski *et al.*, 2002). Die Notwendigkeit des Enzyms dürfte sich anhand der vielfältigen Funktionsmöglichkeiten von Thioredoxin auf verschiedenen Ebenen des Parasitenstoffwechsels (DNA-Synthese, antioxidatives System, Signaltransduktion, Enzymregulation, Proteinexpression etc.) ergeben. Das Wissen um ihre Essentialität unterstreicht die Bedeutung der TrxR als *drug target*.

Derzeit in Entwicklung gegen Pf sind sogenannte *double-drugs*, bislang bestehend aus Derivaten des bekannten Antimalariamittels Chloroquin (CQ) und einem Inhibitor der Glutathionreduktase. Die Strategie dabei ist nicht nur die Addition der Einzelwirkungen – Hemmung von Hämdetoxifikation (CQ) und Glutathionregeneration - sondern ein synergistischer Effekt im Hinblick auf Chloroquin-resistente Stämme, deren Widerstandsfähigkeit u. a. auf das Glutathionsystem zurückgeht. Da auch die TrxR bzw. das



Trx-System zur GSSG-Reduktion beiträgt, ist es sinnvoll, die Inhibierung dieses Systems in die Konstruktion der *double-headed drugs* miteinzubeziehen (Biot *et al.*, 2003).

Die Anzahl der an PfTrxR getesteten Verbindungen ist noch begrenzt. Naphtazarin (NZ), Inhibitor der hTrxR, wirkt auch hier (Krauth-Siegel und Coombs, 1999). Mittlerweile konnten durch Substitution an den C-Atomen 2 und 3 noch effektivere Derivate synthetisiert werden (Dessolin *et al.*, 2001). Die IC<sub>50</sub>-Werte von NZ und seinen Abkömmlingen an der PfTrxR wurden im DTNB-Assay mit 600 nM und 0.3-6 µM bestimmt (Irmeler *et al.*, 2002); an Parasitenkulturen ergaben sich ebenfalls IC<sub>50</sub>-Werte in diesem Bereich (471 bzw. 395 nM (Biot *et al.*, 2003). Problematisch ist hier jedoch, dass das inhibitorische Potential der hTrxR gegenüber noch höher ist (IC<sub>50</sub>-Werte bis zu 5 nM).

Zu den PfTrxR-Inhibitoren gehören ferner Mannich-Basen. Es handelt sich dabei um eine relativ heterogene Gruppe von Verbindungen, die in der organischen Chemie für Michael-Additionen verwendet werden. Seit längerem werden verschiedene Mitglieder dieser Gruppe auf Aktivität gegen *Plasmodium* untersucht (Peters und Robinson, 1984; Scott *et al.*, 1987), und einige zeigten stärkere Effekte als gängige Verbindungen wie Chloroquin (Kotecka *et al.*, 1997). Von 350000 Verbindungen der Pfizer-Bibliothek zeigten 15 in einem *High-throughput-screening* mit *E. coli*-Trx an PfTrxR einen IC<sub>50</sub> < 18 µM (Smith *et al.*, 1975; Davioud-Charvet, 2003). 13 davon waren Mannich-Basen, nur sechs waren am Parasitenenzym effektiver als am humanen. Neben Unterschieden bezüglich der Reversibilität der Hemmung und der entstehenden Produkte ist den Substanzen doch gemeinsam, dass sie nur am reduzierten Enzym wirken und Angriffspunkt das C-terminale Redoxzentrum ist. Dieses wird am C540 alkyliert (nicht-zyklisches Produkt) bzw. bisalkyliert (Reaktion auch mit C535, makrozyklisches Produkt). Die alkylierten Enzyme sind inaktiv mit Trx, zeigen aber noch gewisse Aktivität mit dem niedermolekularen Substrat Methylmethanthiosulfonat (MMTS), da dieses an die *active site* gelangen und von dieser umgesetzt werden kann. (Davioud-Charvet *et al.*, 2003).

Den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Verbindungen gemeinsam ist der Benzolring und 1-3 Nitrogruppen. Darüber hinaus besitzen sie entweder einen heterozyklischen Ring oder eine Trifluoromethylgruppe -C(F)<sub>3</sub>. Die Synthese erfolgte im Labor von Dr. M. McLeish (College of Pharmacy, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA) und ist bei Andricopulo *et al.* beschrieben (in Vorbereitung). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zunächst die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte an Pf- und hTrxR; in Anwesenheit der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen (PfTrxR) wurde zudem der Einfluss auf die Glutathionreduktasen beider Organismen getestet. An der PfTrxR ergaben sich IC<sub>50</sub>-Konzentrationen zwischen 500 nM und > 100 µM. Die hTrxR wurde von allen Verbindungen deutlich weniger gehemmt, womit eine wichtige Voraussetzung für ein potentiell antimalariamittel erfüllt ist. Für die bislang getesteten Naphtazarin-Derivate war diese Voraussetzung nicht, für die Mannich-Basen nur in wenigen Fällen gegeben. Daher sind die Ergebnisse als vielversprechend zu betrachten, obwohl im Vergleich relativ hohe Konzentrationen benötigt wurden.

Für die wirksamsten Verbindungen wurde die nähere Charakterisierung der Hemmung begonnen. Drei dieser Substanzen wurden darüber hinaus an Plasmodien-Kulturen getestet.

Der K<sub>M</sub>-Wert für NADPH änderte sich durch die Substanzen 028 und 064 nicht; in Anwesenheit von 036 bzw. 049 war dagegen ein Anstieg um Faktor 5.5 bis 8.6 zu

verzeichnen. Die Affinität für Trx wurde erstaunlicherweise durch alle vier Verbindungen sogar erhöht, was auf eine unkompetitive Komponente hindeutet. Zwar bedürfen die Untersuchungen weiterer Vertiefung, es ist jedoch davon auszugehen, dass der Hemmtyp aller vier Verbindungen sich aus mehreren Komponenten zusammensetzt.

Ein gemischter Hemmtyp wurde auch für NZ und seine Derivate beobachtet. Ein anfänglicher kompetitiver Anteil, der für PfTrxR stärker ausgeprägt ist als für das humane Enzym, wird von einer irreversiblen Hemmung gefolgt (Irmeler *et al.*, 2002).

Die an Parasitenkulturen ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen leicht über den *in vitro* für PfTrxR gemessenen (10-18 µM). Zwar werden von einigen Mannich-Basen-Derivaten deutlich geringere IC<sub>50</sub>-Werte an Plasmodienkulturen berichtet (Gorlitzer *et al.*, 2004), es sind jedoch auch cytotoxische und Apoptose-induzierende Effekte beschrieben (Davioud-Charvet *et al.*, 2003). Die hier getesteten Verbindungen verdienen daher durchaus weitere Beachtung.

Die Entdeckung medizinischer Wirkstoffe war und ist auch häufig heute noch ein Kind des Zufalls. Nach dem *Try-and-error*-Prinzip und meist durch Verwendung von Pflanzenteilen entdeckt, sind einige Antimalaria-Mittel schon lange bekannt. Die Nutzung von Artemisinin, vorkommend in der chinesischen Qinghao-Pflanze (*Artemisia annua*), beispielsweise wird bereits im dritten Jahrhundert erstmals erwähnt (Ridley, 2003). Der Mechanismus der Wirkung war jedoch bis vor kurzem unklar. Ein Ansatz der Medikamentenentwicklung ist daher die Aufklärung der Wirkweise bekannter Substanzen und daraufhin die Weiterentwicklung der Verbindungen mit dem Bestreben, Nebenwirkungen oder Resistenzen zu umgehen.

Eine andere Vorgehensweise der sog. rationalen Medikamentenentwicklung beginnt mit der Suche nach einem anzugreifenden Ziel. Geeignet sind im Falle von Infektionskrankheiten grundsätzlich Stoffwechselwege, die ausschließlich im Erreger ablaufen und für diesen überlebenswichtig sind. Aber auch Enzyme, die beide, Erreger und Patient besitzen, können Angriffspunkt sein, vorausgesetzt, sie weisen deutliche Unterschiede auf.

Hilfreich für diese Verfahrensweise wiederum ist die Kenntnis der Proteinstrukturen, die anhand ihrer Kristallformen im Detail untersucht werden können.

Trotz zahlreicher Versuche war die Kristallisation der *Plasmodium*-TrxR bis jetzt noch nicht gelungen. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit dieses Ziel unter Verwendung abgewandelter Enzymformen vorangetrieben werden. Sowohl eine His-tag-freie als auch eine N-terminal verkürzte (und tag-freie) Variante der PfTrxR wurden dazu heterolog exprimiert und gereinigt.

Mit beiden Proteinen wurden zahlreiche Kristallisationsbedingungen getestet. Bislang ergaben sich keine Kristallformen, die sich zur Strukturanalyse geeignet hätten. Die Proteine stehen für weitere Tests zur Verfügung.

## **4.3 Interaktionen von Thioredoxin1 und Glutaredoxin aus Pf**

### **4.3.1 Interaktion mit Peroxiden**

Die physiologische als auch schädigende Wirkung reaktiver Sauerstoff-Spezies wurde bereits eingangs erläutert. Thioredoxin ist durch *Quenching* von Singulett-Sauerstoff und Abfangen von Hydroxylradikalen an der nicht-enzymatischen ROS-Entgiftung beteiligt (Das und Das,

2000). Für *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* ist gezeigt, dass reduziertes Trx die Widerstandsfähigkeit gegenüber  $H_2O_2$  steigern kann (Takemoto *et al.*, 1998; Garrido und Grant, 2002). Die direkte Reaktion des Proteins mit dem Peroxid wurde ebenfalls beobachtet (Mitsui *et al.*, 1992).

Die hierzu durchgeführten Versuche mit PfTrx1 zeigen eine Pufferkapazität für verschiedene Hydroperoxide, die bei lokal stark ansteigenden ROS-Konzentrationen zur Entgiftung beitragen könnte (Rahlfs *et al.*, 2003). Es ist jedoch anzumerken, dass die Intensität der Reaktion ( $k = 6.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) wesentlich geringer ist als die katalytische Effizienz, die mittels der Elektronenbelieferung der PfTPx1 durch Trx erreicht werden kann ( $3.29 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (diese Arbeit).

Die GSH-abhängige Peroxidase-Aktivität von Grx ist für Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Oryza sativa* beschrieben (Collinson *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2004). Das PfGrx kann jedoch unter den erläuterten Bedingungen keines der verwendeten Peroxide reduzieren. Das Grx aus *Populus trichocarpa* zeigt ebenfalls nachgewiesenermaßen keine GSH-abhängige Peroxidase-Aktivität mit  $H_2O_2$  (Rouhier *et al.*, 2003). Dafür beliefert dieses Grx jedoch ein Peroxiredoxin mit Elektronen (Rouhier *et al.*, 2001). Hiermit ergibt sich eine interessante Parallele zu Pf, da PfGrx sowohl über die Reduktion von AOP als auch von TPx1 zur Peroxidentgiftung beitragen kann.

### 4.3.2 Interaktion mit Dehydroascorbat

Untersucht wurde ferner die Interaktion von Trx1 und Grx mit Dehydroascorbat. Ascorbat dient als Cofaktor für verschiedene enzymatische Reaktionen und stellt als Radikalfänger einen wichtigen Bestandteil des antioxidativen Systems dar. Es entgiftet reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies selbst (May *et al.*, 1998b; Morell *et al.*, 1997) und trägt durch die Regeneration des  $\alpha$ -Tocopherylradikals als hydrophiles Molekül zum Schutz von Membranlipiden bei (May *et al.*, 1998a). Im Zusammenhang mit Pf interessant ist außerdem die Prävention der Hämoglobin-Oxidation durch Ascorbat (May *et al.*, 1998b).

Die Oxidation von Ascorbat geschieht in Übertragungsschritten von je einem Elektron. Dabei entsteht zunächst das Monodehydroascorbat-Radikal (MDHA). Dieses wird entweder reduziert, weiter oxidiert, oder es disproportioniert zu Ascorbat und Dehydroascorbat (DHA) (Mendiratta *et al.*, 1998). Die effiziente Reduktion von DHA ist nicht nur zur Aufrechterhaltung des Redoxmilieus erforderlich, sondern auch um den Verlust dieser Verbindung aus der Zelle zu verhindern: Zwar wird in kernhaltigen Zellen Ascorbat v. a. in reduzierter Form über einen hochaffinen, energieabhängigen Transporter entgegen einem Konzentrationsgradienten akkumuliert; nichtsdestotrotz trägt auch die erleichterte Diffusion von DHA über einen Glucose-Transporter zur Aufnahme in die Zelle bei: Das eindiffundierte DHA wird intrazellulär reduziert und kann die Zelle nun nicht mehr verlassen, da das Ascorbatanion ein schlechtes Substrat für den Glucose-Transporter darstellt. Intrazelluläres DHA jedoch kann über diesen Transporter verloren gehen oder aber der irreversiblen Ringöffnung zu 2,3-Diketo-1-Gulonsäure unterliegen (May *et al.*, 1998b). Für Erythrozyten als die Wirtszellen von Pf ist die Kapazität zur Regeneration von Ascorbat aus einem weiteren

Grund besonders wichtig: Sie betreiben nicht wie kernhaltige Zellen Akkumulation von Ascorbat, sondern weisen Gehalte ähnlich der Plasmakonzentration auf (Evans *et al.*, 1982).

Ein Ascorbat-Stoffwechsel in *Plasmodium falciparum* ist nicht beschrieben. Der veränderte Ascorbat-Metabolismus parasitierter Erythrozyten deutet jedoch darauf hin, dass Ascorbat für *Plasmodium* von Bedeutung ist. In *P. berghei*-infizierten Erythrozyten wurde mit steigender Parasitämie auch ein Anstieg der Ascorbatkonzentration beobachtet (Srivastava *et al.*, 2001). Neben der erhöhten Aufnahmefähigkeit von Ascorbat und DHA in die infizierten roten Blutzellen, welche auf parasit-induzierte Permeabilitäts-erhöhung der Erythrozytenmembran zurückzuführen sein könnte, sind Steigerung der Reduktionskapazität und nicht zuletzt parasitäre Ascorbat-Synthese als Erklärungsmöglichkeiten denkbar (Stocker *et al.*, 1986). Für den Parasit könnte Ascorbat u. a. bei der FPIX-Entgiftung von Bedeutung sein, da Ascorbat den GSH-abhängigen FPIX-Abbau steigert (Zou *et al.*, 2002).

Für Trypanosomen ist die Existenz eines Ascorbat-Stoffwechsels bekannt (Clark *et al.*, 1994); kürzlich wurde eine Ascorbat-abhängige Peroxidase charakterisiert (Docampo *et al.*, 1976; Wilkinson *et al.*, 2002). Da Trypanosomen weder GSH-GR-System, noch GPx und Katalase besitzen, wurde ein Ascorbat-abhängiger Zyklus zur Entgiftung reaktiver Sauerstoff-Spezies postuliert (Clark *et al.*, 1994). Die Existenz einer spezifischen DHA-Reduktase wird für diesen Organismus in Frage gestellt und stattdessen der nicht-enzymatischen Regeneration durch Trypanothion, dem wichtigsten niedermolekularen Thiol in Trypanosomen eine bedeutende Rolle zugemessen, da diese Verbindung sehr viel schneller mit DHA reagiert als GSH (Krauth-Siegel und Lüdemann, 1996).

Die Reduktion von DHA zu Ascorbat geschieht im Säugerorganismus v. a. GSH-abhängig, zum einen durch die chemische Reaktion (Winkler *et al.*, 1994), zum anderen enzymatisch katalysiert durch verschiedene thiolhaltige Proteine, u. a. Glutaredoxin und Protein-disulfid-isomerase (Xu *et al.*, 1996). Es sind auch NADH- (Xu und Wells, 1996) und NADPH-abhängige Enzyme mit DHA-Reduktase-Aktivität bekannt, darunter 3<sup>α</sup>-Hydroxysteroid-dehydrogenase (Del Bello *et al.*, 1994) und Säuger-TrxR (May *et al.*, 1997). Für die TrxR ist diese Aktivität aufgrund ihres breiten Substrat-Spektrums nicht allzu verwunderlich, zumal zu diesem Spektrum auch Alloxan gehört (Holmgren und Lyckeberg, 1980), eine Verbindung, die Ascorbat strukturell recht ähnlich ist.

Für Erythrozyten sind zwei GSH-abhängige Proteine mit DHA-Reduktase-Aktivität beschrieben (Xu *et al.*, 1996; Mieyal *et al.*, 1991), eines davon ist ein Glutaredoxin. Auch Säuger-Grx anderer Gewebe reduzieren DHA. Dabei bewegen sich die  $K_M$ -Werte für DHA zwischen 0.2 und 2.2 mM, womit die Affinität im Bereich anderer, unspezifischer DHA-Reduktasen liegt (PDI boviner Leber:  $K_M = 1$  mM, Wells *et al.*, 1990). Wells *et al.* vermuten dennoch in der DHA-Reduktion eine Hauptfunktion von Grx und halten auch eine Rolle bei der Tocopherol-Reduktion über diese Reaktion für möglich (1990).

Die hier ermittelten Daten zeigen, dass auch PfGrx zur Reduktion von DHA in der Lage ist. Die Reaktion konnte sowohl im gekoppelten NADPH-abhängigen Assay bei 340 nm als auch direkt über die Ascorbat-Bildung (265 nm) detektiert werden. Die Reaktion  $\text{GSH} \leftrightarrow \text{DHA}$  wurde stets berücksichtigt. Der  $K_M$  (150.5  $\mu\text{M}$ ) liegt im unteren Bereich der Literaturwerte (Wells *et al.*, 1990); die Aktivität (3.28 U/mg,  $k_{\text{cat}} = 45.33 \text{ min}^{-1}$ ) ist etwas geringer als für die Säuger-Thioltransferasen beschrieben (140-374  $\text{min}^{-1}$ , Xu *et al.*, 1996).

Unter Annahme einer bimolekularen, chemischen Reaktion wäre  $k_2$  mit  $919.3 \pm 83.05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  zu beziffern. Diese Konstante liegt in der Größenordnung, die für Trypanothion mit DHA gemessen wurde ( $1300 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Krauth-Siegel und Lüdemann, 1996).

Neben der GSH-abhängigen ist auch die NADPH-abhängige DHA-Reduktase-Aktivität für intakte Erythrozyten nachgewiesen. Aufgrund der Hemmung durch relativ geringe Konzentrationen Aurothioglucose (einem Inhibitor von Selenoenzymen, der in niedrigen Konzentrationen die GPx kaum beeinflusst) konnte diese der TrxR zugeschrieben werden. Während die GSH-abhängige, Protein-vermittelte Ascorbatregeneration nur die DHA-Reduktion beinhaltet, bei der das MDHA-Radikal umgangen wird, kann Säuger-TrxR darüber hinaus auch die MDHA-Reduktion katalysieren. Die Affinität für das Radikal ist deutlich höher ( $2.8 \mu\text{M}$  in Anwesenheit von Trx, May *et al.*, 1998b) als für DHA ( $1.5 \text{ mM}$ ; May *et al.*, 1997). Was die relative Bedeutung von DHA- und MDHA-Reduktion betrifft, sind für Erythrozyten keine expliziten Daten zu finden; allgemein wird jedoch aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der Reduktase-Aktivitäten angenommen, dass die Umsetzung des MDHA-Radikals unter normalen Bedingungen den wichtigsten Regenerationsweg darstellt und die Reduktion von DHA bei oxidativem Stress an Bedeutung gewinnt (May *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass PfTrxR keine DHA-Reduktase-Aktivität besitzt, was die Bedeutung des Selenocysteinrestes in der *active site* des Säugerenzym unterstreicht. Ob auch MDHA nicht umgesetzt wird, bleibt zu testen.

Die Chloroplastenproteine Thioredoxin *f* und Thioredoxin *m* besitzen unspezifische DHA-Reduktase-Aktivität ( $K_M$ -Werte im millimolaren Bereich; Morell *et al.*, 1997). Die Aktivität der Säuger-TrxR ist als durch Trx steigerbar beschrieben (May *et al.*, 1997).

Tatsächlich ist in Anwesenheit von PfTrx1 die Umsetzung von DHA möglich. Unter Annahme einer bimolekularen, nicht-enzymatischen Reaktion wurde die Reaktionskonstante mit  $58.5 \pm 5.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ermittelt. Die Parameter einer entsprechenden enzymatischen Umsetzung ( $K_M = 1.3 \text{ mM}$ ,  $V_{\max} = 0.5 \pm 0.04 \text{ U/mg}$ ;  $k_{\text{cat}} = 6.91 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$ ) sind bezüglich der Affinität vergleichbar mit den Werten für das Säuger-Trx-System ( $K_M$  der TrxR =  $2.5 \text{ mM}$  bzw.  $0.7 \text{ mM}$  in Anwesenheit von Säuger-Trx); die Aktivität ist jedoch deutlich geringer ( $k_{\text{cat}}$  von TrxR alleine  $75\text{-}90 \text{ min}^{-1}$ ; mit *E. coli*-Trx  $201 \text{ min}^{-1}$ ; May *et al.*, 1997). Aufgrund der Erkenntnis, dass auch reduziertes Trx selbst zur Interaktion mit DHA in der Lage ist (Morell *et al.*, 1997; diese Arbeit), ist fraglich, inwieweit für Ratten-TrxR die beschriebene Senkung des  $K_M$  an der TrxR durch Trx (May *et al.*, 1997) korrekt ist. Präziser scheint es, einen gesonderten Parameter für die Reaktion  $\text{DHA} \leftrightarrow \text{Trx}$  einzubeziehen. Aufgrund der hohen Affinität der Reduktase für Trx ist anzunehmen, dass in Anwesenheit von Trx nur ein geringer Teil des DHA von der Säuger-TrxR direkt reduziert wird und der Hauptanteil in einer Reaktion mit Trx umgesetzt wird. Die Art dieser Umsetzung (nicht-/enzymatisch) ist nicht klar. In Anbetracht der hier beobachteten Sättigungskinetik wird eine enzymatische Reaktion in Betracht gezogen.

Ob die Reaktion physiologisch von Bedeutung ist, kann aufgrund des fehlenden Wissens über den Ascorbatstoffwechsel in *Plasmodium* nicht beantwortet werden; jedoch liegt die Vermutung nahe, dass ein solch ausgeklügelter Organismus sich auch das für die Wirtszelle so wichtige Antioxidans zunutze machen kann. Es wäre für die Zukunft interessant, der Frage

nachzugehen, ob auch Grx und Trx bereits das Monodehydroascorbatradikal umsetzen können und ob das mit höherer Intensität geschieht.

### 4.3.3 Interaktion mit Liponsäure/-amid

Liponsäure ist in Form von Liponamid Bestandteil der Transacetylase-Komponente (E2) des Pyruvat- und des  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes. Es übernimmt darin die vom Substrat zunächst auf die Decarboxylase-Komponente (E1) übertragenen Elektronen und gibt sie an E3, die Dehydrogenase-Komponente weiter, die schließlich NADH generiert.

Der Lipoyl-Lysin-Teil des Enzyms wird aufgrund seiner Geometrie auch als *swinging arm* bezeichnet und kann relativ große Distanzen – wie über 200 Å zwischen E1 und E3 – überbrücken. Dieser Schwung stellt eine Gelegenheit dar, die Elektronen von dem Arm abzugreifen und anderen mitochondrialen oder zellulären Prozessen zur Verfügung zu stellen (Porras *et al.*, 2002). Auch freie Liponsäure kommt physiologisch vor (Gehalte im Plasma 1-25 ng/ml; Dihydrolipoat 33-145 ng/ml (Arnér *et al.*, 1996) und ist in seiner Dithiolform (DHLA) ein starkes Reduktans. Empfänger der Elektronen können z. B. DHA oder das MDHA-Radikal sein. Neben der NADH-abhängigen Regeneration von DHLA durch die Liponamiddehydrogenase wiesen Arnér *et al.* eine Reduktion von Liponsäure (LA)/Liponamid (LAM) durch verschiedene Säuger-TrxR nach (1996). Beide Substrate wurden gleich effizient umgesetzt, und in Bezug auf LA zeigte sich die TrxR als deutlich aktiver als die LipDH. Die  $K_M$ -Werte lagen je nach Substrat und Enzym zwischen 0.49 und 1 mM. Damit ist die Affinität zwar wesentlich geringer als für das physiologische Substrat Trx, die  $k_{cat}$ -Werte sind jedoch nicht ganz so unterschiedlich (503-1296  $\text{min}^{-1}$  vs. 3000-4200  $\text{min}^{-1}$ ). Dass die TrxR die Reaktion bevorzugt in Richtung Reduktion von LA/LAM katalysiert, während die Lip-DH eine Präferenz für die NAD-Reduktion auf Kosten von DHLA/DHLAM zeigt, führte die Autoren zu der Vermutung einer physiologischen Relevanz dieser TrxR-Reaktion (Arnér *et al.*, 1996). Eine potentielle *in vivo*-Bedeutung der LA-/LAM-Reduktion durch TrxR ergibt sich aus der Beobachtung, dass Zellen, die keine LipDH besitzen, wie Erythrozyten, dennoch LA reduzieren können, und zwar über einen NADPH-abhängigen Mechanismus (Jones *et al.*, 2002). Aber auch für andere Zellen kommt die TrxR-katalysierte Reaktion *in vivo* im Cytosol in Betracht, da die  $\alpha$ -Ketosäure-DH-Komplexe vorwiegend mitochondrial (/plastidisch) lokalisiert sind. Constantinescu *et al.* zeigten, dass humane Erythrozyten bei Inkubation mit Glucose und LA letzteres aufzunehmen, es zu reduzieren und wieder abzugeben vermögen (1995). Diese Reduktion, die sich als NADPH-abhängig erwies, stellt eine Möglichkeit zur Regeneration von Plasma-LA dar und unterstreicht die mögliche Bedeutung von exogen zugeführtem Lipoat für den Schutz von Membranlipiden und Lipoproteinen.

Die TrxR aus *E. coli*, die sich nicht nur durch das Fehlen des Selens, sondern auch durch AS-Sequenz und Struktur deutlich von den Säuger-Enzymen unterscheidet, weist keine LA-/LAM-Reduktase-Aktivität auf.

Unter den hier angewandten Bedingungen war die PfTrxR sowohl mit LA als auch mit LAM aktiv. Die Reaktion ist demnach nicht so eng an Selenocystein gebunden wie die Reduktion von DHA. Die spezifische Aktivität mit LA liegt um 80 mU/mg; mit LAM konnte bis

2500  $\mu\text{M}$  keine Sättigung erreicht werden; die Aktivität betrug damit 272 mU/mg. Die höhere Affinität für LA drückt sich in einem  $K_M$  von etwa 1 mM aus, während der  $K_M$  für LAM deutlich über 10 mM liegt. Die LA/LAM-Reduktase-Aktivität der PfTrxR ist damit zwar bei weitem nicht so stark wie die der Säuger-Homologe ( $k_{\text{cat}}$  zwischen 500 und 1300  $\text{min}^{-1}$  gegenüber etwa 5-10  $\text{min}^{-1}$  (mit LA), jedoch vorhanden.

Die Reduktion von Thioredoxin durch freies DHLA/DHLAM ist seit längerem bekannt (Holmgren, 1979). Das in den Komplexen Pyruvat-DH, vor allem aber Ketoglutarat-DH gebundene Lipoat kann in einer parakatalytischen Reaktion ebenfalls mit Trx interagieren (Bunik, 2003). Dadurch könnte der Enzymkomplex, der über die Inaktivierung durch NADH eine Art Redoxsensor darstellt, überschüssige Elektronen aus dem Energiestoffwechsel abzweigen und für Trx-abhängige Prozesse zur Verfügung stellen. Letztere wären damit nicht mehr nur in Anwesenheit von NADPH möglich. Dazu passt auch die Entdeckung der Elektronentransferkette Ketoglutarat-DH-Komplex  $\rightarrow$  *Trx-like protein* (AhpD)  $\rightarrow$  AhpC in *Mycobacterium tuberculosis* (Bryk *et al.*, 2002). Trx verhindert damit ferner die Inaktivierung des Komplexes. Über Trx erhalten Lipoat und der Enzymkomplex sogar eine Funktion bei redoxabhängigen Regulationen, z. B. von Transkriptionsfaktoren (Bunik, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch PfTrx1 zur Interaktion mit LA und auch mit LAM in der Lage ist. Zwar wurde hier auf die Reduktion von LA/LAM durch Trx fokussiert, die Möglichkeit der umgekehrten Reaktion besteht damit jedoch ebenfalls. Die Wechselzahlen der Reaktion zweiter Ordnung berechneten sich zu  $185.8 \pm 19.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (LA) bzw.  $392.3 \pm 43.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (LAM). Aufgrund der beobachteten Sättigungskinetik ist auch die Betrachtung der Reaktion als enzymatische Umsetzung denkbar (LA:  $K_M = 1.56 \text{ mM}$ ,  $V_{\text{max}} = 1.78 \text{ U/mg}$ ,  $k_{\text{cat}} = 23.33 \text{ min}^{-1}$ . LAM:  $K_M = 1.2 \text{ mM}$ ,  $V_{\text{max}} = 2.7 \text{ U/mg}$ ,  $k_{\text{cat}} = 35.99 \text{ min}^{-1}$ ). Die Existenz eines Pyruvat-DH-Komplexes im Apicoplast und zwei weiterer  $\alpha$ -Ketosäure-DH-Komplexe in den Mitochondrien wurde kürzlich gezeigt (Foth *et al.*, 2005; McMillan *et al.*, 2005). Die E2-Untereinheit der PDH zeigt starke Aktivität *in vitro* (Foth *et al.*, 2005). Die oben dargestellte Hypothese bezüglich physiologischer Funktionen der beobachteten Reaktion kann daher auf Pf ausgedehnt werden. Interessant wäre für weitere Arbeiten ferner die Untersuchung einer Trx-Reduktion durch LipDH, da dieses Enzym zur selben Familie gehört wie TrxR.

Bei einer *in vivo*-Reduktion von Lipoat/Liponamid durch TrxR wäre eine Verstärkung der Reaktion durch Trx, analog zur Situation mit DHA, nicht abwegig. Dass auch diese Richtung des Elektronenflusses in Pf möglich ist, wird unterstützt von der Beobachtung einer Inaktivierung der *Trypanosoma cruzi*-LipDH durch ROS und die Prävention durch verschiedene Thiolverbindungen (Gutierrez-Correa *et al.*, 2000).

Die Effizienz der Reaktion  $\text{Trx1} \leftrightarrow \text{LAM}$  ist zwar nicht bemerkenswert hoch, allerdings ist Trx1 vermutlich im Cytosol lokalisiert. Aufgrund der in dieser Arbeit dargelegten Existenz mehrerer Trx-Proteine in Pf ist auch die Präsenz eines mitochondrialen Exemplars vorstellbar. An anderer Stelle ist die besondere Sensitivität mitochondrialer Trx für die Interaktion mit Ketoglutarat-DH beschrieben (Bunik, 2003).

Die LA/LAM-Reduktase-Aktivität der GR ist verglichen mit der GSSG-Reduktion sehr schwach (Constantinescu *et al.*, 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die Reduktion von LA/LAM durch das GSH-Grx-System detektiert werden. Da die Ergebnisse

auf eine enzymatische Umsetzung hindeuten, werden hier entsprechende Parameter vorgestellt (LA:  $K_M = 362 \mu\text{M}$ ;  $V_{\text{max}} = 0.7\text{-}1.6 \text{ U/mg}$ ;  $k_{\text{cat}} = 10.32\text{-}22.8 \text{ min}^{-1}$ . LAM:  $K_M = 342 \mu\text{M}$ ;  $V_{\text{max}} = 0.7\text{-}1.9 \text{ U/mg}$ ;  $k_{\text{cat}} = 9.48\text{-}26.28 \text{ min}^{-1}$ ). Die Inkubation mit DHLA kann bei Lysaten humaner Endothelzellen die Fähigkeit zur DHA-Reduktion steigern (Jones *et al.*, 2002). Möglicherweise kann Grx die Reaktion zwischen DHLA und DHA, die verschiedentlich gezeigt wurde (Kagan *et al.*, 1992; Krauth-Siegel und Lüdemann, 1996), erhöhen.

Ebenso denkbar ist die Reduktion von GSSG als Ende der Reaktionskette. Porras *et al.* stellten in Anwesenheit von Hefe-Grx2 eine vierfach gesteigerte DHLA-abhängige GSSG-Reduktion fest (2002). Für verschiedene Grx-Proteine wurden Aktivitäten von 5-135 U/mg gemessen. Der Elektronentransfer  $\text{LAM} \rightarrow \text{Grx} \rightarrow \text{GSSG}$  wurde hier auch für PfGrx bestätigt; die Bestimmung kinetischer Parameter hat noch zu erfolgen. Für die Mitochondrien schlagen Porras *et al.* ein Szenario vor, bei dem der *swinging arm* der Dehydrogenase-Komplexe durch seine Beweglichkeit auch zur Reduktion von Grx fähig ist. Damit wäre die GSH-Regeneration NADPH-unabhängig möglich. Im Cytosol dagegen könnte auch die TrxR über Liponsäure die Elektronen für Grx liefern und v. a. in Organismen ohne GR die GSSG-Reduktion gewährleisten (Porras *et al.*, 2002). Die Existenz eines TrxR-Grx-Fusionsproteins in der Maus (Sun *et al.*, 2001) unterstützt diese Hypothese.

## 4.4 PfAOP (*antioxidant protein*) – ein TypV-Prx

### 4.4.1 Identifizierung der reifen Proteinsequenz; Reduktionszustand

Das in dieser Arbeit charakterisierte AOP ist als *antioxidant protein* in der Datenbank annotiert. Verfügbare Transkriptionsdaten indizieren die Expression des Gens während des Erythrozytenstadiums mit einem Maximum im Trophozoit. Aufgrund unterschiedlicher Vorschläge der verschiedenen Gen-Vorhersageprogramme wurde zunächst die in dem Stamm 3D7 tatsächlich transkribierte Sequenz ermittelt. Für dieses 723 bp umfassende Fragment, das als solches zwar kloniert wurde, sich jedoch unter den getesteten Bedingungen nicht heterolog überexprimieren ließ, wird von entsprechenden Programmen sowohl eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Präsenz eines N-terminalen Signalpeptides errechnet als auch für eine Apicoplasten-Lokalisation des Proteins. Während das um die Signalsequenz (24 AS) verkürzte, exprimierbare Protein (AOPoS) noch keine Aktivität als Peroxidase zeigte, ließ sich mit der um weitere 35 AS, entsprechend eines Apicoplast-Transitpeptides, verkleinerten Variante (AOPsk) unter verschiedenen Bedingungen die Entgiftung von Hydroperoxiden zeigen. Diese Proteinform wurde für alle folgenden Untersuchungen als die des reifen Proteins angenommen, wenn auch das Ausmaß der zweiten Verkürzung lediglich aufgrund eines Alignments (Abb. A5) gewählt wurde.

Bei der Bestimmung der pro Molekül vorhandenen SH-Gruppen hatten sich mit AOPoS unter partiell denaturierenden Bedingungen 0.5 SH-Äquivalente nachweisen lassen; nativ waren keine SH-Gruppen messbar. Die unvollständige Reduktion bzw. schlechte Zugänglichkeit des reduzierten Cysteinrestes könnten die mangelnde Peroxidase-Aktivität erklären und für eine weitere Prozessierung des Proteins sprechen.

Das nochmals verkürzte Protein (AOPsk) liegt dagegen nach standardmäßiger, heterologer Expression und Aufreinigung (d. h. ohne Verwendung eines Reduktionsmittels) vollständig



reduziert vor. Zwar ist im nativen Zustand auch in AOPsk nur eine SH-Gruppe zugänglich (0.8 SH-Äquivalente pro Molekül), denaturierende Bedingungen (6 M GuHCl) zeigten jedoch die Reduktion beider Cysteinreste (1.7 SH-Äquivalente pro Enzymmolekül).

Diese ungewöhnliche Eigenschaft wurde bislang lediglich für das GrxPx aus *Populus trichocarpa* und das Prx-Grx-Hybrid aus *Neisseria meningitidis* (NmPrxGrx) beobachtet (Rouhier *et al.*, 2001; Rouhier und Jacquot, 2003). Im Unterschied zu PfAOP war bei dem Pappel-Prx die komplette Reduktion bereits im nativen Zustand feststellbar (Rouhier *et al.*, 2001).

Bei dem allgemein akzeptierten Reaktionsmechanismus eines Prx ist das peroxidative Cystein ( $C_P$ ) in der reduzierten Konformation zugänglich, das *resolving cysteine* ( $C_R$ ) von 2-Cys-Proteinen jedoch abgeschirmt. Durch Oxidation des  $C_P$  ändert sich die Konformation zur Exposition des  $C_R$  (Hofmann *et al.*, 2002). Letztlich sollten von einem nativen reduzierten 2-Cys-Prx daher letztlich 2 Elektronen übertragbar sein. Die Zugänglichkeit nur eines Cysteins im nativen AOPsk ließen vermuten, dass es sich um ein 1-Cys-Prx handelt, was durch die Kristallstrukturdaten bestätigt wird (s. u.).

Interessant ist ferner, dass die Oxidation des Enzyms in der DTNB-Titration sowohl mit tBOOH als auch mit Wasserstoffperoxid erreicht wurde, obwohl sich  $H_2O_2$  in Kinetik-Messungen nicht gut als Substrat eignet. Neben der relativ langen Inkubationszeit (mind. 25 min insgesamt) könnte eine weitere Erklärungsmöglichkeit die sein, dass bei der Titration nur eine einmalige Umsetzung gemessen wird, die anscheinend durchaus mit  $H_2O_2$  möglich ist, hingegen für die Kinetik die mehrmalige Umsetzung erfasst wird. Letztere könnte durch eine starke Inaktivierung des Enzyms durch  $H_2O_2$  verhindert werden.

## 4.4.2 Peroxidase-Aktivität und Substratspezifität

### 4.4.2.1 Reduzierende Substrate; kinetischer Vergleich mit verwandten Proteinen

Die in den Titrationsversuchen bereits angedeutete Peroxidase-Aktivität von PfAOP ließ sich anhand verschiedener Assays bestätigen. So erwies sich PfTrx 1 als geeigneter Elektronendonator für PfAOP; es handelt sich bei diesem Protein damit um die vierte Thioredoxinperoxidase von *Plasmodium falciparum*. Erstaunlicherweise ist die Affinität von AOPsk für Trx genauso hoch wie die der TPx1 (4  $\mu$ M; Rahlfs und Becker, 2001) oder sogar höher (13-19  $\mu$ M, Akerman und Müller, 2003; 22.5  $\mu$ M, diese Arbeit). Jedoch ist die spezifische Aktivität der TPx1 (1.91 U/mg in dieser Arbeit, 3.1 U/mg bei Rahlfs und Becker, 2001) deutlich größer als die von AOPsk (0.06 U/mg).

Bislang sind nur wenige Peroxiredoxine identifiziert, die Grx als Elektronendonator akzeptieren. Die vorliegende Literatur weist neben dem Pappel-Prx lediglich je ein Protein aus den Organismen *Haemophilus influenzae* (PGdx), *Neisseria meningitidis* (NmPrxGrx), *Chromatium gracile* und *Arabidopsis thaliana* (PRXII-B) als solche aus (Pauwels *et al.*, 2003; Rouhier und Jacquot, 2003; Vergauwen *et al.*, 2001; Bréhélin *et al.*, 2003). Die bakteriellen Enzyme stellen Fusionsproteine aus dem Prx und einer C-terminalen Grx-Domäne dar (Pauwels *et al.*, 2003). Auch andere Prokaryoten wie *Vibrio cholerae* und *Yersinia pestis* scheinen laut Sequenzanalyse ein solches Hybrid zu besitzen (Rouhier und Jacquot, 2003).

Während Pappel-Prx und auch die Prx-Domäne des NmPrxGrx sowohl mit Trx als auch mit Grx arbeiten können, konnte für das HiPGdx und AtPRXII-B keine Trx-abhängige Peroxidase-Aktivität gezeigt werden (Pauwels *et al.*, 2003; Bréhélin *et al.*, 2003). Im Falle des Hi-Enzyms wurde allerdings das komplette Hybrid verwendet, und das At-Prx wurde nur mit Trxh2 getestet. Trx-abhängige Aktivität der Prx-Domäne (Hi) bzw. mit einem der anderen 8 cytosolischen Trx (At) kann noch nicht ausgeschlossen werden.

Die aufgeführten Proteine umfassen 160-165 AS (bei Fusionsproteinen Prx-Domäne gerechnet) und besitzen zwei konservierte Cysteine (Position 49-51 und 75-76). Zusammen mit der Grx-abhängigen Aktivität dienen diese Charakteristika einer Einordnung als Typ C-Prx (Rouhier *et al.*, 2001; später Typ II-Prx; Rouhier und Jacquot, 2003). Ausgehend von der Sequenzhomologie gehören genannte Proteine ferner zur Klasse der Typ V-Prx (Hofmann *et al.*, 2002). Während das humane PrxV, das mit Grx nicht aktiv ist (Seo *et al.*, 2000) zusätzlich zu C48 und C73 ein weiteres Cystein (C152) beinhaltet und mechanistisch ein 2-Cys-Prx darstellt, scheinen die Grx-abhängigen Prx einem 1-Cys-Mechanismus zu folgen. PfaOPsk (C59 und C85) zeigt deutliche Ähnlichkeit zu den beschriebenen Proteinen (Abb. A5).

Da der Abstand zwischen den Cysteinresten in allen Proteinen in etwa derselbe ist (25 bzw. 26 AS), könnte man spekulieren, dass die hier gewählte Sequenz von AOPsk noch ~8 AS zu lang ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass auch AOPsk Grx als Elektronendonator akzeptiert. Für beide Donorsubstrate wird, wie für das AOP-Gen, die Expression während des Blutstadiums mit einem Transkriptionsmaximum im Trophozoit angenommen. Die Affinität von PfaOP zu PfTrx1 bzw. PfGrx ist ähnlich, wie die  $K_M$ -Werte (4  $\mu$ M bzw. 2.5  $\mu$ M) verdeutlichen. Die spezifische Aktivität, gemessen unter sättigenden Donor-Konzentrationen, ist jedoch mit Trx deutlich geringer (0.06 U/mg) als mit Grx (0.32 U/mg).

Die Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität von der Grx- bzw. Trx-Konzentration wird in der Form, wie sie hier untersucht wurde, nur für das Pappel-Enzym beschrieben. Die  $K_M$ -Werte (Rouhier *et al.*, 2002) sind mit 3  $\mu$ M (Trx) bzw. 2.5  $\mu$ M (Grx) denen von PfaOP sehr ähnlich. Die Affinität für Trx ist ferner vergleichbar mit der des humanen Prx V ( $K_M = 1 \mu$ M; Seo *et al.*, 2000).

Die Grx-abhängige Aktivität des PfaOP ist um Faktor 5.3 stärker als die mit Trx; exakt derselbe Faktor ergibt sich für die entsprechenden PtGrxPx-Aktivitäten. Insgesamt zeigt das Pappel-Enzym jedoch deutlich höhere Aktivitäten als das plasmodiale Enzym: Die spezifischen Aktivitäten betragen 8 U/mg mit Grx bzw. 1.5 U/mg mit Trx (Rouhier *et al.*, 2002). Die maximale Aktivität des hPrx V wurde bei 37°C mit 2-2.8 U/mg bestimmt (Seo *et al.*, 2000) und liegt damit ebenfalls deutlich höher als die des Pf-Enzyms. Zu den Werten des PtGrxPx ist anzumerken, dass diese mit optimierten Proteinen erreicht wurden: Das eingesetzte Grx war C-terminal verlängert worden, was in einer erhöhten Stabilität und Aktivität resultierte; für GrxPx erwies sich die Reinigung in Anwesenheit von  $\beta$ -ME als günstig, da das Protein vor irreversibler Oxidation geschützt wurde. Tests auf einen ähnlichen Effekt mit PfaOP sind noch durchzuführen. Mit dem herkömmlich gereinigten Pt-Protein waren unter Trx-Sättigung (16  $\mu$ M) etwa 0.3 U/mg erreicht worden (basierend auf dem errechneten  $M_w = 17.408$  kDa).

Darüber hinaus ist die etwas differierende Größe zu berücksichtigen. Der  $k_{\text{cat}}$  des PfAOP wurde mit  $7.4 \text{ min}^{-1}$  (Grx) bzw.  $1.3 \text{ min}^{-1}$  (Trx) ermittelt. Für das etwas kleinere Pt-Enzym ergibt sich pro Molekül eine Umsetzungsrate von  $\sim 140 \text{ min}^{-1}$  (optimiertes Grx, reduzierende Reinigung).

pH-Profile sind für die genannten, dem PfAOP homologen Prx nicht gegeben. Das hier ermittelte pH-abhängige Verhalten von PfAOP zeigte sich überraschenderweise als abhängig vom Elektronendonator. Abgesehen von einer vergleichbaren Aktivität im physiologischen Bereich (pH 7.2-7.6) wurden unter saureren Bedingungen mit dem Trx-System, im basischeren Milieu dagegen mit dem Grx-System die höheren Umsetzungsraten gemessen. Eine Verfälschung durch pH-Optima der backup-Reduktasen ist unwahrscheinlich, da gerade PfGR standardmäßig bei pH 6.9 getestet wird, während für PfTrxR für gewöhnlich pH 7.4 verwendet wird.

#### 4.4.2.2 Oxidierende Substrate

Hinsichtlich der üblicherweise verwendeten Peroxidsubstrate zeigt AOP Präferenz für tBOOH. Wesentlich schlechter werden  $\text{H}_2\text{O}_2$  und CuOOH umgesetzt (0.02 bzw. 0.01 U/mg). Die Vorliebe für tBOOH und die geringe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entgiftung unterscheiden PfAOPsk vom Pappel-Homolog: Letzteres zeigt mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  tendenziell den stärksten Umsatz; die Differenzen bezüglich der drei Substrate sind jedoch gering (Rouhier *et al.*, 2001). Das *Haemophilus*-Hybridprotein reduziert  $\text{H}_2\text{O}_2$  ebenfalls mit höherer Effizienz als tBOOH (Pauwels *et al.*, 2003). Für hPrx V ist nur die Verwendung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beschrieben – der  $K_M$  liegt  $< 20 \mu\text{M}$  (Seo *et al.*, 2000).

Aus der Literatur sind einige Prx bekannt, die Phosphatidylcholin- oder Linolsäurehydroperoxid reduzieren können, so z. B. die Tryparedoxinperoxidasen aus *Trypanosoma brucei* (Flohé *et al.*, 2002a), *Leishmania donovani* (Flohé *et al.*, 2002b) und *Crithidia fasciculata* (Nogoceke *et al.*, 1997). Kürzlich wurden für verschiedene Bakterien-Spezies sogenannte *ohr*-Gene (*organic hydroperoxide resistance*) beschrieben, deren Deletion die Zellen sensitiv gegenüber organischen Hydroperoxiden, nicht jedoch gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  machte (Mongkolsuk *et al.*, 1998). Eine Präferenz für Linoylhydroperoxid gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  und tBOOH hat außerdem das *E. coli*-BCP (Jeong *et al.*, 2000). Erst kürzlich wurde die Umsetzung von PCOOH für PtGrxPx gezeigt (Rouhier *et al.*, 2005). Anhand der beobachteten Sättigung bei  $50 \mu\text{M}$  wird auf einen  $K_M$  von  $\sim 23 \mu\text{M}$  geschlossen. Der  $k_{\text{cat}}$  liegt für das Lipidperoxid ( $2.1 \text{ s}^{-1}$ ) zwischen dem für  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2.6 \text{ s}^{-1}$ ) und tBOOH ( $1.5 \text{ s}^{-1}$ ). AOPsk setzt PCOOH nahezu ebenso gut um wie tBOOH (0.18 U/mg mit PCOOH ggü. 0.25 U/mg mit tBOOH im direkten Vergleich). Die Affinitäten für die beiden Substrate stimmen in etwa überein ( $\frac{1}{2} V_{\text{max}}$  mit  $\sim 25 \mu\text{M}$ ) und sind vergleichbar mit dem Wert des PtGrxPx.

PfTPx1 zeigt, ohne eine Sättigung zu erreichen, mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die größte Aktivität. tBOOH und erst recht CuOOH werden deutlich schlechter, PCOOH gar nicht umgesetzt (Rahlfis und Becker, 2001). Die Affinität für Peroxide ist jedoch bei TPx1 stärker: In einer jüngeren Studie wurde mittels schneller Kinetik der  $K_M$  für  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit  $0.25\text{-}0.8 \mu\text{M}$  bestimmt (Akerman und Müller, 2003). Das Pf 1-Cys-Prx ist lediglich mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktiv, nicht mit Alkylhydroperoxiden (Krnajski *et al.*, 2001). Die TPx<sub>GI</sub>, die in ihrer AS-Sequenz der Phospholipid-Hydroperoxid-

Peroxidase (PHGPx, GPx-4) von Säugern ähnelt, setzt, wie die PHGPx, CuOOH besser um als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und tBOOH. Wider Erwarten ist sie jedoch mit PCOOH überhaupt nicht aktiv (Sztajer *et al.*, 2001). Somit ist AOPsk bislang das einzige bekannte plasmodiale Prx, das in der Lage ist, Lipidhydroperoxide zu entgiften. Da Lipidhydroperoxide sehr unterschiedliche Verbindungen umfassen, bleibt zu testen, ob andere Substanzen dieser Gruppe noch bessere Substrate darstellen (Rouhier *et al.*, 2005).

Für viele Prx ist das Abweichen von einer Sättigungskinetik beschrieben (z. B. Nogoceke *et al.*, 1997). Mit der TPx<sub>GI</sub> aus *Plasmodium* wurde beobachtet, dass die Kinetik je nach Elektronendonator unterschiedlich ist: Während mit GSH nicht der Fall, folgt die TPx<sub>GI</sub>-Aktivität mit Trx-backup der Michaelis-Menten-Kinetik. In beiden Systemen verläuft die Reaktion nach einem Ping-Pong-Mechanismus, und die kinetischen Parameter bezüglich der Reaktion mit dem Peroxid sind daher unabhängig vom Reduktionssystem. Die Komplexbildung zwischen Enzym und Trx erfolgt jedoch anscheinend schneller als der Zerfall dieses Komplexes, so dass sich das Prx mit diesem Elektronendonator absättigen lässt und ein K<sub>M</sub> messbar wird (Sztajer *et al.*, 2001). Für einige andere Prx wird Sättigungskinetik beschrieben (*E. coli* TPx; Baker und Poole, 2003; *S. cerevisiae* Typ II-Prx, Jeong *et al.*, 1999; ScBCP, Jeong *et al.*, 2000). Neben den oben erwähnten Daten für Pappel-GrxPx mit PCOOH folgt das Hi-Hybridprotein mit tBOOH als Substrat annähernd einer Sättigungskinetik (Pauwels *et al.*, 2003; Halbsättigung ~ 130 µM); mit NmPrxGrx und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat wurde keine Sättigung erreicht (Rouhier und Jacquot, 2003).

Für AOPsk wurde sowohl für die Elektronendonoren als auch für die Substrate eine Sättigungskinetik beobachtet. Mit beiden Elektronendonoren wurden ähnliche Halbsättigungskonzentrationen für tBOOH erhalten (Daten nicht gezeigt), was mit dem Ping-Pong-Mechanismus übereinstimmt.

Die K<sub>M</sub>-Angaben für AOPsk sind dennoch mit Vorbehalt zu sehen, da die Voraussetzung [S] >> [E] für Anwendung der Michaelis-Menten-Kinetik bei den entsprechenden Messungen nicht durchgehend gegeben war.

Die Grx-Prx-Fusionsproteine zeigen deutlich geringere Affinität für Peroxide als andere Prx (Pauwels *et al.*, 2003; Rouhier und Jacquot, 2003). Dies steht in Übereinstimmung damit, dass die bakteriellen Prx meist unempfindlicher bezüglich Überoxidation sind (Wood *et al.*, 2003). Für AOPsk wurde ein schädlicher Effekt des Peroxidsubstrates festgestellt, deutlich sichtbar zum einen im Verlauf der Reaktion (rasch sinkendes ΔA/min, weshalb nur die Absorptionsänderungen nach 20 und 30 Sekunden zur Aktivitätsberechnung herangezogen wurden), zum anderen bei der Variation der Substratkonzentration. War bei 100 µM Peroxid erst die Sättigung erreicht, wurden mit 200 µM bereits deutlich geringere Aktivitäten gemessen. Die Inaktivierung ist jedoch unabhängig vom verwendeten Substrat, im Gegensatz zu einigen Tryparedoxinperoxidasen, die sich als besonders sensitiv gegenüber Lipidhydroperoxiden zeigten, für tBOOH aber unempfindlich sind (Flohé *et al.*, 2002; Budde *et al.*, 2003).

Die Sensitivität von AOPsk gegenüber dem Peroxidsubstrat ist an sich merkwürdig, denn für diese Empfindlichkeit wird vor allem eine C-terminale Extension und insbesondere der Lysinrest 191 verantwortlich gemacht (Wood *et al.*, 2003; Cha *et al.*, 2000). Beides besitzen AOPsk und allgemein die TypV-Prx jedoch gar nicht.

Das Redoxsystem des Malariaparasiten enthält ein bislang einzigartiges Protein, Plasmoredoxin. Es gehört der Thioredoxin-Superfamilie an, ist aber größer als Thioredoxin und Glutaredoxin (Becker *et al.*, 2003). *In vitro* ist es durch GSH, Grx und Trx reduzierbar und kann Elektronen auf Ribonukleotidreduktase, GSSG und Insulin übertragen. Die beobachteten Aktivitäten als Grx oder Prx sind sehr gering (Becker *et al.*, 2003). Neben dem möglichen Beitrag von Plrx zur Regeneration von GSH war und ist es von großem Interesse, für dieses spezifische Protein mögliche *in vivo*-Funktionen zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Plrx als Elektronendonator für AOPsk dienen kann: Von den wahrscheinlich 2 katalytischen Cysteinresten pro Plrx-Molekül konnten bei einem Konzentrationsverhältnis Plrx : AOPsk = 2.5 : 1 in Anwesenheit des bevorzugten AOP-Substrates tBOOH spontan 1.36 SH-Äquivalente (68%) oxidiert werden. Nach 15 Minuten war die Elektronenübertragung Plrx → AOPsk → tBOOH nahezu komplett (1.89 von 2 SH-Gruppen pro Plrx-Molekül oxidiert). Es wird für die Zukunft die Effizienz dieser Umsetzung zu untersuchen sein. Da Grx bisher das effektivste plasmodial vorkommende Reduktionsmittel für Plrx ist (Becker *et al.*, 2003; noch effektiver ist einzig Tryparedoxin), wäre ferner zu testen, ob sich die Grx-abhängige AOP-Aktivität durch Zwischenschaltung von Plrx steigern lässt.

Da vom reduzierten Plrx alleine 4 SH-Äquivalente auf den Endakzeptor der Elektronen, DTNB, übertragbar waren, wird darüber hinaus die Annahme gestützt, das im Plrx-Molekül zwar 4 nativ redox-aktive Cysteinreste vorhanden, aber nur zwei davon Bestandteil des aktiven Zentrums sind.

Über den Ascorbatstoffwechsel in *Plasmodium* ist der Literatur nichts zu entnehmen. Für den verwandten Organismus *Trypanosoma* ist ein solcher jedoch beschrieben, und ihm wird aufgrund des Mangels an Selen-abhängigen Glutathionperoxidasen und Katalase besondere Bedeutung zugemessen (Clark *et al.*, 1994; Wilkinson *et al.*, 2002). Darüber hinaus werden in *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten Veränderungen des Ascorbatmetabolismus beobachtet, die womöglich vom Parasit induziert sind (Stocker *et al.*, 1986; Iheanacho *et al.*, 1993).

In Anbetracht der möglichen ER-Lokalisation von PfAOP (s. u.) ist von Bedeutung, dass Ascorbat *in vitro* (Mikrosomen) die Oxidation von Proteinthiolen fördern kann (Banhegyi *et al.*, 2003). Es wird ein Mechanismus postuliert, bei dem Dehydroascorbat im ER durch PDI reduziert wird, Proteinthiole als Elektronendonatoren fungieren und somit die Bildung von Disulfidbrücken gefördert wird.

Für den Chloroplast sind zahlreiche spezifische und unspezifische Dehydroascorbatreduktasen beschrieben, da der Ascorbat-Glutathion-Zyklus hier eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von ROS spielt (Chew *et al.*, 2003). Daher wären im Apicoplast lokalisierte DHA-Reduktasenenzyme auch nicht verwunderlich, wenngleich das Photosynthesesystem als wichtigster ROS-Produzent im Chloroplast hier fehlt.

Den oxidierenden Teil des genannten chloroplastischen Zyklus stellt die Ascorbat-Peroxidase dar (Chew *et al.*, 2003). In *Trypanosoma cruzi* ist eine Ascorbat-Peroxidase im ER lokalisiert (Wilkinson *et al.*, 2002). Der darin begründete Test einer Aktivität von AOPsk als DHA-Reduktase bzw. Ascorbat-Peroxidase fiel unter den hier gewählten Bedingungen jedoch negativ aus.

### 4.4.3 Oligomerisierungszustand

Atypische 2-Cys sind über die Bildung eines intramolekularen Disulfids definiert (Wood *et al.*, 2002). Für das hPrx V wurde diese Verbrückung zwischen den Cysteinresten 48 und 152 nachgewiesen. Das C73 dagegen liegt auch nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung noch reduziert vor und ist für die Katalyse nicht notwendig (Seo *et al.*, 2000). Im Pappel-GrxPx, welches nur zwei Cysteinreste enthält, ist das C76 zwar für die Aktivität von Bedeutung, jedoch nicht essentiell, wie anhand der entsprechenden Deletion gezeigt wurde. Rouhier *et al.* vermuten, dass sich im Pappel-GrxPx keine Disulfidbrücke zwischen C51 und C76 bildet, sondern das C76 womöglich eher eine strukturelle denn katalytische Funktion wahrnimmt (2002). Die Autoren schlagen für dieses Protein einen 1-Cys-Mechanismus vor. Die Prx-Domäne des HiFusionsproteins enthält sogar nur ein Cystein (Pauwels *et al.*, 2003). Es handelt sich bei genannten TypV-Prx demnach nur im Fall des hPrxV um ein atypisches 2-Cys-Prx. In Anbetracht von Cysteinverteilung und Titrationsergebnissen war anzunehmen, dass PfaOP wie PtGrxPx und HiPGdx ein 1-Cys-Prx darstellt. Aufgrund der dargelegten Reaktionsmechanismen lag es nahe, für die Prx-Proteine vom TypV als funktionelle Einheit das Monomer anzunehmen; PtGrxPx wird auch als solches beschrieben (Rouhier *et al.*, 2002). Das hPrx V tritt unter denaturierenden Bedingungen unabhängig vom Redoxzustand ebenfalls als Monomer auf (Seo *et al.*, 2000), in der Gelfiltration ergab sich jedoch unter reduzierenden Bedingungen ein Peak entsprechend der Größe des Dimers. Die Interaktionen in diesem nativen Dimer, dessen Existenz durch Evrard *et al.* erneut bestätigt wurde (2004), müssen also nicht-kovalenter Art sein. Für die TPx aus *E. coli*, die gemäß ihrer Sequenz allerdings nicht eindeutig der Typ V-Klasse zuzuordnen ist, wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (Baker und Poole, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob PfaOP ebenfalls ein nicht-kovalentes Dimer bildet. Da auch Deka- und größere Multimere für verschiedene Prx beschrieben sind und deren Bildung durch Überoxidation oder hohe Salzkonzentrationen gefördert wird (Kato *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 2002; Kitano *et al.*, 1999), erfolgten Gelfiltrationsversuche nicht nur mit AOP allein, sondern auch nach Inkubation mit tBOOH bzw. in Anwesenheit von NaCl.

Die Ergebnisse sind trotz der verschiedenen Bedingungen recht ähnlich. Den prozentual größten Anteil hatte stets eine Proteinform entsprechend einem Molekulargewicht von 36-39 kDa, die dem Dimer (45 kDa) näher kommt als dem Monomer (22.5 kDa). Ferner zeigte sich eine 53 kDa großen Form, deren Anteil nach Inkubation mit tBOOH bzw. NaCl etwas höher war (8-11%) im Gegensatz zu 0% in Anwesenheit von DTT bzw. 3% ohne Zusatz. Darüber hinaus fanden sich 9-11% des Proteins im Ausschlussvolumen. Da auch mit Sephadex 200 dieser Anteil nicht auftrennbar war, muss dieses Aggregat > 250 kDa Molekulargewicht haben.

In der SDS-PAGE verhält sich der Hauptanteil des Proteins klar als Monomer (etwa 25 kDa). Da die 36-39 kDa-Form in der SDS-PAGE nicht auftritt, in der Gelfiltration jedoch auch in Anwesenheit von DTT dominiert, ist davon auszugehen, dass im Falle eines Dimers die Bindungen nicht-kovalent sind. Die Kristallstruktur zeigt stark interagierende Dimere, und ergänzende *light scattering*-Experimente bestätigen den dimeren Zustand des Proteins in Lösung (Sarma *et al.*, 2005). Der geringe Anteil an dimerem PfaOP in der Gelelektrophorese

stellt wahrscheinlich ein artefizielles Disulfid dar, das unter stark oxidierenden Bedingungen, beispielsweise zwischen zwei peroxidativen Cysteinen entsteht. Ein solches Artefakt wurde auch für PtGrxPx (Rouhier *et al.*, 2002) ebenso wie das HiPGdx, das mitochondriale 1-Cys-Prx aus *Saccharomyces cerevisiae* und die TypII-Prx B und E aus *At* beobachtet (Pauwels *et al.*, 2003; Pedrajas *et al.*, 2000; Bréhélin *et al.*, 2003). Pauwels und Kollegen halten es für möglich, dass dieses Dimer eine Präventionsmöglichkeit gegen Überoxidation darstellt (2003). Falls es sich bei dem SDS-PAGE-Dimer um eine disulfidhaltige Form handelt, ist nicht auszuschließen, dass es mit der 53 kDa-Form der Gelfiltration übereinstimmt, da beide in ähnlich geringen Anteilen vorhanden sind. Dazu passte dann auch das Fehlen des 53 kDa-Peaks unter reduzierenden Bedingungen.

In der SDS-PAGE tritt unter nicht-reduzierenden Bedingungen ferner eine zweite Bande unterhalb der eigentlichen Monomerform auf. Diese Doppelbande erscheint bei einigen Prx, so auch bei PfTpx1, PtGrxPx und hPrxVI (Rahlfs und Becker, 2001; Rouhier *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 1998a). Während Kang *et al.* durch DTT-Zugabe die scheinbar kleinere in die gewohnte Form überführen konnten, war dies bei den erstgenannten Proteinen nicht möglich. Im Fall von PfTpx1 konnte jedoch die Anwesenheit von DTT bei der Reinigung des Proteins das Auftreten der Doppelbande verhindern. Da auch die untere Bande des Pappel-Prx nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen auftritt, scheint es sich bei allen drei Proteinen um ein durch Oxidation induziertes Phänomen zu handeln. In der Gelfiltration von AOPsk trat die untere Bande nie auf; deshalb besteht die Möglichkeit, dass die Doppelbande ein Artefakt der Vorbehandlung zur SDS-PAGE darstellt und durch intramolekulare Disulfidbildung entsteht. Um die Identität der Doppelbande aufzuklären, wurden beide Banden des PfAOPsk aus dem Gel extrahiert, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Zwar konnte ein Großteil der Peptide beider Proteinformen identifiziert werden (61 bzw. 73% Abdeckung), unglücklicherweise entgingen gerade die cysteinhaltigen Peptide der Identifizierung, so dass keine weitere Aussage zum Zustandekommen der Doppelbande möglich ist.

#### 4.4.4 Röntgenstruktur

Die Aufklärung der Struktur von AOP anhand von Kristallen war mit einer Auflösung von 1.8 Å möglich (Sarma *et al.*, 2005). Es finden sich Prx-typische Strukturelemente mit zentralen  $\beta$ -Faltblatt-Anordnungen und umgebenden  $\alpha$ -Helices. Darüber hinaus wurden AOP-spezifische Elemente beschrieben. Dem für Prx-Proteine akzeptierten Mechanismus folgend wird die Peroxidasefunktion mit Hilfe eines konservierten Cysteins ( $C_P$ ) ausgeführt, das sich in der ersten Windung einer  $\alpha$ -Helix in der *active site pocket* befindet. Im Falle von AOP ist dieses Cystein das C59, der charakteristische  $C_P$ -loop ist Teil der  $\alpha 2$ -Helix. Auf die Oxidation dieses Restes folgt eine partielle Entfaltung, die in 2-Cys-Proteinen dem lösenden Cystein  $C_R$  Reaktivität ermöglicht. Da das  $C_P$  im AOPsk-Kristall in der Sulfonsäureform vorliegt, sollte ein  $C_R$  in der Struktur exponiert sein. C85 befindet sich jedoch innerhalb eines zentralen  $\beta$ -Faltblattes. Dies stützt die Annahme, dass PfAOP mechanistisch ein 1-Cys-Prx darstellt. Die Kristallisation eines Prx in der  $C_P$ -SO<sub>3</sub>H-Form ist bislang für AOP einzigartig. An der Umgebung des  $C_P$  wird deutlich, dass mit der Überoxidation eine Destabilisierung der *active site* einhergeht. Eine weitere Besonderheit der AOP-Struktur ist das sogenannte  $\alpha$ -Aneurisma,

eine Insertion aus nur einem AS-Rest innerhalb der dem C59 folgenden Windung. Dieses Charakteristikum findet sich auch in humanem PrxV und dem Hi-Hybrid-Prx. Wie das Aneurisma die Funktion beeinflusst, ist noch unklar.

Neben dem C<sub>P</sub> finden sich die in allen Prx konservierten, katalytisch bedeutsamen Reste auch in PFAOP (Pro52, Thr56, Arg137). Für PtGrxPx konnte erst kürzlich die Bedeutung von Thr48 und R129 für die Reaktivität mit dem Peroxidsubstrat bestätigt werden, während entsprechende Mutanten auf die Regeneration des Enzyms keinen Einfluss haben (Rouhier *et al.*, 2005).

Die *interface* des im AOP-Kristall vorliegenden Dimers ist vom sog. A-Typ (*alternate*) und basiert auf *loop*-Strukturen, während der *interface* vom B-Typ  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zugrunde liegen. Dekamer-bildende Prx verwenden beide *interface*-Strukturen, was mit dem fehlenden Dekamer in der Gelfiltration übereinstimmt. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Multimer im Ausschlussvolumen der Gelfiltration keine native Bedeutung hat.

#### 4.4.5 Subzelluläre Lokalisation

*Plasmodium falciparum* besitzt als Mitglied der Apicomplexa auch das für diesen Stamm typische Plastid, den Apicoplast. Diese Organelle ist für den Parasit essentiell und stellt als Angriffspunkt für u. a. Antibiotika und Herbizide ein ideales *drug target* dar (Beckers *et al.*, 1995; Fichera *et al.*, 1995; Jomaa *et al.*, 1999). Das Plastidengenom enthält nur sehr wenig genetische Information, dagegen gibt es zahlreiche kerncodierte Proteine, deren Bestimmung möglicherweise der Apicoplast ist (Roos *et al.*, 2002).

Bislang wurde jedoch nur für wenige der für den Apicoplast vorhergesagten Proteine tatsächlich eine solche Lokalisation nachgewiesen (Jomaa *et al.*, 1999; Jelenska *et al.*, 2001; Waller *et al.*, 2000).

Für die plasmodialen Peroxidasen ist die subzelluläre Bestimmung noch nicht geklärt, während diese beispielsweise für die Säuger-Prx schon recht gut untersucht ist (Immenschuh *et al.*, 2003). Für das Pf1-Cys-Prx wird derzeit untersucht, ob es sich in der Fressvakuole befindet, da sie das Zentrum des Hämoglobinstoffwechsels darstellt. Eine Funktion des 1-Cys-Prx beim Hämoglobinumsatz wird aufgrund der besonderen Präsenz des Prx in späten Trophozoiten vermutet (Kawazu *et al.*, 2000).

Bei PFAOP handelt es sich laut entsprechender Vorhersageprogramme um ein mögliches Apicoplast-Protein. Von der zweiteiligen Leader-Sequenz wird von diesen Programmen jedoch nur die Länge des ersten Teils, der einem herkömmlichen Signalpeptid entspricht, kalkuliert (20 AS nach SignalP, 24 AS nach PATS).

Die Untersuchung der subzellulären Bestimmung von Pf-Proteinen ist aus verschiedenen Gründen so interessant wie schwierig: Pf hat unter allen Eukaryoten mit das ungewöhnlichste Protein-Verkehrssystem. Das liegt zum einen an den zahlreichen spezifischen, intraparasitären Kompartimenten, zum anderen beziehen die Bestimmungsorte für Pf-Proteine auch die Wirtszelle mit ein (Van Dooren *et al.*, 2000). Daraus resultiert eine besondere Bedeutung der Signalpeptide. Das sekretorische System des Parasiten muss unterscheiden zwischen den Zielorten ER, Golgi-Apparat, Fressvakuole, Mikronema, Rhoptries, *dense granules*,



Apicoplast, Parasitenmembran, Parasitophorer Vakuole, Membran der Parasitophoren Vakuole, Erythrocyten-Cytosol und –Plasmamembran (Van Dooren *et al.*, 2000). So benötigen denn nicht nur Apicoplasten-Proteine eine mehrteilige Target-Sequenz: Für einen Transport aus der PV in die Rote Blutzelle ist beispielsweise eine zweiteilige VTS-Sequenz verantwortlich (Lopez-Estrano, 1998).

Eine typische Signalsequenz für das Endomembransystem besteht aus drei Regionen: einer hydrophoben Kernregion, die den wichtigsten Teil für das Targeting darstellt, einer polaren c- und einer ebenfalls eher polaren n-Region. Ungefaltete Proteine werden an der ER-Membran im Allgemeinen mittels des Sec-Translokons in bzw. durch die Membran geschleust. Für Proteine, die in die Plasmamembran von Bakterien oder die Thylakoidmembran von Chloroplasten verbracht werden sollen, existiert ein weiteres Transportsystem, das Tat-System. Die Benennung basiert auf der charakteristischen Eigenschaft der entsprechenden Signalsequenzen: einem *twin-arginine motif*, das sich direkt upstream der h-Region befindet. Für die meisten der so transportierten Proteine ist eine Bindungsfähigkeit von Redoxcofaktoren vorhergesagt, Faltung und Oligomerisierung scheinen hier vor der Translokation stattzufinden (Martoglio und Dobberstein, 1998). Abb. A6 zeigt die erläuterten Regionen n, h und c des putativen Signalpeptids. Auffällig ist, dass auch hier direkt upstream der Kernregion h ein Tat-Motiv lokalisiert ist. Ob dieses jedoch tatsächlich für die Translokation von AOP von Bedeutung ist, kann aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen nicht geschlossen werden.

Die Wahrscheinlichkeit für die Präsenz eines Signalpeptids wird von SignalP mit einem score von 0.818 (score = 1 entspricht hoher, score = 0 niedriger Wahrscheinlichkeit) angegeben; dagegen handelt es sich laut des Programms dabei nicht um ein Signal-Anker-Peptid (score = 0.181) – es ist also anzunehmen, dass AOP weder ein cytosolisches, noch ein membranständiges Protein ist, sondern zunächst in das ER-Lumen transferiert wird. Dies und möglicherweise eine weitere Verbringung in den Apicoplast sollte mittels Kopplung der Sequenz AOP<sup>1-66</sup> an GFP und der Expression in *Toxoplasma gondii* untersucht werden.

Die Tachyzoitenform von *T. gondii* ist dem Pf-Merozoit in vielerlei Hinsicht ähnlich (Van Dooren *et al.*, 2000), daher ist es nahe liegend, aufgrund der leichteren Transfektion und der deutlicher sichtbaren subzellulären Organisation von Tg die intrazelluläre Lokalisation von Pf-Proteinen mit Hilfe dieses Organismus' zu untersuchen.

Es gibt jedoch auch Unterschiede bezüglich des Proteinaustausches zwischen den genannten Organismen: Die Strukturen von ER und Golgi-Apparat sind in Pf nicht so eindeutig auszumachen wie in Tg; die Existenz typischer Proteine in Pf (Golgi: ERD2, Rab6; ER: Reticuloalbin, GRP; Van Dooren *et al.*, 2000) deuten jedoch auf das Vorkommen eines klassischen sekretorischen Weges bei Pf hin. Einige Autoren gehen sogar von zwei verschiedenen ER-ähnlichen Organellen in Pf aus. Eine befindet sich seitlich an der Peripherie des Parasiten und wird als sERA (*secondary ER of apicomplexa*) bezeichnet und als Teil eines alternativen sekretorischen Weges angesehen (Wiser *et al.*, 1997, Cortes *et al.*, 2003). Alle (bis zum Jahr 2000 bekannten) sekretorischen Proteine von Tg besitzen eine klassische N-terminale Signalsequenz (Kaasch und Joiner, 2000); Pf dagegen hat auch entsprechende Proteine, denen ein Signalpeptid fehlt (Foley und Tilley, 1998; Van Dooren *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Pf wurde für Tg wurde bislang kein Transport von

Parasitenproteinen in die Wirtszelle beobachtet (Van Dooren *et al.*, 2000). Eine weitere Besonderheit von Pf ist, dass der Export einiger Pf-Proteine nicht durch Brefeldin A gehemmt wird (Kaasch und Joiner, 2000; Derocher *et al.*, 2005).

Während Tg-Transitpeptide wie Chloroplasten-TP Serin- und Threonin-reich sind, beinhalten Pf-TP verstärkt Lysin und Asparagin (Foth und McFadden, 2003). So werden denn auch Tg-TP relativ sicher von Chloroplast-Vorhersageprogrammen erkannt (Foth und McFadden, 2003), Pf-TP aber nicht (Waller *et al.*, 1998).

Für die Verwendbarkeit des *Toxoplasma*-Systems zur Untersuchung von *Plasmodium*-Proteinen sprechen Untersuchungen, denen zufolge Tg-leader-Sequenzen bei Pf funktionieren und umgekehrt (Waller *et al.*, 2000).

Die Untersuchung des Targetings in Tg, beschrieben in Nickel *et al.* (Manuskript eingereicht), zeigte für PfAOPsk ebenso wie für das Tg-Homolog eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum. Dies ist verwunderlich, da die Apicoplast-Vorhersage für das Protein mit recht hoher Wahrscheinlichkeit erfolgt war (PATS: score = 0.836; PlasmAP: 5 von 5 Kriterien erfüllt). Des weiteren enthält die Sequenz des Peroxiredoxins kein für ein luminales ER-Protein typisches Rückhaltmotiv wie KDEL oder HDEL (oder auch SEEL wie im Fall der PfPDI; Florent *et al.*, 2000). Allerdings sind für *Plasmodium* wie auch für *Toxoplasma* bereits Proteine bekannt, die auch ohne ein solches Motiv (TgGPxII; Wilkinson *et al.*, 2002) oder gar zusätzlich ohne Signalsequenz (Pf Phosphatidylserinecarboxylase, Baunaure *et al.*, 2004, hat weder XDEL noch SP, allerdings aber IKIR ähnlich dem KKXX-Motiv von ER-Membranproteinen) im ER lokalisiert sind. Zumindest zeigen die Ergebnisse, dass der erste Teil des entsprechenden Signalpeptids funktional ist und AOP in den sekretorischen Weg einschleust.

Bei der kritischen Betrachtung der Resultate sind ferner folgende Punkte zu bedenken:

Es ist mehrfach beschrieben, dass die Überexpression des GFP-Proteins das weitere Targeting eines Proteins vom ER aus verhindern und zur Akkumulation in diesem oder einem anderen Kompartiment führen kann. Die Wahl des Promotors ist daher ein kritischer Faktor des Experimentes (Van Dooren *et al.*, 2002; Lisenbee *et al.*, 2003). Dies würde jedoch nicht erklären, warum das Tg-Homolog des PfAOP, dessen Lokalisation mittels der kompletten Sequenz untersucht wurde, ebenfalls im ER zu finden war.

Es existiert die Vermutung, dass der Apicoplast innerhalb des ER liegt und somit die äußere der Plastid-Membranen mittels eines gewöhnlichen Signalpeptides passiert wird (Joiner und Roos, 2002). Für die Lage innerhalb des ER spricht die Tatsache, dass noch nie die Fusion von Vesikeln mit oder deren Abknospen vom Apicoplast beobachtet werden konnte. Darüber hinaus kann weder mittels Brefeldin A noch durch den Anhang eines ER-Retentionsmotivs der Transport eines Proteins zum Apicoplasten gehemmt werden. Damit könnte die gefundene ER-Lokalisation von Tg- und PfAOP einer Apicoplast-Lokalisation entsprechen. Gestützt wird diese Theorie ferner dadurch, dass bei Cryptomonaden, Gold- und Braunalgen die äußeren Membranen des Chloroplasten in Beziehung zu ER und Kernhülle stehen, weshalb dort vom CER (*chloroplast endoplasmic reticulum*) gesprochen wird (Gibbs, 1981; Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001).

Das Verbleiben des AOP im ER könnte vom Parasitenstadium abhängig sein (Kocken *et al.*; 1998). Falls der Apicoplast jedoch tatsächlich für den Invasionsprozess benötigt wird (Fichera und Roos, 1997), sollte gerade der Tachyzoit einen voll ausgebildeten Apicoplast besitzen.

Es ist anzunehmen, dass es sich bei der im ER detektierten Variante um die einfach verkürzte Form, AOPoS, handelt. Die fehlende Peroxidase-Aktivität von AOPoS *in vitro* deutet allerdings daraufhin, dass diese Form noch nicht das reife Protein darstellt, was für ein weiteres Targeting des Proteins spricht.

Weder für den Apicoplast noch für das ER von Pf sind bislang antioxidative Enzyme beschrieben. Eine Ausnahme bildet die Proteindisulfidisomerase (Florent *et al.*, 2000).

Obwohl das ER durch sein oxidierendes Milieu ein sehr wahrscheinlicher Entstehungsort für Hydroperoxide ist, weiß man generell noch nicht viel über deren Entgiftung (Wilkinson *et al.*, 2002). Für *Arabidopsis thaliana* wird eine von sieben putativen Glutathionperoxidasen als im ER lokalisiert angenommen (Rodriguez-Milla *et al.*, 2003). In *Trypanosoma cruzi* existiert eine im ER lokalisierte Glutathionperoxidase, die auch mit Thioredoxin arbeitet (Wilkinson *et al.*, 2002). Da ihre Substratspezifität auf Hydroperoxide von Fettsäuren und Phospholipiden beschränkt ist, wird vermutet, dass ihre Funktion im Schutz der Lipide liegt, deren Synthesort ja klassischerweise das glatte ER ist. Der Schutz der Lipide hat bei Pf aufgrund der hohen Syntheseleistung – der Schizont besitzt die 5fache Menge an Phospholipiden vgl. mit einem uninfizierten Erythrozyten (Baunaure *et al.*, 2004) – besondere Bedeutung; die erläuterte Substratpräferenz unterstützt diese Funktionstheorie für AOP. Wie PFAOP fehlt auch TcGPxII ein konventionelles C-terminales ER-Retentionssignal. Von der Säuger-PHGPx wird ebenfalls eine ER-Lokalisation angenommen und man vermutet für dieses Protein neben der Peroxidase-Funktion eine Modulation der Aktivität anderer Enzyme, wie z. B. der der Prostaglandin-Biosynthese (Sakamoto *et al.*, 2000).

ER-Proteine sind von allen zellulären Proteinen die empfindlichsten gegenüber oxidativem Stress in Form von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Van der Vlies *et al.*, 2003). Da den Peroxiredoxinen allgemein eine Funktion bei der durch Oxidantien-vermittelten Signalübertragung zugeschrieben wird (Kang *et al.*, 1998b; Wood *et al.*, 2003), könnte AOP auch für Adaptationsmechanismen (Harding *et al.*, 2003) eine Rolle spielen.

Die Hypothese, dass es sich bei den Targeting-Ergebnissen um ein Artefakt und bei AOP doch um eine apicoplastische Peroxidase handelt, erhält Unterstützung durch die bekannte Existenz von Peroxiredoxinen im verwandten Chloroplast (Baier und Dietz, 1997), darunter auch Lipidhydroperoxid-entgiftende Enzyme (Blée und Joyard, 1996). Darüber hinaus konnte für das homologe GrxPx aus *Populus trichocarpa* trotz fehlender Signalsequenzen die plastidäre Lokalisation nachgewiesen werden (Rouhier *et al.*, 2001).

Schließlich bleibt noch die Möglichkeit, dass AOP eine duale Lokalisation besitzt und im ER und dem Apicoplast zu finden ist. Hier könnte die Akzeptanz verschiedener Elektronendonoren zum Tragen kommen. Ein solcher Zusammenhang wird auch für die *Trypanosoma cruzi*-GPxI vorgeschlagen, die in Glycosom und Cytosol zu finden ist und sowohl mit GSH als auch mit Tryparedoxin arbeitet (Wilkinson *et al.*, 2002). In Anbetracht der plastidären Lokalisation des Typ II-Fettsäure-Synthese-Weges und der Substratpräferenz von PFAOP ist diese Hypothese besonders verlockend. In diesem Kontext ist das PDI-ähnliche Protein RB60 der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* erwähnenswert, das zu ER

und Chloroplast gebracht wird (Trebitch *et al.*, 2001). Die Präsenz in verschiedenen Zellkompartimenten ist außerdem für das Rattenleber-Prx I (= HBP23) beschrieben (Cytosol und Nucleus; Immenschuh *et al.*, 2003), und auch für hPrx V wird eine Lokalisation in Cytosol, Peroxisomen und Mitochondrien postuliert (Seo *et al.*, 2000). Rouhier *et al.* nennen die Lokalisation in mehreren Kompartimenten als Charakteristikum der Typ II-Prx (2005). Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl hinsichtlich kinetischer Charakteristika (Akzeptanz von Trx, Grx und Plrx als Elektronendonator, Präferenz für Grx, Präferenz für PCOOH als Peroxidsubstrat) als auch der subzellulären Lokalisation angenommen werden kann, dass AOP eine spezifische Funktion in Pf ausübt. Distinkte Aufgaben, bei denen sich Prx eines Organismus nicht ersetzen können, wurden erst kürzlich auch für zwei Prx eines Cyanobakteriums beschrieben (Hosoya-Matsuda *et al.*, 2005).

## 4.5 Weitere Charakterisierung der Pf-Thioredoxinperoxidase1 (TPx1)

### 4.5.1 Substratspezifität

#### 4.5.1.1 Glutaredoxin

PfTPx1 stellt ein typisches 2-Cys-Prx und eine klassische Thioredoxinperoxidase dar (Rahlfs und Becker). Da neben Trx auch Grx das *active site*-Motiv CXXC besitzt, was als Grundlage für die Eignung als Elektronendonator angesehen wird (Flohé *et al.*, 2003), ist die Verwendbarkeit von Grx ebenfalls denkbar. Trotzdem wurden bis auf einige zur Klasse V gehörende Enzyme nur wenige Prx mit Grx getestet. Humanes Prx I-III und V sind mit Grx nicht aktiv (Kang *et al.*, 1998b; Seo *et al.*, 2000), gleiches gilt für *E. coli*-TPx (Baker und Poole, 2003). Anhand der Resultate mit dem GrxPx aus *Populus trichocarpa* kann jedoch gemutmaßt werden, dass das peroxidative Cystein (C<sub>p</sub>) für die Grx-abhängige Aktivität ausreichend ist und weitere Cysteinreste je nach Position förderlich oder störend sein können (Rouhier *et al.*, 2002). Daher ergab sich die Frage nach einer möglichen Grx-Interaktion der PfTPx1. Weitere Unterstützung erhielt diese Fragestellung durch die Ähnlichkeit der Cysteinpositionen Grx-abhängiger Peroxiredoxine (Pt-GrxPx: C51 und C76) und der ersten beiden Cysteinreste in TPx1 (C50 und C74). Zwar hatte sich die Einbringung eines dritten Cysteins (C152) im Pappel-Enzym als hinderlich erwiesen, die Lokalisation des dritten Cysteins in TPx1 unterscheidet sich jedoch deutlich von dieser Position (C170).

Die Untersuchung einer Grx-abhängigen Aktivität der TPx1 verlief positiv: Zwar erwies sich die spezifische Aktivität mit dem parallel verwendeten Trx-System als erheblich höher, die Affinität ist jedoch für Grx wesentlich größer. Somit ergeben sich für die katalytische Effizienz nur geringe Unterschiede (Tabelle 4.2).

	<i>Grx-System</i>	<i>Trx-System</i>
<b>K<sub>M</sub> für Grx / Trx</b> ( $\mu\text{M}$ )	0.837	22.5
<b>V<sub>max</sub></b> (U/mg)	0.031 $\pm$ 0.002	1.91 $\pm$ 0.28*
<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub></b> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.45 x 10 <sup>4</sup>	3.29 x 10 <sup>4</sup> *

**Tabelle 4.2. Vergleich der kinetischen Parameter der TPx1-Aktivität je nach Elektronendonorsystem.**

\*Unterschiede der hier für das WT-Enzym gemessenen Parameter zu Literaturwerten und auch innerhalb der Literaturwerte (Rahlfs und Becker, 2001; Akerman und Müller, 2003) können in den unterschiedlichen Bedingungen des aufwendigen backup-

Systems begründet sein, ebenso wie in der schnellen Inaktivierung der TPx1.

Sättigung wurde unter den angewandten Bedingungen schon bei 2  $\mu\text{M}$  Grx erreicht, jedoch erst bei 70  $\mu\text{M}$  Trx. Zwar liegen für Pf keine Daten vor, generell wird jedoch von zellulären Trx-Konzentrationen um 10  $\mu\text{M}$  gesprochen, während die Grx-Konzentration eher um 1  $\mu\text{M}$  liegt (Fernandes und Holmgren, 2004). Im Falle ähnlicher Konzentrationen in Pf würde dieses Verhältnis die niedrigere Affinität der TPx1 zu Trx1 in etwa aufwiegen, so dass die Trx-abhängige Aktivität gegenüber der Grx-abhängigen an Bedeutung überwiegt. Der Ausgleich unterschiedlicher Konzentrationen durch sich reziprok verhaltende K<sub>M</sub>-Werte (oder umgekehrt) ist auch für Ribonukleotid-Reduktase beschrieben (10fach geringerer K<sub>M</sub> für Grx verglichen mit Trx; Fernandes und Holmgren, 2004). Während sich im Falle o. g. Konzentrationen an Grx und Trx die Steigerung der Grx-Expression nicht/kaum auf die TPx-Aktivität auswirken würde, hätte die Erhöhung der Trx-Expression durchaus einen Einfluss. Die geringere Affinität für Trx hat ferner zur Folge, dass sich ein Anstieg der TPx-Konzentration mit dem Trx-backup stärker bemerkbar macht. Selbst bei gleichen Konzentrationen von Grx und Trx würde (unter den gegebenen Bedingungen) eine Änderung der TPx-Konzentration zwischen 0 und 5  $\mu\text{M}$  40fach stärkere Steigerung der Trx-abhängigen Aktivität bewirken, was trotz der hier gezeigten Daten die Bedeutung des Trx-Systems als Elektronendonator für die TPx1 unterstreicht.

Dass für das humane Prx V keine Grx-abhängige Aktivität gemessen wurde (Seo *et al.*, 2000), könnte neben dem störenden Einfluss des dritten Cysteins (C152) an der geringen verwendeten Konzentration (1.5  $\mu\text{M}$ ) liegen, verglichen mit den hier eingesetzten 40  $\mu\text{M}$  TPx1. Aus diesem Blickwinkel betrachtet, sind die TPx1-Ergebnisse nicht so eindeutig wie die mit PtGrxPx ( $\Delta A = 0.9 \text{ min}^{-1}$  mit 2.5  $\mu\text{M}$  Peroxiredoxin und 20  $\mu\text{M}$  Grx; Rouhier *et al.*, 2002). Die spezifische, Grx-abhängige Aktivität des PfaOP ist ebenfalls deutlich höher (Faktor 10; 0.32 U/mg vs. 0.031 U/mg). Die Affinität der TPx1 für Grx (K<sub>M</sub> = 0.84  $\mu\text{M}$ ) ist jedoch vergleichbar mit den Werten der beiden TypV-Prx (PtGrxPx: 3  $\mu\text{M}$ ; PfaOP: 4  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.5.1.2 Plasmoredoxin

In einem qualitativen Versuchsansatz wurde, analog zu den Untersuchungen mit AOPsk, die Interaktion des Plasmodien-spezifischen Proteins PfPlrx mit TPx1 getestet. Im Zuge dessen wurde die Beobachtung gemacht, dass Plrx selber in gewissem Umfang H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert, was für tBOOH nicht der Fall war. Die eigentliche Probe zeigte, dass Plrx als Elektronendonator für TPx1 dienen kann. Das Ausmaß der spontanen Reaktion ist identisch mit dem des

entsprechenden AOPsk-Versuchs. Der Vergleich der Zeitverläufe (Reaktionen nach 15 Minuten) ist aufgrund der Prx- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Interaktion nicht möglich.

Für weitere Untersuchungen ist die Bestimmung der kinetischen Parameter der Reaktion interessant, ebenso die Aufklärung der Veränderungen im Prx-Molekül bei seiner Oxidation. Da im Rahmen dieser Arbeit die Reduktion zweier plasmodialer Prx durch Prx gezeigt wurde, wäre es ferner wissenswert, ob auch die anderen bekannten Peroxidasen des Organismus von Prx mit Elektronen beliefert werden können.

#### 4.5.1.3 Dehydroascorbat

Aus den in 3.6.3 geschilderten Gründen wurde im Zuge der weiteren Charakterisierung der PfTPx1 auch die mögliche Interaktion mit Ascorbat bzw. Dehydroascorbat untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die TPx1 die Fähigkeit zur Ascorbatreduktion besitzt. Es ist jedoch nötig zu erwähnen, dass es sich bei dieser Aktivität – wie bei der anderer Thiolproteine (Grx, TrxR, PDI) auch – wohl um eine eher unspezifische handelt, was aus der geringen Affinität (halbmaximale Geschwindigkeit mit etwa 1.75 mM DHA) ersichtlich wird. Der  $K_M$  dürfte somit in ähnlichem Bereich liegen wie der anderer unspezifischer DHA-Reduktasen (TrxR aus Rattenleber 1.5 mM; May *et al.*, 1997). Die Wechselzahl ist jedoch mit  $1.45 \text{ min}^{-1}$  ( $V_{\max}$  wurde den Kurvenwerten entnommen) deutlich geringer als die anderer NADPH-abhängiger DHA-Reduktasen (TrxR z. B.  $90 \text{ min}^{-1}$ , May *et al.*, 1997).

Da die DHA-Konzentration in *Plasmodium* nicht bekannt ist, kann zur physiologischen Bedeutung der gemessenen Aktivität keine Aussage getroffen werden. Es ist jedoch möglich, dass die bisher mit Säuger-Zellysaten gemessene NADPH-abhängige DHA-Reduktion (z. B. Mendiratta *et al.*, 1998) nicht nur die Summe der Aktivitäten von TrxR und Trx sind, sondern die Peroxiredoxine ebenfalls dazu beitragen.

In diesem Zusammenhang wäre bei näherer Betrachtung der Frage nachzugehen, ob die TPx1 auch Monodehydroascorbatreduktase-Aktivität besitzt. Für die TrxR war die Umsetzung des MDHA-Radikals nachweisbar, und die Affinität zu dieser Verbindung ist etwa eine Größenordnung höher ( $\sim 2 \mu\text{M}$ ) als für DHA (May *et al.*, 1998b). Damit hat die durch TrxR ausgeübte Ascorbatregeneration auch eine spezifische Komponente, die bei der TPx1 auch existieren könnte.

Die anders gerichtete Reaktion – die Ascorbat-abhängige Peroxidase-Aktivität, wie sie z. B. für Trypanosomen und Chloroplasten beschrieben ist (Docampo *et al.*, 1976; Hossain und Asada, 1984), konnte unter gegebenen Bedingungen für die TPx1 nicht festgestellt werden.

#### 4.5.2 Bedeutung der Cysteinreste C74 und C170

Die Fähigkeit von Peroxiredoxinen, Thioredoxin-abhängig zu arbeiten, scheint, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, an ein zweites Cystein geknüpft zu sein. Einzig für das mitochondriale 1-Cys-Prx aus *S. cerevisiae*, Prx1p, ist die Hinlänglichkeit des peroxidativen Cysteins für Trx-abhängige Aktivität beschrieben. Hier ist das zweite, nicht-konservierte Cystein (C38) zwar an der Dimerbildung im oxidierten Zustand beteiligt, sein Fehlen beeinflusst die Trx-abhängige Aktivität jedoch nicht (Pedrajas *et al.*, 2000).

Andere Trx-abhängige Prx besitzen zwar nur ein konserviertes, dafür aber weitere, nicht-konservierte Cysteine, für die ein Einfluss auf die Trx-Akzeptanz nicht allgemein ausgeschlossen werden kann. Das 1-Cys-Prx aus Pf beispielsweise, was zumindest *einem* Bericht nach Aktivität mit Trx zeigt (Krnajski *et al.*, 2001), hat neben dem peroxidativen Cystein (C47) weitere in den Positionen 66, 73, 101, 128, 130, 184, 185. Die PFTP<sub>XGI</sub> besitzt neben dem Cystein der katalytischen Triade (C76) zwei zusätzliche Cysteinreste (120 und 154; Sztajer *et al.*, 2001).

Im Gegensatz dazu gibt es auch Enzyme, die trotz des Besitzes mehrerer Cysteine anscheinend nicht durch Trx reduzierbar sind (humanes „1-Cys“-Prx (hORF6, C47 und 91), Kang *et al.*, 1998a; Typ II-Prx B (C51 and 76) and E (C121 and 146) aus *Arabidopsis thaliana*, Bréhélin *et al.*, 2003).

Ergebnisse zahlreicher Mutagenese-Studien sprechen für die Bedeutung eines zweiten Cysteinrestes für die Akzeptanz von Trx. Eine C170S-Mutante des Hefe-TSA (nur noch im Besitz des einen, peroxidativen C47) zeigte weiterhin Aktivität mit DTT, nicht jedoch mit Trx. Es wird ein Reaktionsmodell vorgeschlagen, in dem die Trx-abhängige Aktivität zwei Cysteine einbezieht (Chae *et al.*, 1994). Weitere Hinweise auf die Notwendigkeit eines zweiten Cysteinrestes wurden mit dem TypQ-Prx aus *Sedum lineare* (Kong *et al.*, 2000) und dem PMP20-Protein aus *Candida boidinii* (Horiguchi *et al.*, 2001) erhalten. Serinmutanten des *E. coli*-Bcp (C55S und C99S) behielten zwar ihre TPx-Aktivität, aber auch hier muss berücksichtigt werden, dass jede der Mutanten noch zwei Cysteine besaß (peroxidatives C50 und das entsprechende andere; Jeong *et al.*, 2000).

Für das humane, atypische 2-Cys-Prx, Prx V (C48, 73 und 152), wurde nachgewiesen, dass das C73 ohne Auswirkung auf DTT- oder Trx-abhängige Aktivität ausgetauscht werden kann, C152 jedoch für die Trx-Aktivität vonnöten ist (Seo *et al.*, 2000).

Folgende Erklärungsmöglichkeiten für die Notwendigkeit zweier Cysteinreste für die TPx-Aktivität sind vorstellbar: In der Prx-Struktur kommt das peroxidative Cystein (C<sub>P</sub>) durch Oxidation in einer Art Tasche zu liegen, während das lösende Cystein (C<sub>R</sub>) durch die Oxidation des C<sub>P</sub> exponiert wird. Die meisten 1-Cys-Prx sind daher nur durch niedermolekulare Thiole reduzierbar, nicht jedoch durch sperrigere Proteinthiole. Das größte Hindernis für die Reduktion durch Trx könnte also die schlechte Zugänglichkeit des C<sub>P</sub> sein.

*Per definitionem* stellt Trx eine Proteindisulfid-Oxidoreduktase dar. Gemäß dem Mechanismus, der für die Reduktion eines 2-Cys-Prx durch ein Dithiol angenommen wird (Hofmann *et al.*, 2002), reagiert Trx mit dem Prx-Disulfid, das bei einem typischen 2-Cys-Prx aus zwei Untereinheiten besteht. In einem 1-Cys-Prx müsste dagegen eine Reaktion mit der Sulfensäureform des peroxidativen Cysteins stattfinden.

Falls die Reaktion des ersten katalytischen Trx-Cysteins mit der Sulfensäure des Prx zustande kam, ergeben sich zwei weitere kritische Punkte im Reaktionsablauf: Zum einen müsste das freie Cystein des Trx in der Lage sein, das gemischte Trx-Prx-Disulfid aufzulösen, obwohl dieses nun nicht, wie üblich, mit dem C-terminalen Prx-Cystein, sondern mit dem peroxidativen gebildet wurde. Falls dies nicht möglich ist, hinge es zum anderen von der TrxR ab, ob sie statt des intramolekularen Trx-Disulfids nun das gemischte Trx-Prx-Disulfid reduzieren kann. Dies käme einem Monothiol-Reaktionsweg des Trx gleich. In allen geschilderten Fällen könnte das Voranschreiten des Reaktionszyklus ferner entscheidend von

der im Assay verwendeten Proteinkombination abhängen (werden Proteine desselben Organismus verwendet oder nicht etc.).

Die C76A-Mutante des PtGrxPx (C51 und C76) behielt ihre Trx-abhängige Aktivität, und auch der  $K_M$  für Trx blieb unverändert (Rouhier *et al.*, 2002). Dadurch wird die Vermutung gestützt, dass dieses Prx mechanistisch ein 1-Cys-Prx darstellt. Das hier charakterisierte homologe PfAOP akzeptiert ebenfalls Trx trotz der fehlenden katalytischen Wirksamkeit des zweiten Cysteins (C85). Diese Beobachtungen zeigen, dass Trx prinzipiell zur Reaktion mit der Sulfensäureform in der Lage ist.

Der Mechanismus dieser 1-Cys-Prx schließt die Bildung eines intramolekularen Trx-Disulfides ein: Während mit den Pappel-Proteinen für Grx die Möglichkeit eines Monothiol-Weges anhand einer Grx-1-Cys-Mutante gezeigt wurde, schlugen Versuche mit einer Trx-1-Cys-Mutante fehl. Der katalytische Zyklus endete mit dem gemischten Proteindisulfid (Trx + Wildtyp-Prx) als *dead end*-Zwischenprodukt (Rouhier *et al.*, 2002). Das bedeutet, dass letzteres durch die TrxR nicht aufgelöst werden kann. Unter der Voraussetzung, dass diese Beobachtung verallgemeinert werden kann, scheinen daher v. a. die Zugänglichkeit der C<sub>P</sub>-Sulfensäure und die Bildungsmöglichkeit des Trx-Disulfids determinierende Schritte für die Möglichkeit der Trx-Aktivität eines 1-Cys-Prx zu sein.

Die erwähnte PtGrxPxC76A-Mutante besitzt mit Grx noch 25% Restaktivität. Die Autoren führen diese Veränderung weniger auf die katalytische Notwendigkeit des Cysteins selbst als auf die strukturelle Veränderung durch den Austausch zurück. Interessanterweise resultierte auch die Einführung von C152 in einem kompletten Aktivitätsverlust mit Grx (Rouhier *et al.*, 2002). Es ist daher anzunehmen, dass für die Akzeptanz von Grx als Elektronendonator das peroxidative Cystein ausreicht und zusätzliche Cysteine je nach Position entweder fördernd (C76) oder hinderlich (C152) sein können.

Weitere Informationen über Grx-abhängige Aktivität von Prx aus der Literatur sind knapp. Für das humane Prx V ist zwar bekannt, dass der WT nicht mit Grx arbeitet, leider wurden aber die Mutanten anscheinend nicht daraufhin getestet. Hier wäre, die Ergebnisse von Rouhier *et al.* berücksichtigend, v. a. das Verhalten der C152S-Mutante interessant gewesen.

PfTPx1 besitzt drei Cysteine: das peroxidative C50, das C-terminale, in den typischen 2-Cys-Prx konservierte C170 und ein zusätzliches in Position 74. Die Lokalisation des letzteren ähnelt zwar der in Typ V-Enzymen (Abb. A7), jedoch handelt es sich, die Gesamtsequenz betrachtet, um ein typisches 2-Cys-Prx.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welches Cystein in PfTPx1 neben dem peroxidativen für die Trx-abhängige Aktivität verantwortlich ist und wie diese beiden Cysteine die Aktivität mit Grx beeinflussen. Zudem wäre interessant herauszufinden, ob ein zweites Cystein für diese Aktivitäten überhaupt notwendig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch auf die Einzelmutanten fokussiert. Diese wurden mittels *site-directed mutagenesis* generiert. Bei der heterologen Expression und Reinigung fiel die Instabilität der C170A-Mutante auf, die durch Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen vermindert werden konnte.

Bezüglich Grx als Elektronendonator zeigt die Bestimmung der  $K_M$ -Werte, der maximalen Geschwindigkeit und der katalytischen Effizienz der drei Enzymformen, dass keine der



vorgenommenen Mutationen die Grx-abhängige Prx-Aktivität signifikant beeinflusst (Tabelle 4.3).

		Wildtyp	C74A	C170A
<i>Grx-System</i>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	0.837	0.861	0.897
	$V_{\max}$ (U/mg)	$0.0314 \pm 0.002$	$0.0258 \pm 0.0028$	$0.0329 \pm 0.0041$
	$k_{\text{cat}} / K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$1.45 \times 10^4$	$1.16 \times 10^4$	$1.42 \times 10^4$
<i>Trx-System</i>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	22.5	24.5	40-187
	$V_{\max}$ (U/mg)	$1.91 \pm 0.28$	$1.62 \pm 0.2$	$0.26 \pm 0.03$
	$k_{\text{cat}} / K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$3.29 \times 10^4$	$2.56 \times 10^4$	$0.53\text{--}3.51 \times 10^3$

**Tabelle 4.3.** Vergleich der kinetischen Parameter für WT-TPx1 und Mutanten.

Die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen, dass das Cystein um Position 74 für die Grx-abhängige Aktivität nicht unbedingt notwendig ist. Zwar ist diese Aminosäure auch hier förderlich, der Aktivitätsverlust durch den entsprechenden Alanin-Austausch ist jedoch deutlich geringer (18%) als bei PtGrxPx. Ein weiterer Unterschied ergibt sich daraus, dass auch der PfTPx1-WT mit Grx aktiv ist im Gegensatz zu hPrxV und der V152C-Mutante von Pt. Es stellt sich allerdings die Frage, ob der Vergleich mit diesen Proteinen legitim ist, da sich die Positionen des C-terminalen Cysteins doch deutlich unterscheiden. Der Wegfall des C170 in PfTPx1 hat auf die Grx-abhängige Aktivität keinen Einfluss.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass zumindest einige der klassischen 2-Cys-Prx und vielleicht auch der 1-Cys-Enzyme ebenfalls Grx-abhängige Aktivität zeigen sollten.

Für die Aktivität mit Trx hat das C74 ebenfalls kaum Bedeutung. Die verringerte Affinität der C170A-Mutante hingegen impliziert, dass der Angriff von Trx auf die C50-Sulfensäure (oder ein in der Mutante gebildetes Disulfid-Intermediat) weniger effektiv geschieht als auf das C50-C170'-Disulfid. Die geringere Aktivität deutet ferner darauf hin, dass auch die Auflösung des Trx-Prx-Disulfides (oder des intramolekularen Prx-Disulfides) nur schlecht möglich ist. Nichtsdestotrotz ist das C170 nicht absolut erforderlich für die Reduktion durch Trx. Es kann somit geschlossen werden, dass die PfTPx1 als typisches 2-Cys-Prx das C-terminale Cystein für optimale Aktivität mit Trx benötigt, jedoch in geringem Maße auch als 1-Cys-Prx fungieren kann.

Die Änderung des Reaktionsmechanismus' wird auch am Verhalten in der SDS-Gelelektrophorese deutlich: Das WT-Enzym ebenso wie die C74A-Form liegen unter reduzierenden Bedingungen als Monomer vor, unter nicht-reduzierenden dagegen als Dimer. Dies passt zu dem allgemein akzeptierten katalytischen Zyklus, der nach Oxidation des Enzyms die Dimerbildung über antiparallele Verbrückung (C50 – C170') vorsieht (Chae *et al.*, 1994; Montemartini *et al.*, 1999). Bei der C170A-Mutante dagegen fehlt die Disulfidbildung, was vermuten lässt, dass C74' nicht als *resolving cysteine* dienen kann (es sei denn, es würde in diesem Fall ein intramolekulares Disulfid gebildet, einem atypischen 2-Cys-Mechanismus entsprechend). Um den genauen Ausweichmechanismus festlegen zu können, wäre die Untersuchung der Doppelmutante notwendig.

### 4.5.3 Oligomere der TPx1

Bezüglich der Oligomerisierung der PFTP<sub>x</sub>1 hatten Akerman und Müller in der Gelfiltration unter Anwesenheit von 1 mM DTT einen Peak entsprechend dem Dekamer (250 kDa) gefunden; dagegen eluierte ohne DTT ein Peak von 400 kDa (2003). Aus der entsprechenden Studie geht jedoch nicht hervor, unter welchen sonstigen Bedingungen die Gelfiltration durchgeführt wurde, obwohl pH-Wert, Salz- und Proteinkonzentration und andere Faktoren erheblichen Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten haben. Mono- und Dimere wurden nur in denaturierender SDS-PAGE erhalten (Akerman und Müller, 2003); PFTP<sub>x</sub>1 bildet demnach, wie verschiedene andere Prx, Dekamere durch nicht-kovalente Assoziation von Dimeren.

Die Interpretation der hier erhaltenen FPLC-Resultate fällt schwer, da die erhaltenen Molekulargewichte nicht eindeutig einer Oligomerisierungsform zuzuordnen sind. Es wäre jedoch denkbar, dass es sich bei den Molekulargewichten zwischen 129.7 und 166.8 kDa stets um das Dekamer handelt, wobei sich bei beiden Formen – WT und C170A – die Tendenz abzeichnet, dass sich das „Dekameraggregat“ unter oxidierenden Bedingungen „größer“ verhält. Das jeweils höchste beobachtete Molekulargewicht einer Form tritt mit der GSSG-inkubierten Probe auf. Die unzureichende Genauigkeit bei der Bestimmung der Oligomer-Stöchiometrie könnte auf Wechselwirkungen des Komplexes mit der Säulenmatrix und dadurch verursachte Dissoziation einzelner Untereinheiten zurückführbar sein. Prinzipiell kommt auch eine nicht-globuläre Proteinoberfläche zur Erklärung in Betracht, da die Eichung mit globulären Proteinen vorgenommen wurde. Da das „Dekamer“ später eluiert als erwartet, müsste die Oberfläche allerdings geringer sein als für ein globuläres Aggregat antizipiert, was unwahrscheinlich ist.

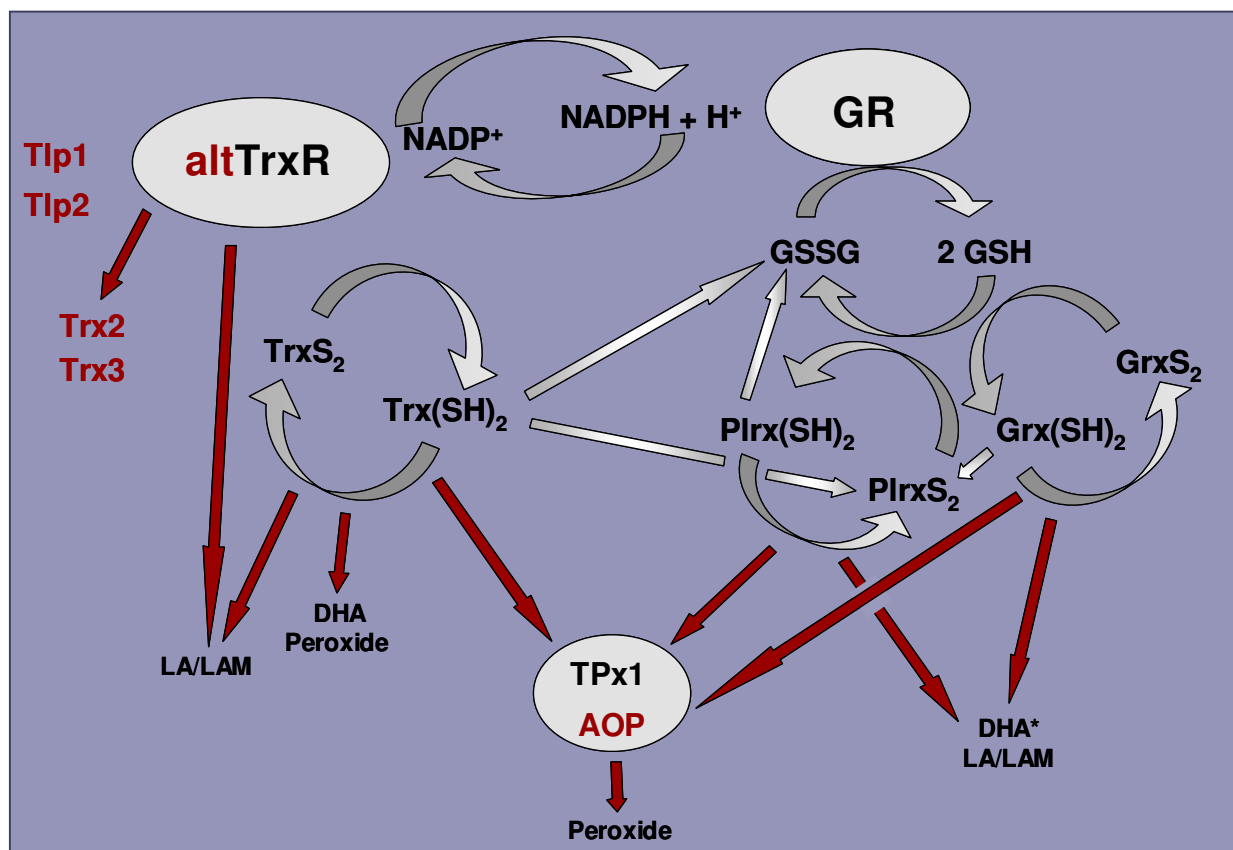
Eine Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen von Dimeren unter oxidierenden Bedingungen liegt in der hohen verwendeten Proteinkonzentration: Im Falle von kristallisiertem AhpC wurde die hohe Konzentration dafür verantwortlich gemacht, dass unter oxidierenden Bedingungen trotz erfolgter Disulfidbildung das Dekamer erhalten blieb (Wood *et al.*, 2000). Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass in Anwesenheit von GSSG, welches die Bildung von Disulfidbrücken durch die Glutathionylierung unterbinden sollte, dennoch das „Dekamer“ erhalten wird. Man kann spekulieren, dass die leichte scheinbare Erhöhung des Molekulargewichts unter oxidierenden Bedingungen und besonders in Anwesenheit von GSSG dadurch verursacht ist, dass die Wechselwirkungen an der Dimer-Dimer-Interface geschwächt sind. Durch diese Lockerung der Dekamerstruktur könnte die Kompaktheit des Aggregates herabgesetzt sein.

Die stets etwas höheren Molekulargewichte der C170A-TP<sub>x</sub>, verglichen mit dem WT, passen zu der beobachteten Instabilität des mutierten Enzyms: Es scheint sich nicht so kompakt falten zu können wie das Protein mit nativer Sequenz, was die Löslichkeit beeinflussen kann. Dass bei der C170A-Mutante, die offensichtlich kein intermolekulares Disulfid mehr bilden kann, unter oxidierenden Bedingungen eine zusätzliche Aggregationsform auftritt (251.4 kDa entsprechend 10.8 Molekülen ohne DTT), ist bemerkenswert. Ob dies mit einer Überoxidation der Sulfensäure des peroxidativen Cysteins zur Sulfin-/Sulfonsäure zusammenhängen kann, vor der es ja durch das Wegfallen der Disulfidbildung nicht mehr

geschützt ist, bleibt in diesem Rahmen reine Spekulation. Eine solche Überoxidation begünstigt auch die Bildung von Dekamerstapeln (Kato *et al.*, 1985), was möglicherweise das Multimer im Ausschlussvolumen (C170A) bzw. entsprechend 16 Molekülen (WT) erklären könnte.

Interessanterweise erhielten Budde *et al.* bei der Gelfiltration oxidiertes TbTXNPx ein Elutionsprofil, das dem der oxidierten TPx1C170A stark ähnelt: Zunächst erschien ein Peak im Ausschlussvolumen, gefolgt von einer kleinen Schulter und einem starken Peak mit ähnlichem Mw wie dem des reduzierten Enzyms (2003). Hier wurde per Elektronenmikroskopie gezeigt, dass es sich bei dem ersten Peak um stark aggregiertes Material ohne erkennbare Strukturen handelte. Die Schulter dagegen enthielt Cluster der im letzten Peak detektierten Strukturen. Die Autoren weisen auch auf die Tendenz des oxidierten Enzyms hin, höhere als Dekamer-Aggregate zu bilden (Budde *et al.*, 2003).

Zusammenfassend kann durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine und Interaktionen das Schema in Abb. 1.5 wie folgt ausgeweitet werden:



**Abb. 4.5.** Erweitertes Trx- und GSH-System von *Plasmodium falciparum*.

\*DHA kann auch durch TPx1 reduziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Proteine und Interaktionen sind rot dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Pf-Peroxiredoxine TPx2, 1-Cys-Prx und TPx<sub>GI</sub>, die *Glutaredoxin-like-proteins* Glp1-3, ferner die Verbindungen zu Glutathion-S-Transferase, Glyoxalasen und Ribonukleotidreduktase nicht eingezeichnet.

## 4.6 Hemmung von Pf-Enzymen durch Ferriprotoporphyrin IX

Der reife Erythrozyt enthält 310-350 mg/ml Hb, was eine Konzentration von 20 mM bedeutet (Loria *et al.*, 1999). Da während des intraerythrozytären Zyklus von Pf 80% des Wirts-Hb, entsprechend ca. 16 mM (Mashima *et al.*, 2002; Ginsburg, 2003) verdaut werden, entsteht dabei nicht nur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in äquimolarem Verhältnis, sondern ebenso viel freies Ferriprotoporphyrin IX (FP; FPIX). Aufgrund des Volumenanteils der FV von 3-5% an dem des infizierten Erythrozyten könnte bei Akkumulation des freigesetzten Häms dessen Konzentration in der FV auf 0.5 M ansteigen (Loria *et al.*, 1999). Die wachsende FP-Konzentration steigert den oxidativen Stress auf verschiedene Weisen: Neben dem erwähnten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und der Redoxaktivität des FP entsteht oxidativer Stress auch durch den GSH-abhängigen Abbau, da GSH verbraucht, jedoch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und freies Eisen produziert wird (Atamna und Ginsburg, 1995). Die Hemmung verschiedener Erythrozyten-Enzyme durch FP ist seit längerem beschrieben: Zerez *et al.* (1987) beobachteten u. a. eine Einschränkung der Aktivität des glycolytischen Schlüsselenzyms Aldolase und der 6-Phosphogluconat-DH, welche im Hexosemonophosphatweg ebenfalls eine Schlüsselfunktion hat.

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Leann Tilley (Dpt. Biochemistry and Co-operative Research Centre for Diagnostics, LaTrobe University, Melbourne, Australia) waren mittels FP-Agarose-Perlen verschiedene Parasitenenzyme als Kandidaten für eine FP-Bindung identifiziert worden, darunter auch die Glutathionreduktase (Campanale *et al.*, 2003). Dies diente als Anlass, den Einfluss von FP auf die Aktivität antioxidativer Enzyme zu untersuchen, da gerade für diese Proteine hinsichtlich der FP-Toxizität eine wichtige Rolle zu vermuten ist.

Die Glutathionreduktase von Pf erwies sich, verglichen mit dem humanen und dem Hefe-Homolog, als relativ resistent. Es konnte zwar eine Hemmung beobachtet werden, diese machte aber bei Verwendung von 25 µM FP nur etwa 20% aus. Eine zeitabhängige Verstärkung des Effektes konnte anhand von Kontrollen auf die destabilisierende Wirkung von NADPH zurückgeführt werden, die im Falle des plasmodialen Enzyms besonders ausgeprägt ist.

Gemeinsames Merkmal der über immobilisiertes FP isolierten Enzymproteine ist die Anwesenheit von einem oder mehreren Cystein-Resten im aktiven Zentrum, deren Essentialität für die Enzymaktivität entweder bereits nachgewiesen oder zumindest vermutet wurde (u. a. Padgett und Whorton, 1997; Eggleston *et al.*, 1999). Da FP nachgewiesenermaßen Thioetherbrücken mit Cysteinresten bildet (Hahn *et al.*, 1982), liegt die Vermutung nahe, dass zumindest einige der festgestellten FP-Protein-Interaktionen über die Cysteinreste zustande kamen. Dies lieferte den Grund, weitere Enzyme des parasitären antioxidativen Systems auf eine Interaktion mit FP zu untersuchen, basieren doch die durch TrxR und Grx katalysierten Reaktionen ebenfalls auf deren *active site*-Cysteinen.

Die PfTrxR erwies sich als sehr sensitiv gegenüber FP. Bereits 1.25 µM verringerten die Aktivität um 50%. Versuche, den Hemmtyp zu bestimmen, zeigten die Existenz sowohl einer kompetitiven ( $K_i \sim 1 \mu\text{M}$ ) als auch einer kovalenten Komponente. Mit Grx ist ein weiteres antioxidatives Enzym durch FP hemmbar, allerdings mit moderater Empfindlichkeit ( $\text{IC}_{50} \sim 10 \mu\text{M}$ ).

Im Labor der Kooperationspartner wurde eine besonders starke Hemmung durch FP außerdem für das glycolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) des Parasiten festgestellt ( $IC_{50} \sim 0.4 \mu M$ ;  $K_i = 0.2 \mu M$ ). Dagegen erwies sich das Wirtshomolog als wesentlich unempfindlicher (Campanale *et al.*, 2003).

Aufgrund der erhaltenen Daten liegt die Vermutung nahe, dass die Glycolyse von *Plasmodium* bereits durch gering gestiegene FP-Konzentrationen gehemmt wird, was den Zweck haben könnte, einen größeren Teil der Glucose in den Hexosemonophosphatweg einzuschleusen, um dem erhöhten Bedarf an Reduktionsäquivalenten für die antioxidative Verteidigung nachzukommen (Abb. 4.6). Zu dieser Argumentation passt auch die relative Unempfindlichkeit der GR, da diese zur Aufrechterhaltung der GSH-Level benötigt wird, mit Hilfe derer das entstandene FP sowohl direkt (GSH-abhängige FP-Degradation) entgiftet werden kann als auch Folgen der erhöhten FP-Konzentration beseitigt werden können (GSH als Elektronendonator für antioxidative Enzyme).

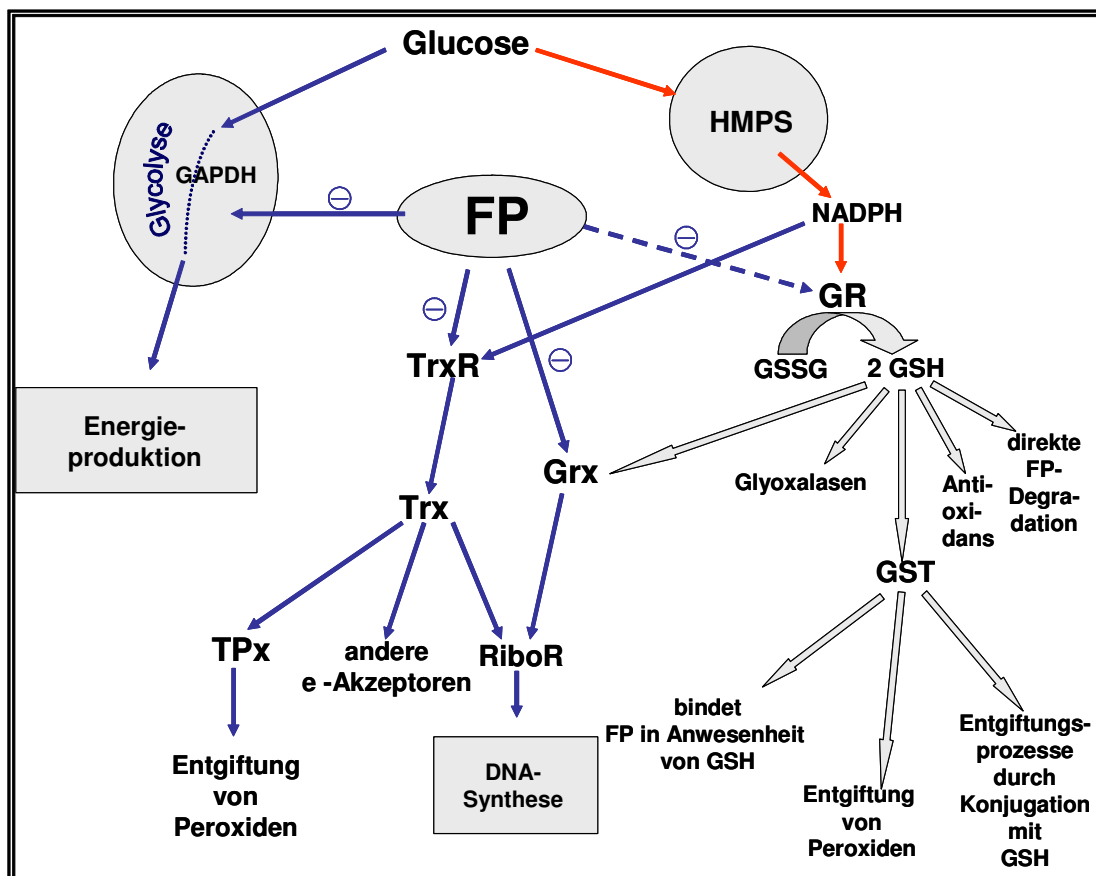


Abb. 4.6. Beeinflussung von Pf-Enzymen durch FP im metabolischen Zusammenhang.

Blau dargestellt sind die durch FP relativ stark gehemmten Prozesse. Die unter mäßigen FP-Konzentrationen relativ stabile Elektronenversorgung der GR ist rot gekennzeichnet.

Die parallel zu diesen Ergebnissen publizierten Beobachtungen von Famin und Ginsburg, denen zufolge auch das HMPS-Enzym 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) durch FP gehemmt wird, was frühere Ergebnisse von Zerez *et al.*, (1987) bestätigt, stehen insofern nicht in Widerspruch zu den hier dargestellten, dass der  $IC_{50}$  mit  $5 \mu M$  fast um Faktor 10 höher ist als der für GAPDH. Die Inhibierung der Glycolyse könnte also ein Regulations-element des Parasiten darstellen um mit leicht gestiegenen FP-Konzentrationen fertig zu werden, während die Hemmung des HMPS bereits zu den toxischen Effekten weiter

angewachsener FP-Level gehört. Es ist außerdem zu erwähnen, dass noch kein  $IC_{50}$  für die 6-PGDH des Parasiten bekannt ist, deren Sensitivität sich möglicherweise von denen des erythrozytären und des kommerziell erhältlichen Enzyms unterscheidet.

Das Trx-System wäre aufgrund der hohen Empfindlichkeit der TrxR schon relativ bald von steigenden FP-Konzentrationen betroffen. Da auch Grx gehemmt wird, sind zwei Elektronenzuflüsse für die Ribonukleotidreduktase eingeschränkt, was womöglich in eingeschränkter DNA-Synthese resultiert.

Um den derzeitigen Kenntnisstand der Einflussnahme von FP auf antioxidative Pf-Enzyme zu vervollständigen, muss noch die berichtete Hemmung der Glutathion-S-Transferase durch FP Erwähnung finden. Für die GST, die u. a. zur Entgiftung von Lipidperoxidations-Produkten beiträgt, wurde ein unkompetitiver Hemmungsmechanismus durch FP festgestellt ( $K_i = 6.5 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50} = 4 \mu\text{M}$ ). Das führte, zusammen mit der berechneten hohen Konzentration des Enzyms ( $>100 \mu\text{M}$ ), zu der Vermutung, dass das Enzym möglicherweise eine Art Pufferfunktion für FP ausübt (Harwaldt *et al.*, 2002). Auch diese Annahme passt in die hier dargestellte Hypothese, dass das GR-System des Parasiten in der Anfangsphase des Hämoglobin-Verdau ein wichtiges Instrument zur Bekämpfung der toxischen FP-Effekte sein könnte.

Zur Beurteilung der physiologischen Relevanz genannter Überlegungen wäre die Kenntnis der tatsächlichen FP-Konzentration im Parasiten-Cytosol während des intraerythrozytären Zyklus nötig. Leider existieren dazu kaum Hinweise in der Literatur. Famin und Ginsburg fanden in Chloroquin-behandelten Parasiten im Trophozoiten-Stadium  $165 \mu\text{M}$  proteingebundenes FP, was unter Berücksichtigung der bis dahin verdauten und nicht polymerisierten Mengen an Hämoglobin bzw. Häm ( $4 \text{ mM}$ ) bereits ein recht kleiner Anteil ist. In nicht-behandelten Parasiten konnte überhaupt keine FP-Protein-Bindung festgestellt werden (Famin und Ginsburg, 2003). In einer früheren Studie dieser Autoren war ebenfalls kein freies Häm in infizierten Erythrozyten messbar gewesen (Ginsburg *et al.*, 1998). Diese Daten lassen zumindest die Möglichkeit einer *in vivo*-Bedeutung der hier gemessenen Hemmungsparameter offen, und auch die Feststellung, dass bereits  $6 \mu\text{M}$  freies FP die komplette Lyse von Erythrozyten bewirken können (Chou und Fitch, 1980), sprechen dafür, dass die hier beschriebenen Konzentrationsbereiche realistisch sind.

Schließlich wurde im Zusammenhang der Messungen mit FP noch die Interaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  untersucht. FP ist die prosthetische Gruppe verschiedener Peroxidasen, und auch der Abbau von Lipidhydroperoxiden (Dix und Marnett, 1985, Mashima *et al.*, 2002) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ribeiro *et al.*, 1997) durch chemische Interaktion mit freiem FP ist in der Literatur beschrieben. Diese Reaktion ist jedoch begleitet von der FP-Degradation (Ribeiro *et al.*, 1997). Es wurde mehrfach beobachtet, dass Antimalaria-Wirkstoffe wie Chloroquin die Katalase- und Peroxidase-ähnlichen Eigenschaften von FP, gleichzeitig aber auch den FP-Abbau hemmen (Loria *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1997). Die Bindung von FP an PfHRP2 verringert ebenfalls die Hydroperoxid-Zersetzung (Mashima *et al.*, 2002). Da jedoch das Ausmass an heterolytischer Peroxidspaltung im Vergleich zum homolytischen Abbau steigt, d. h. die Hydroxylradikalbildung vermindert wird, werten die Autoren dieses Verhalten des Komplexes als antioxidativ.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Interaktionstests mit FPIX und  $\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt und der Abbau von FPIX bei 340 nm beobachtet (in der Literatur wird dies bei 360 nm gemessen (Loria *et al.*, 1999), bei 340 nm ist die Dekomposition aber auch gut erkennbar (Abb. 8 in Ribeiro *et al.*, 1997). Die überproportionale Verstärkung der peroxidabhängigen FPIX-Degradation durch NADPH bleibt eine Erklärung schuldig. Die festgestellte Abschwächung der Interaktion  $\text{FP} \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  durch die Anwesenheit von Trx (und TrxR) könnte jedoch ebenfalls mit einer Komplexierung des FP zu erklären sein. Ob diese Interaktion lediglich einer Pufferfunktion des Trx für FP gleichkommt, oder ob durch die Komplexbildung auch der Mechanismus der Peroxiddegradation verändert wird, wie mit HRP2 der Fall, kann noch nicht gesagt werden. Ferner muss berücksichtigt werden, dass das heterolog exprimierte Trx mit dem 6xHis-tag einen *His-repeat* besitzt, der in diesem Fall einen Einfluss haben könnte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch Trx eine Modulation der Redoxaktivität von FPIX bewirken kann. Eine solche Wirkung wäre dann auch für die anderen Proteine, deren Interaktion mit FPIX hier gezeigt wurde, möglich.

## 5 Zusammenfassung

Aufgrund zunehmender Verbreitung der Erreger und wachsender Resistenzen werden neue Medikamente gegen Malaria dringend benötigt. Der Erreger der tropischen Malaria, *Plasmodium falciparum*, ist während seiner Vermehrung in menschlichen Erythrozyten einer enormen oxidativen Belastung ausgesetzt. Aufgrund dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das antioxidative System des Parasiten untersucht, dessen Bestandteile als Zielmoleküle für die rationale Medikamentenentwicklung von Bedeutung sind. Da Katalase und Glutathionperoxidase in *Plasmodium* fehlen, spielen die auf den NADPH-abhängigen Flavoenzymen Thioredoxinreduktase (TrxR) und Glutathionreduktase (GR) basierenden Systeme eine besondere Rolle. Hier konnte eine alternative Spleissvariante der TrxR-mRNA identifiziert werden, die analog zu den humanen Formen, Regulations- oder Targetingfunktion haben könnte. Die herkömmliche TrxR-Form und das bislang bekannte Thioredoxin (Trx) wurden zwecks Kristallisierung ohne His-tag kloniert, exprimiert und gereinigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Proteine mit Trx-Aktivität (Trx2 und 3) und zwei weitere Trx-ähnliche Proteine (Tlp1 und 2) identifiziert, kloniert und exprimiert werden. Das Tlp1 reguliert wahrscheinlich als Bestandteil des Dyneinmoleküls die ATPase-Aktivität dieses Proteinmultimers und ist somit für den intrazellulären Transport von Bedeutung. Tlp2 besitzt das *active site*-Motiv CPAC und ist evtl. membranständig oder im Mitochondrium lokalisiert. Die beiden neu identifizierten Trx-Proteine Trx2 und Trx3 sind Substrate der TrxR und werden aktuellen Vorhersagen zufolge in den Apicoplasten transferiert.

Für die bislang als klassische Thioredoxinperoxidase bekannte PfTPx1 wurde im Rahmen dieser Arbeit Aktivität mit Glutaredoxin (Grx) gezeigt. Zwar ist die Aktivität signifikant geringer als mit Trx, die Affinität zu Grx ist jedoch bedeutend höher. Bezüglich des Reaktionsmechanismus' konnte anhand von Cystein-Alanin-Austausch-Mutanten (C74A, C170A) ein Hinweis geliefert werden, dass das peroxidative Cystein (C50) für die Grx-abhängige Aktivität ausreicht ( $K_M$  unverändert;  $V_{max}$  nur wenig geringer als beim Wildtyp). Die Aktivität mit Trx zeigte sich deutlich abhängig von der Existenz des C170. Da eine geringe Restaktivität zu verzeichnen ist, kann postuliert werden, dass TPx1C170A mit Trx nach einem 1-Cys-Mechanismus reagieren kann.

Ebenfalls mit beiden Thiolproteinen aktiv ist das hier neu identifizierte Antioxidative Protein (AOP), ein Peroxiredoxin vom TypV. Die biochemische Untersuchung ergab nur schwache Reduktion von  $H_2O_2$ , stattdessen Präferenz für tert-Butylhydroperoxid und Phosphatidylcholinhydroperoxid. Damit stellt AOP die erste Pf-Peroxidase zur Entgiftung von Lipidhydroperoxiden dar. Aufgrund der hohen Membranlipid-Syntheseleistung des Parasiten kann einer solchen Funktion große Bedeutung beigemessen werden. Im Gegensatz zu TPx1 ist im Fall von AOP die Grx-abhängige Aktivität stärker als die mit Trx1. Die Affinität ist dagegen für beide Donoren ähnlich. Besonderes Interesse galt der subzellulären Lokalisation des AOP. Aufgrund von *in silico*-Vorhersagen war das Targeting zum Apicoplasten wahrscheinlich, die Kopplung der *leader*-Sequenz an GFP und Transfektion von *Toxoplasma gondii* zeigte jedoch eine ER-Lokalisation in diesem Organismus. Im Rahmen



dieser Arbeit gelang es, röntgentaugliche Kristalle von PfAOP zu züchten. Die durchgeführte Röntgenstrukturanalyse bestätigt Ergebnisse der DTNB-Titration, die indizierten, dass AOP mechanistisch ein 1-Cys-Prx darstellt. Das Protein liegt nativ als nicht-kovalentes Dimer mit einer *interface* vom A-Typ vor. Anhand von Vergleichen mit anderen Prx-Strukturen kann ein charakteristischer *Prx-fold* beschrieben werden. Hochkonservierte AS-Reste, welche die *active site* bilden, finden sich auch in AOP.

Diese Arbeit beinhaltet zudem zahlreiche Interaktionstests bekannter Pf-Proteine untereinander und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ascorbat und Liponsäure. So konnte gezeigt werden, dass Plasmoredoxin, ein für *Plasmodium* spezifisches Redoxprotein, sowohl TPx1 als auch AOP und Dehydroascorbat reduzieren kann. Auch Trx1, Grx und TPx1 sind zur DHA-Reduktion in der Lage, während AOP keine Aktivität zeigte. Wasserstoffperoxid wird von Trx1 umgesetzt, jedoch nicht von Grx. Beide Thiolproteine sind in der Lage, Liponsäure bzw. Liponamid zu reduzieren. PfTrxR zeigt ebenfalls schwache LA-/LAM-Reduktase-Aktivität; diese Eigenschaft ist demnach nicht zwingend an ein Selenocystein gebunden. Die *in vivo*-Relevanz dieser Interaktionen ist aus verschiedenen Gründen wahrscheinlich.

Schließlich wurde eine mögliche Hemmung von TrxR, Grx und GR durch Ferriprotoporphyrin IX (FP), einem Produkt des parasitären Hämoglobinabbaus getestet. Für alle drei Proteine war eine Inhibition festzustellen. Da die Empfindlichkeit der PfGR jedoch deutlich geringer war als die der vergleichend untersuchten humanen bzw. Hefe-GR und auch des glycolytischen Schlüsselenzyms Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase wird postuliert, dass bei beginnender FP-Toxizität zunächst die Glycolyse gedrosselt wird, um Glucose in den Hexosemonophosphatweg zu schleusen und somit NADPH zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies verfügbar zu machen.

Eine Hemmung der TrxR konnte auch für einige putativ inhibitorische Verbindungen bestätigt werden, wobei sich z.T. IC<sub>50</sub>-Werte im unteren mikromolaren Bereich ergaben. An *Plasmodium*-Kulturen wurden diese Hemmeffekte für drei Substanzen bestätigt. In Anbetracht der im Vergleich beobachteten überwiegend geringeren Hemmung der humanen TrxR sind diese Werte vielversprechend.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit das Verständnis des komplexen Redoxsystems von Malariaparasiten vergrößert werden. Es wurde ein Beitrag zur Strukturaufklärung möglicher Zielmoleküle der Medikamentenentwicklung geleistet, und verschiedene Inhibitorverbindungen wurden charakterisiert. Der Kenntnis des Wirkmodus' gängiger Antimalaria-Substanzen wie Chloroquin, die die Steigerung der FP-Toxizität beinhaltet, wurden durch die hier erzielten Resultate neue Aspekte hinzugefügt.

## 6 Literatur

### 6.1 Literaturverzeichnis

Aft RL, Mueller GC (1985) Degradation and covalent cross-linking of glutathione reductase by hemin. *Life Sci.* 36, 2153-2161

Akerman SE, Müller S (2003) 2-Cys peroxiredoxin PfTrx-Px1 is involved in the antioxidant defence of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 75-81

Alphey MS, Bond CS, Tetaud E, Fairlamb AH, Hunter WN (2000) The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J. Mol. Biol.* 300, 903-916

Alphey MS, Gabrielsen M, Micossi E, Leonard GA, McSweeney SM, Ravelli RBG, Tetaud E, Fairlamb AH, Bond CS, Hunter WN (2003) Trypanothione peroxidases from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 278, 25919-25925

Andreesen JR, Wagner M, Sonntag D, Kohlstock M, Harms C, Gursinsky T, Jäger J, Parther T, Kabisch U, Gräntzdörffer A, Pich A, Sohling B (1999) Various functions of selenols and thiols in anaerobic gram-positive, amino acids-utilizing bacteria. *Biofactors* 10, 263-270

Arnér ESJ, Nordberg J, Holmgren A (1996) Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 268-274

Arcott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K (1997) The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3621-3626

Atamna H, Ginsburg H (1995) Heme degradation in the presence of glutathione. *J. Biol. Chem.* 270, 24876-24883

Baca AM und Hol WG (2000) Overcoming codon bias: A method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *Int. J. Parasitol.* 30, 113-118

Baier M, Dietz K-J (1997) The plant 2-cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: Its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J.* 12, 179-190

Baker LMS, Poole LB (2003) Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 9203-9211

Baker LM, Raudonikiene A, Hoffman PS, Poole LB (2001) Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: Genetic and kinetic characterization. *J. Bacteriol.* 183, 1961-1973

Banhegyi G, Csala M, Szarka A, Varsanyik M, Benedetti A, Mandl J (2003) Role of ascorbate in oxidative protein folding. *Biofactors* 17, 37-46

Bauer H, Gromer S, Urbani A, Schnolzer M, Schirmer RH, Muller HM (2003) Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Eur. J. Biochem.* 270, 4272-4281

- Bauer H, Kanzok SM, Schirmer RH (2002) Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 277, 17457-17463
- Baunaure F, Eldin P, Cathiard A-M, Vial H (2004) Characterization of a non-mitochondrial type I phosphatidylserine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 51, 33-46
- Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Müller S (2000) Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur. J. Biochem.* 267, 6118-6125
- Becker K, Herold-Mende C, Park JJ, Lowe G, Schirmer RH (2001) Human thioredoxin reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2''-Terpyridine)platinum(II) complexes. Possible implication for a novel antitumor strategy. *J. Med. Chem.* 44, 2784-2792
- Becker K, Kanzok SM, Iozef R, Fischer M, Schirmer RH, Rahlfs S (2003) Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites. *Eur. J. Biochem.* 270, 1057-1064
- Becker K, Kirk K (2004) Of malaria, metabolism and membrane transport. *Trends Parasitol.* 20, 590-596
- Becker K, Savvides SN, Keese M, Schirmer RH, Karplus, PA (1998) Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nat. Struct. Biol.* 5, 267-271
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: Host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 34, 163-189
- Beckers CJM, Roos DS, Donald RGK, Luft BJ, Schwab JC, Joiner KA (1995) Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii*. Implications for the target of macrolide antibiotics. *J. Clin. Invest.* 95, 367-376
- Biot C, Dessolin J, Grellier P, Davioud-Charvet E (2003) Drug development against antioxidant enzymes from *Plasmodium falciparum*. *Redox Report* 8, 280-283
- Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue S, Holmgren A (1995) Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J. Biol. Chem.* 270, 11761-11764
- Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 29382-29384
- Blée E, Joyard J (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110, 445-454
- Bodenstein J, Follman H (1990) Characterization of two thioredoxins in pig heart including a new mitochondrial protein. *Z. Naturforsch.* 46c, 270-279
- Boniface JJ, Reichert LE Jr. (1990) Evidence for a novel thioredoxin-like catalytic property of gonadotropic hormones. *Science* 247, 61-64
- Bozdech Z, Ginsburg H (2003) Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum* – data mining of the transcriptome. *Malaria Journal* 3:23

- Brandt W, Wessjohann LA (2005) The functional role of selenocysteine (Sec) in the catalysis mechanism of large thioredoxin reductases: Proposition of a swapping catalytic triad including a Sec-His-Glu state. *Chembiochem*. [Epub ahead of print]
- Bréhélin C, Meyer EH, De Souris J-P, Bonnard G, Meyer Y (2003) Resemblance and dissemblance of *Arabidopsis* type II peroxiredoxins: Similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiol*. 132, 2045-2057
- Brill AS (1966) Peroxidase and Catalase. In: *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 14, M. Florkin and E. H. Stotz, ed. (Amsterdam, London, New York: Elsevier), pp. 447-479
- Brodsky JL, McCracken AA (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Cell Develop. Biol*. 10, 507-513
- Browne P, Shalev O, Hebbel RP (1998) The molecular pathobiology of cell membrane iron: The sickle red cell as a model. *Free Radic. Biol. Med*. 24, 1040-1048
- Bryk R, Griffin P, Nathan C (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211-215
- Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 295, 1073-1077
- Budde H, Flohé L, Hecht H-J, Hofmann B, Stehr M, Wissing J, Lünsdorf H (2003) Kinetics and redoxsensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in trypanredoxin peroxidase of *Typanosoma brucei brucei*. *Biol. Chem*. 384, 619-633
- Bullock WJF und Short J (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Tech*. 5, 376-378
- Bunik V (2003) 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. *Eur. J. Biochem*. 270, 1036-1042
- Bushweller JH, Aslund F, Wuthrich K, Holmgren A (1992) Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochem*. 31, 9288-9293
- Campanale N, Nickel C, Daubenberger CA, Wehlan DA, Gorman JJ, Klonis N, Becker K, Tilley L (2003) Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem*. 278, 27354-27361
- Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massignan T, Salmona M, Chang G, Holmgren A, Ghezzi P (2002) Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 99, 9745-9749
- Cavalier-Smith T (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev*. 57, 953-994
- Cavalier-Smith T (2000) Membran heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci*. 5, 174-182
- Cha MK, Kim HK, Kim IH (1995) Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 270, 28635-28641

- Cha M-K, Yun CH, Kim IH (2000) Interactions of human thiol-specific antioxidant protein 1 with erythrocyte plasma membrane. *Biochemistry* 39, 6944-6950
- Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 27670-27678
- Chae HZ, Kim IH, Kim K, Rhee SG (1993) Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 16815-16821
- Chauhan R, Mande SC (2001) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. *Biochem. J.* 354, 209-215
- Cheresh P, Harrison T, Fujioka H, Haldar K (2002) Targeting the malarial plastid via the parasitoporous vacuole. *J. Biol. Chem.* 277, 16265-16277
- Chew O, Whelan J, Millar AH (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 46869-46877
- Choi YO, Cheong NE, Kyun OL, Jung BG, Hong CH, Jeong JH, Chi YH, Kim K, Cho MJ, Lee SY (1999) Cloning and expression of a new isotype of the peroxiredoxin gene of chinese cabbage and its comparison to 2Cys-peroxiredoxin isolated from the same plant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 768-771
- Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 5, 400-406
- Chou AC, Fitch CD (1980) Hemolysis of mouse erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX and chloroquine. Chemotherapeutic implications. *J. Clin. Invest.* 66, 856-858
- Chou AC, Fitch CD (1981) Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *J. Clin. Invest.* 68, 672-677
- Claiborne A, Yeh JI, Mallett TC, Luba J, Crane EJ, III, Charrier V, Parsonage D (1999) Protein-sulfenic acids: Diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* 38, 15407-15416
- Clark D, Albrecht M, Arévalo J (1994) Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 143-145
- Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252, 1102-1106
- Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP (1973) Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am. J. Med. Sci.* 266, 169-177
- Collinson EJ, Wheeler GL, Garrido EO, Avery AM, Avery SV, Gran CM (2002) The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* 277, 16712-16717
- Constantinescu A, Pick U, Handelsmann GJ, Haramaki N, Han D, Podda M, Tritschler H, Packer L (1995) Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 50, 253-261

- Cooke BM, Lingelbach K, Bannister LH, Tilley L (2004) Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol.* 20, 581-589
- Cortes GT, Winograd E, Wiser MF (2003) Characterization of proteins localized to a subcellular compartment associated with an alternate secretory pathway of the malaria parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 127-135
- Cunnea PM, Miranda-Vizuete A, Bertoli G, Simmen T, Dandimopoulos AE, Hermann S, Leinonen S, Huikko MP, Gustafsson JA, Sitia R, Spyrou G (2003) ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *J. Biol. Chem.* 278, 1059-1066
- Cussiol JRR, Alves SV, De Oliveira MA, Netto LES (2003) Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* 278, 11570-11578
- Dandimopoulos AE, Miranda-Vizuete A, Treuter E, Gustafsson JA, Spyrou G (2004) An alternative splicing variant of the selenoprotein thioredoxin reductase is a modulator of estrogen signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 38721-38729
- Das KC, Das CK (2000) Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: Redox independent functions. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 277, 443-447
- Das AK, Hummel BC, Gleason FK, Holmgren A, Walfish PG (1988) Bacterial and mammalian thioredoxin systems activate iodothyronine 5'-deiodination. *Biochem. Cell Biol.* 66, 460-464
- Davioud-Charvet E, McLeish MJ, Veine DM, Giegel D, Arscott LD, Andricopulo AD, Becker K, Müller S, Schirmer RH, Williams Jr CH, Kenyon GL (2003) Mechanism-based inactivation of thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum* by Mannich Bases. Implication for cytotoxicity. *Biochemistry* 42, 13319-13330
- Declercq J-P, Evrard C, Clippe A, Vander Stricht D, Bernard A, Knoops B (2001) Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 311, 751-759
- Delbac F, Sanger A, Neuhaus EM, Stratmann R, Ajioka JW, Toursel C, Herm-Gotz A, Tomavo S, Soldati T, Soldati D (2001) *Toxoplasma gondii* myosins B/C: One gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell. Biol.* 155, 613-623
- Del Bello B, Maellaro E, Sugherini L, Santucci A, Comporti M, Casini AF (1994) Purification of NADPH-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver and its identification with 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. J.* 304, 385-390
- Deponte M, Becker K (2004) *Plasmodium falciparum* -do killers commit suicide? *Trends Parasitol.* 20, 165-169
- Deponte M, Becker K, Rahlfs S (2005) *Plasmodium falciparum* glutaredoxin-like proteins. In press
- Derocher A, Gilbert B, Feagin JE, Parsons M (2005) Dissection of brefeldin A-sensitive and -insensitive steps in apicoplast protein targeting. *J. Cell Sci.* [Epub ahead of print]
- Dessolin J, Biot C, Davioud-Charvet E (2001) Bromination studies of the 2,3-dimethylnaphthazarin core allowing easy access to naphthazarin derivatives. *J. Org. Chem.* 66, 5616-5619
- Dix TA, Marnett LJ (1985) Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxyhydroxy, and trihydroxy fatty acids by hemoxygenase. *J. Biol. Chem.* 260, 5351-5357

- Docampo R, de Boiso J, Boveris A, Stoppani A (1976) Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. *Experientia* 32, 972-975
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28, 1007-1013
- Echalier A, Corbier C, Rouhier N, Jacquot J-P, Aubry A (2002) Crystallization and preliminary X-ray data of a bifunctional peroxiredoxin from poplar. *Acta Cryst. Section D* 58, 1501-1503
- Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S (2003) Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 424, 957-961
- Egan TJ, Comrinck JM, Egan J, Hearne GR, Marques HM, Ntenti S, Sewell BT, Smith PJ, Taylor D, Van Schalkwyk DA, Walden JC (2002) Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* 365, 343-347
- Egan TJ, Ross DC, Adams PA (1994) Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS Lett.* 352, 54-57
- Eggleston KK, Duffin KL, Goldberg DE (1999) Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 274, 32411-32417
- Ellis HR, Poole LB (1997) Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36, 13349-13356
- Etkin NL (2003) The co-evolution of people, plants, and parasites: Biological and cultural adaptations to malaria. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 311-317
- Evans RM, Currie L, Campbell A (1982) The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals, and its relation to the plasma concentration. *Br. J. Nutr.* 47, 473-482
- Färber PM, Arscott LD, Williams CH Jr., Becker K, Schirmer RH (1998) Recombinant *Plasmodium falciparum* glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Lett.* 422, 311-314
- Färber PM, Becker K, Müller S, Schirmer RH, Franklin RM (1996). Molecular cloning and characterization of a putative glutathione reductase gene, the PfGR2 gene, from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* 239, 655-661
- Famin O, Ginsburg H (2003) The treatment of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes with chloroquine leads to accumulation of ferriprotoporphyrin IX bound to particular parasite proteins and to the inhibition of the parasite's 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Parasite* 10, 39-50
- Famin O, Krugliak M, Ginsburg H (1999) Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of Ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem. Pharmacol.* 58, 59-68
- Fast NM, Kissinger JC, Roos DS, Keeling PJ (2001) Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol. Biol. Evol.* 18, 418-426

- Fernandes AP, Holmgren A (2004) Glutaredoxins: Glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antiox. Redox Signal.* 6, 63-74
- Ferrari DM, Söling H-D (1999) The protein disulfide-isomerase family: Unravelling a string of folds. *Biochem. J.* 339, 1-10
- Fichera ME, Bhopale MK, Roos DS (1995) *In vitro* assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1530-1537
- Fichera ME, Roos DS (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-409
- Finkemeier I, Goodman M, Lamkemeyer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ (2005) The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. *J Biol Chem.* [Epub ahead of print]
- Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen J-W, Feinstein SI (1999) Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 274, 21326-21334
- Fitch CD, Chevli R, Kanjanangulpan P, Dutta P, Chevli K, Chou AC (1983) Intracellular ferriprotoporphyrin IX is a lytic agent. *Blood* 62, 1165-1168
- Flohé L, Budde H, Bruns K, Castro H, Clos J, Hofmann B, Kansal-Kalavar S, Krumme D, Menge U, Plank-Schumacher K, Sztajer H, Wissing J, Wylegalla C, Hecht HJ (2002b) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 324-335
- Flohé L, Loschen G, Gunzler WA, Eichele E (1972) Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 353, 987-999
- Flohé L, Jaeger T, Pilawa S, Sztajer H (2003) Thiol-dependent peroxidases care little about homology-based assignments of function. *Redox Report* 8, 256-264
- Flohé L, Steinert P, Hecht HJ, Hofmann B (2002a) Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 347, H. Sies, ed. (London, New York: Academic Press) pp. 244-248
- Florent I, Mouray E, Dali Ali F, Drobecq H, Girault S, Schrevel J, Sergheraert C, Grellier P (2000) Cloning of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase homologue by affinity purification using the antiplasmodial inhibitor 1,4-bis[3-[N-(cyclohexyl methyl)amino]propyl]piperazine. *FEBS Lett.* 484, 246-252
- Foley M, Tilley L (1998) Protein trafficking in malaria-infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* 28, 1671-1680
- Foth BJ, McFadden GI (2003) The apicoplast: A plastid in *Plasmodium falciparum* and other apicomplexan parasites. *Int. Rev. Cytol.* 224, 57-110
- Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, Cowman AF, McFadden GI (2003) Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 299, 705-708
- Foth BJ, Stimmler LM, Handman E, Crabb BS, Hodder AN, McFadden GI (2005) The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast. *Mol. Microbiol.* 55, 39-53



- Francis SE, Sullivan DJ Jr., Goldberg DE (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 97-123
- Frand AR, Kaiser CA (2000) Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 11, 2833-2843
- Gardner MJ, Goldman N, Barnett P, Moore PW, Rangachari K, Strath M, Whyte A, Williamson DH, Wilson R J (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 221-231
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Perteua M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511
- Garrido EO, Grant CM (2002) Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol. Microbiol.* 43, 993-1003
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J-P (2003) Evidence for a subgroup of thioredoxin *h* that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Lett.* 555, 443-448
- Ghezzi P, Bonetto V (2003) Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3, 1145-1153
- Gibbs SP (1981) The chloroplast endoplasmic reticulum, structure, function, and evolutionary significance. *Int. Rev. Cytol.* 72, 49-99
- Ginsburg H (2003) The mysteries of hemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Trends Parasitol.* 19, 198-199
- Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M (1998) Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1305-1313
- Ginsburg H, Kutner S, Krugliak M, Cabantchik ZI (1985) Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14, 313-322
- Gitler C, Zarmi B, Kalef E, Meller R, Zor U, Goldman R (2002) Calcium-dependent oxidation of thioredoxin during cellular growth initiation. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 290, 624-628
- Gleason FK, Holmgren A (1988) Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 4, 271-297
- Goldberg DE (2002) When the host is smarter than the parasite. *Science* 296, 482-483
- Gorlitzer K, Kramer C, Meyer H, Walter RD, Jomaa H, Wiesner J (2004) [Pyrido [3,2-b]indol-4-yl-amine]-synthesis and investigation of activity against malaria]. *Pharmazie* 59, 243-250
- Gottesman S, Halpern E, Trisler P (1981) Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 148, 265-273

- Goyer A, Decottignies P, Lemaire S, Ruelland E, Issakidis-Bourguet E, Jacquot J-P, Miginiac-Maslow M (1999) The internal Cys-207 of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase can form mixed disulfides with thioredoxin. *FEBS Lett.* 444, 165-169
- Gromer S, Arscott LD, Williams CH Jr., Schirmer RH, Becker K (1998) Human placenta thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 273, 20096-20101
- Gromer S, Schirmer RH, Becker K (1999) News and views on thioredoxin reductases. *Redox Report* 4, 221-228
- Gromer S, Urig S, Becker K (2004) The thioredoxin system – from science to clinic. *Med. Res. Rev.* 24, 40-89
- Gutierrez-Correa J, Krauth-Siegel RL, Stoppani AO (2000) *Trypanosoma cruzi* dihydrolipoamide dehydrogenase is inactivated by myeloperoxidase-generated "reactive species". *Free Radic. Res.* 33, 13-22
- Gutteridge JMC (1986) Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.* 201, 291-295
- Hahn JE, Hodgson KO, Andersson LA, Dawson JH (1982) Endogenous cysteine ligation in ferric and ferrous cytochrome P-450. Direct evidence from x-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 257, 10934-10941
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619-633
- Harrison A, Sakato M, Tedford HW, Benashski SE, Patel-King RS, King SM (2002) Redox-based control of the gamma heavy chain ATPase from *Chlamydomonas* outer arm dynein. *Cell Motil. Cytoskeleton* 52, 131-143
- Harwaldt P, Rahlfs S, Becker K (2002) Glutathione S-Transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: Characterization of a potential drug target. *Biol. Chem.* 383, 821-830
- Hauke V, Schatz G (1997) Import of proteins into mitochondria and chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 7, 103-106
- He CY, Shaw MK, Pletcher CH, Striepen B, Tilney LG, Roos DS (2001) A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 20, 330-339
- Hebbel RP, Eaton JW (1989) Pathobiology of heme interaction with the erythrocyte membrane. *Semin. Hematol.* 26, 136-49
- Herm-Gotz A, Weiss S, Stratmann R, Fujita-Becker S, Ruff C, Meyhofer E, Soldati T, Manstein DJ, Geeves MA, Soldati D (2002) *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: A fast, single-headed, plus-end-directed motor. *EMBO J.* 21, 2149-2158
- Hillas PJ, Soto del Alba F, Oyarzabal J, Wilks A, Ortiz de Montellano PR (2000) The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 275, 18801-18809
- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274, 27891-27897

- Hirotsu S, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, Hakoshima T (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12333-12338
- Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacci J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR, Richie TL (2002) Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Infect. Dis.* 195, 1155-1164
- Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter JC (2002) Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria. *Nature* 415, 702-709
- Hofmann B, Hecht H-J, Flohé L (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383, 347-364
- Holmes DS und Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197
- Holmgren A (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2275-2279
- Holmgren A (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254, 9627-9632
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963-13966
- Holmgren A (1995) Thioredoxin structure and mechanism: Conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3, 239-243
- Holmgren A, Åslund F (1995) Glutaredoxin. *Methods Enzymol.* 252, 6686-6690
- Holmgren A, Luthman M (1978) Tissue distribution and subcellular localization of bovine thioredoxin determined by radioimmunoassay. *Biochemistry* 17, 4071-4077
- Holmgren A, Lyckeberg C (1980) Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 5149-5152
- Hopkins J, Fowler R, Krishna S, Wilson I, Mitchell G, Bannister L (1999) The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: A three dimensional ultrastructural analysis. *Protist* 150, 283-295
- Horiguchi H, Yurimoto H, Kato N, Sakai Y (2001) Antioxidant system within yeast peroxisome. *J. Biol. Chem.* 276, 14279-14288
- Hosoya-Matsuda N, Motohashi K, Yoshimura H, Nozaki A, Inoue K, Ohmori M, Hisabori T (2005) Antioxidative stress system in Cyanobacteria: Significance of type II peroxiredoxin and the role of 1-Cys peroxiredoxin in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Biol Chem.* 280, 840-846
- Hossain MA, Asada K (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25, 85-92
- Iheanacho EN, Stocker R, Hunt NH (1993) Redox metabolism of vitamin C in blood of normal and malaria-infected mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1182, 15-21

- Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Tan M, Iwahara S, Ramadori G, Fahimi HD (2003) Differential cellular and subcellular localization of Heme-binding protein 23/Peroxiredoxin I and Heme-Oxygenase-1 in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1621-1631
- Iozef R, Rahlfs S, Chang T, Schirmer H, Becker K (2003) Glyoxalase I of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: Evidence for subunit fusion. *FEBS Lett.* 554, 284-288
- Irmeler A, Bechthold A, Davioud-Charvet E, Hofmann V, Réau R, Gromer S, Schirmer RH, Becker K (2002) Disulfide reductases – current developments. In: Chapman SK, Perham RN, Scrutton NS. (eds) *Flavins and Flavoproteins 2002*. Berlin: Agency for Scientific Publications, 2002, 803-815
- Isakov N, Witte S, Altman A (2000) PICOT-HD: A highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem. Sci.* 25, 537-539
- Jacquot J-P, Gelhaye E, Rouhier N, Corbier C, Didierjean C, Aubry A (2002) Thioredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: Molecular basis for thiol dependent regulation. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1065-1069
- Janney SK, Joist JJ, Fitch CD (1986) Excess release of ferriheme in G6PD-deficient erythrocytes: Possible cause of hemolysis and resistance to malaria. *Blood* 67, 331-333
- Jefford CW (2001) Why atemisinin and certain synthetic peroxides are potent antimalarials. Implications for the mode of action. *Curr. Med. Chem.* 8, 1803-1826
- Jelenska J, Crawford MJ, Harb OS, Zuther E, Haselkorn R, Roos DS, Gornicki P (2001). Subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2723-2728
- Jeong W, Cha M-K, Kim I-H (2000) Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J. Biol. Chem.* 275, 2924-2930
- Jeong JS, Kwon SJ, Kang SW, Rhee SG, Kim K (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38, 776-783
- Jeong W, Yoon HW, Lee S-R, Rhee SG (2004) Identification and characterization of TRP14, a thioredoxin-related protein of 14 kDa. *J. Biol. Chem.* 279, 3142-3150
- Jimenez A, Zu W, Rawe VY, Pelto-Huikko M, Flickinger CJ, Sutovsky P, Gustafsson JA, Oko R, Miranda-Vizuet A (2004) Spermatocyte/spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 34971-34982
- Joiner KA, Roos DA (2002) Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: Less is more. *J. Cell Biol.* 157, 557-563
- Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Turbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D, Beck E (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 285, 1573-1576
- Jones W, Li X, Qu Z-C, Perriott L, Whitesell RR, May JM (2002) Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 83-93

- Kaasch AJ, Joiner KA (2000) Protein-trafficking determinants in the secretory pathway of apicomplexan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 422-428
- Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L (1992) Dihydrolipoic acid - a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol.* 44, 1637-1649
- Kang SW, Baines IC, Rhee SG (1998a) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* 273, 6303-6311
- Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG (1998b) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 273, 6297-6302
- Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Müller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer RH, Becker K (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 291, 643-646
- Kanzok SM, Schirmer RH, Türbachova I, Iozef R, Becker K (2000) The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 275, 40180-40186
- Kapust RB, Waugh DS (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8, 1668-1674
- Kato H, Asanoi M, Nakazawa T, Murayama K (1985) Cylinder protein isolated from rat liver mitochondria. *Zool. Sci.* 2, 485-490
- Kawazu S, Tsuji N, Toshimitsu H, Kawai S, Matsumoto Y, Kano S (2000) Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 165-169
- Kilejan A (1975) Circular mitochondrial DNA from the avian malarial parasite *Plasmodium iophuræ*. *Biochim. Biophys. Acta* 390, 276-284
- Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER (1988) The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* 263, 4704-4711
- Kirschner-Zilber I, Rabizadeh E, Shaklai N (1982) The interaction of heme and bilirubin with the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 690, 20-30
- Knoops B, Clippe A, Bogard C, Aarsalane K, Wattiez R, Hermans C, Duconseille E, Falmagne P, Bernard A (1999) Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* 274, 30451-30458
- Kocken CH, van der Wel AM, Dubbeld MA, Narum DL, van de Rijke FM, van Gemert GJ, van der Linde X, Bannister LH, Janse C, Waters AP, Thomas AW (1998) Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 273, 15119-15124

- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 275, 1485-1489
- Komaki-Yasuda K, Kawazu S, Kano S (2003) Disruption of the *Plasmodium falciparum* 2-Cys peroxiredoxin gene renders parasites hypersensitive to reactive oxygen and nitrogen species. *FEBS Lett.* 547, 140-144
- Kong W, Shiota S, Shi Y, Nakayama H, Nakayama K (2000) A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). *Biochem. J.* 351, 107-114
- Koo KH, Lee S, Jeong SY, Kim ET, Kim HJ, Kim K, Song K, Chae HZ (2002) Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 312-318
- Kotecka BM, Barlin GB, Edstein MD, Rieckmann KH (1997) New quinoline di-Mannich base compounds with greater antimalarial activity than chloroquine, amodiaquine, or pyronaridine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1369-1374
- Krauth-Siegel RL, Coombs GH (1999) Enzymes of parasite thiol metabolism as drug target. *Parasitol. Today* 15, 404-409
- Krauth-Siegel RL, Lüdemann H (1996) Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80, 203-208
- Krnajski Z, Gilberger T-W, Walter RD, Cowman AF, Müller S (2002) Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *J. Biol. Chem.* 277, 25970-25975
- Krnajski Z, Walter RD, Müller S (2001) Isolation and functional analysis of two thioredoxin peroxidases (peroxiredoxins) from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem Parasitol.* 113, 303-308
- Krohne-Ehrich G, Schirmer RH, Untucht-Grau R (1977) Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptide. *Eur. J. Biochem.* 80, 65-71
- Kurooka H, Kato K, Minoguchi S, Takahashi Y, Ikeda J, Habu S, Osawa N, Buchberg AM, Moriwaki K, Shisa H, Honjo T (1997) Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics* 39, 331-339
- Kyte J, Doolittle R (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienberger J-M, Bonnard, G, Meyer Y (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14144-14149
- Landino LM, Moynihan KL, Todd JV, Kennett KL (2004a) Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 555-560
- Landino LM, Skreslet TE, Alston JA (2004b) Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite: Modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system. *J. Biol. Chem.* 279, 35101-35105
- Lean J, Kirstein B, Urry Z, Chambers T, Fuller K (2004) Thioredoxin-1 mediates osteoclast stimulation by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 845-850

- Lee SP, Hwang YS, Kim YJ, Kwon K-S, Kim HJ, Kim K, Chae HZ (2001) Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 276, 29826-29832
- Lemaire SD, Collin V, Keryer E, Quesada A, Miginiac-Maslow M (2003) Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 543, 87-92
- Lew VL, Tiffert T, Ginsburg H (2003) Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* 101, 4189-4194
- Lisenbee CS, Karnik SK, Trelease RN (2003) Peroxisomal ascorbate peroxidase resides within a subdomain of rough endoplasmic reticulum in wild-type *Arabidopsis* cells. *Traffic* 4, 491-501
- Liu F, Rong YP, Zeng LC, Zhang X, Han ZG (2003) Isolation and characterization of a novel human thioredoxin-like gene hTLP19 encoding a secretory protein. *Gene* 315, 71-78
- Liu S-C, Zhai S, Lawler J, Palek J (1985) Hemin-mediated dissociation of erythrocyte membrane skeletal proteins. *J. Biol. Chem.* 260, 12234-12239
- Lohrer H, Krauth-Siegel RL (1990) Purification and characterization of lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 194, 863-869
- Lopez-Estraño C, Bhattacharjee S, Harrison T, Haldar K (2003) Cooperative domains define a unique host cell-targeting signal in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12402-12407
- 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, 363-370
- Lundberg M, Johansson C, Chandras J, Enoksson M, Jacobsson G, Ljung J, Johansson M, Holmgren A (2001) Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 26269-26275
- Lundström J, Holmgren A (1990) Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J. Biol. Chem.* 265, 9114-9120
- Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K (2004) Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol.* 20, 597-603
- Magnusson CG, Björnstedt M, Holmgren A (1997) Human IgG is substrate for the thioredoxin system: Differential cleavage pattern of interchain disulfide bridges in IgG subclasses. *Mol. Immunol.* 34, 709-717
- Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem.* 376, 651-660
- Marchand C, Le Maréchal P, Meyer Y, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Decottignies P (2004) New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 4, 2696-2706
- Maréchal E, Cesbron-Delauw M-F (2001) The apicoplast: A new member of the plastid family. *Trends Plant Sci.* 6, 200-205

- Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370
- Martoglio B, Dobberstein B (1998) Signal sequences: More than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* 8, 410-415
- Mashima R, Tilley L, Siomos M-A, Papalexis V, Raftery MJ (2002) *Plasmodium falciparum* Histidine-rich protein-2 (PfHRP2) modulates the redox activity of ferri-protoporphyrin IX (FePPiX). *J. Biol. Chem.* 277, 14514-14520
- Matsuo Y, Nishinaka Y, Suzuki S, Kojima M, Kizaka-Kondoh S, Kondo N, Son A, Sakakura-Nishiyama J, Yamaguchi Y, Masutani H, Ishii Y, Yodoi J (2004) TMX, a human transmembrane oxidoreductase of the thioredoxin family: The possible role in disulfide-linked protein folding in the endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 81-87
- May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF (1998b) Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 273, 23039-23045
- May JM, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF (1997) Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 22607-10
- May JM, Qu Z-C, Mendiratta S (1998) Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 281-289
- May JM, Qu Z-C, Neel DR, Li X (2003) Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1640, 153-161
- McFadden GI, Roos FW (1999) Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol.* 7, 328-333
- McFadden GI, Waller RF, Reith ME, Lang-Unnasch N (1997) Plastids in apicomplexan parasites. *Plant Syst. Evol. Suppl.* 11, 261-287
- McMillan PJ, Stimmler LM, Foth BJ, McFadden GI, Muller S (2005) The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses two distinct dihydrolipoamide dehydrogenases. *Mol. Microbiol.* 55, 27-38
- Mehlhorn H, Piekarski G (2002) Grundriss der Parasitenkunde. Heidelberg, Spektrum Verlag
- Mendiratta S, Qu Z-C, May JM (1998) Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: Role of thioredoxin reductase. *Free Rad. Biol. Med.* 25, 221-228
- Meyer Y, Verdoucq L, Vignols F (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: Identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* 4, 1360-1385
- Meyer Y, Vignols F, Reicheld JP (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* 347, Sies H, Packer H (ed.), Academic Press, pp. 394-402
- Mieyal JJ, Starke DW, Garvina SA, Cothey C, Chung JS (1991) Thioltransferase in human red blood cells: Purification and properties. *Biochemistry* 30, 6088-6097
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673- 679



- Mills GC (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189-197
- Miranda-Vizuete A, Ljung J, Damdimopoulos AE, Gustafsson JA, Oko R, Pelto-Huikko M, Spyrou G (2001) Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 276, 31567-31574
- Miroux B und Walker JE (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289-298
- Missirlis F, Ulschmid JK, Hirosawa-Takamori M, Grönke S, Schäfer U, Becker K, Phillips JP, Jäckle H (2002) Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single *Drosophila* gene are both essential for viability. *J. Biol. Chem.* 277, 11421-11526
- Mitsui A, Hirakawa T, Yodoi J (1992) Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukaemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 1220-1226
- Mongkolsuk S, Praituan W, Loprasert S, Fuangthong M, Chamnongpol S (1998) Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *J. Bacteriol.* 180, 2636-2643
- Montemartini M, Kalisz HM, Hecht HJ, Steinert P, Flohé L (1999) Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type trypanothione peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur. J. Biochem.* 264, 516-524
- Moore RB, Mankad MV, Shriver SK, Mankad VN, Plishker GA (1991) Reconstitution of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J. Biol. Chem.* 266, 18964-18968
- Morell S, Follmann H, De Tullio M, Häberlein I (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett.* 414, 567-570
- Müller S, Gilberger TW, Färber PM, Becker K, Schirmer RH, Walter RD (1996) Recombinant putative glutathione reductase from *Plasmodium falciparum* exhibits thioredoxin reductase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80, 215-219
- Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Spyrou G (2004) Human mitochondrial thioredoxin reductase reduces cytochrome c and confers resistance to complex III inhibition. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1270-1278
- Nikitovic D, Holmgren A (1996) S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 271, 19180-19185
- Nikkola M, Gleason FK, Eklund H (1993) Reduction of mutant phage T4 glutaredoxins by *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 268, 3845-3849
- Nogoceke E, Gommel DU, Kiess M, Kalisz HM, Flohé L (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* 378, 827-836
- Nordberg J, Arnér ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1287-1312
- Oborník M, Van den Peer Y, Hypša V, Frickey T, Šlapeta JR, Meyer A, Lukeš J (2002) Phylogenetic analyses suggest lateral gene transfer from the mitochondrion to the apicoplast. *Gene* 285, 109-118

- Okado-Matsumoto A, Matsumoto A, Fujii J, Taniguchi N (2000) Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions. *J. Biochem.* (Tokyo) 127, 493-501
- Padgett CM, Whorton AR (1997) Glutathione redox cycle regulates nitric oxide-mediated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibition. *Am. J. Physiol.* 272, C99-C108
- Padma P, Hozumi A, Ogawa K, Inaba K (2001) Molecular cloning and characterization of a thioredoxin/nucleoside diphosphate kinase related dynein intermediate chain from the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Gene* 275, 177-183
- Pandey AV, Tekwani BL (1996) Formation of hemozoin/beta-hemeatin under physiological conditions is not spontaneous. *FEBS Lett.* 393, 189-192
- Pandini V, Caprini G, Thomsen N, Aliverti A, Seeber F, Zanetti G (2002) Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and ferredoxin of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* interact productively *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 277, 48463-48471
- Park SG, Cha M-K, Jeong W, Kim I-H (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 5723-5732
- Patel-King RS, Benashski SE, Harrison A, King SM (1996) Two functional thioredoxins containing redox-sensitive vicinal dithiols from the *Chlamydomonas* outer dynein arm. *J. Biol. Chem.* 271, 6283-6291
- Pauwels F, Vergauwen B, Vanrobaeys F, Devreese B, Van Beeumen JJ (2003) Purification and characterization of a chimeric enzyme from *Haemophilus influenzae* Rd that exhibits glutathione-dependent peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 16658-16666
- Pedrajas JR, Miranda-Vizuete A, Javanmardy N, Gustafsson J-Å, Spyrou G (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 16296-16301
- Pedrajas JR, Porras P, Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Miranda-Vizuete A, Bárcena JA (2002) Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed *in vivo* and localize to different subcellular compartments. *Biochem J.* 364, 617-623
- Pelicano H, Carney D, Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Update* 7, 97-110
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L, Roepstorff P, Von Heijne G, Van Wijk KJ (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14, 211-236
- Peters W, Robinson BL (1984) The chemotherapy of rodent malaria, XXXVII. The *in vivo* action of two Mannich bases, WR 194,965 and WR 228,258 and an 8-aminoquinoline WR 225,448. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 561-565
- Porras P, Pedrajas JR, Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Johansson C, Holmgren A, Bárcena JA (2002) Glutaredoxins catalyze the reduction of glutathione by dihydrolipoamide with high efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 1046-1051

- Powis G, Montfort WR (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 261-295
- Preusch PC (1992) Is thioredoxin the physiological vitamin K epoxide reducing agent? *FEBS Lett.* 305, 257-259
- Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P, Lunardi J (2002) Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 277, 19396-19491
- Rahlfs S, Becker K (2001) Thioredoxin peroxidases of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* 268, 1404-1409
- Rahlfs S, Nickel C, Deponte M, Schirmer RH, Becker K (2003) *Plasmodium falciparum* thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Report* 8, 246-250
- Rahlfs S, Fischer M, Becker K (2001) *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *J. Biol. Chem.* 276, 37133-37140
- Rahlfs S, Schirmer RH, Becker K (2002) The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1024-1041
- Rawlings DJ, Kaslow DC (1992) A novel 40-kDa membrane-associated EF-hand calcium-binding protein in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 267, 3976-3982
- Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN (2005) Curcumin for malaria therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 472-474
- Reichheld JP, Meyer E, Khafif M, Bonnard G, Meyer Y (2005) AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 579, 337-342
- Ren X, Björnstedt M, Shen B, Ericson ML, Holmgren A (1993) Mutagenesis of structural half-cystine residues in human thioredoxin and effects on the regulation of activity by selenodiglutathione. *Biochemistry* 32, 9701-9708
- Ribeiro MCD, Augusto O, Ferreira AMD (1997) Influence of quinoline-containing antimalarials in the catalase activity of ferriprotophyrin IX. *J. Inorg. Biochem.* 65, 15-23
- Richie TL, Saul A (2002) Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* 415, 694-701
- Ridley RG (2002) Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 415, 686-693
- Ridley RG (2003) To kill a parasite. *Nature* 424, 887-889
- Riggs P (2000) Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. *Mol. Biotechnol.* 15, 51-63
- Rodriguez Milla MA, Maurer A, Rodriguez Huete A, Gustafson JP (2003) Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J.* 36, 602-615

- Roos DS, Crawford MJ, Donald RGK, Fraunholz M, Harb OS, He CY, Kissinger JC, Shaw MK, Striepen B (2002) Mining the *Plasmodium* genome database to define organellar function: What does the apicoplast do? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357, 35-46
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590
- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2002) Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar. *J. Biol. Chem.* 277, 13609-13614
- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot J-P (2004) Plant glutaredoxins: Still mysterious reducing systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1266-1277
- Rouhier N, Gelhaye E, Sautiere P-E, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, De Fay E, Meyer Y, Jacquot J-P (2001) Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* 127, 1299-1309
- Rouhier N, Jacquot J-P (2003) Molecular and catalytic properties of a peroxiredoxin-glutaredoxin hybrid from *Neisseria meningitidis*. *FEBS Lett.* 554, 149-153
- Rouhier N, Vlamis-Gardikas A, Lillig CH, Berndt C, Schwenn JD, Holmgren A, Jacquot JP (2003) Characterization of the redox properties of poplar glutaredoxin. *Antiox. Redox Signal.* 5, 15-22
- Rouhier N, Gelhaye E, Corbier C, Jacquot JP (2005) Active site mutagenesis and phospholipids hydroperoxide reductase activity of poplar type II peroxiredoxin. *Physiol. Plant.* 120, 57-62
- Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 24161-24164
- Rundlöf AK, Arnér ES (2004) Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antiox. Redox. Signal.* 6, 41-52
- Rundlöf AK, Janard M, Miranda-Vizuete A, Arnér ES (2004) Evidence for intriguingly complex transcription of human thioredoxin reductase 1. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 641-656
- Sadek CM, Damdimopoulos AE, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA, Spyrou G, Miranda-Vizuete A (2001) Sptrx-2, a fusion protein composed of one thioredoxin and three tandemly repeated NDP-kinase domains is expressed in human testis germ cells. *Gene Cells* 6, 1077-1090
- Sadek CM, Jiménez A, Damdimopoulos AE, Kieselbach T, Nord M, Gustafsson JA, Spyrou G, Davis EC, Oko R, Van der Hoorn FA, Miranda-Vizuete A (2003) Characterization of human thioredoxin-like 2. *J. Biol. Chem.* 278, 13133-13142
- Sakamoto H, Imai H, Nakagawa Y (2000) Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 40028-40035
- Salinas G, Selkirk ME, Chalar C, Maizels RM, Fernandez C (2004) Linked thioredoxin-glutathione systems in plathelminths. *Trends Parasitol.* 20, 340-346
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Eds. (1990) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C, Perez-Carreón J, Hernandez-Garcia S, Salcido-Neyoy M, Aleman-Lazarini L, Villa-Trevino S (2005) Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 217, 25-32
- Sarma G, Nickel C, Rahlfs S, Fischer M, Becker K, Karplus PA (2005) Crystal structure of a novel *Plasmodium falciparum* 1-Cys peroxiredoxin. *J. Mol. Biol.* 346, 1021-1034
- Sarma GN, Savvides SN, Becker K, Schirmer M, Schirmer RH, Karplus PA (2003) Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: Crystal structure and inhibitor development. *J. Mol. Biol.* 328, 893-907
- Saito I, Shimuta M, Terauchi K, Tsubota K, Yodoi J, Miyasaka N (1996) Increased expression of human thioredoxin/adult T cell leukaemia-derived factor in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 39, 773-782
- Schirmer RH, Schollhammer T, Eisenbrand G, Krauth-Siegel RL (1987) Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. *Free Radic. Res. Commun.* 3, 3-12
- Schröder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure Fold Des.* 8, 605-615
- Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT (2004) Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J. Biol. Chem.* 279, 30369-30374
- Scopes RK (1974) Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.* 59, 277-282
- Scott HV, Tan WL, Barlin GB (1987) Antimalarial activity of Mannich bases derive from 4-(7'-bromo-1',5'-naphthyridin-4'-ylamino)phenol and 4-(7'-trifluoromethylquinolin-4'-ylamino)phenol against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81, 85-93
- Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* 275, 20346-20354
- Serrato AJ, Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Cejudo FJ (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279, 43821 - 43827
- Shaklai N, Shviro E, Rabizadeh E, Kirschner-Zilber I (1985) Accumulation and drainage of hemin in the red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 821, 355-366
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: Implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16
- Shimaoka T, Miyake C, Yokota A (2003) Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 270, 921-928
- Sies H, Cadenas E (1985) Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 311, 617-631
- Silflow CD, Lefebvre PA (2001) Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 127, 1500-1507

- Slater AF, Cerami A (1992) Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355, 167-169
- Smith DJ, Maggio ET, Kenyon GL (1975) Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* 14, 766-771
- Soldati D, Boothroyd JC (1993) Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* 260, 349-352
- Spurlino JC, Lu GY, Quioco FA (1991) The 2.3 Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 266, 5202-5219
- Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson J-A (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 2936-2941
- Srivastava S, Alhomida AS, Siddiqi NJ, Pandey VC (2001) Changes in rodent-erythrocyte methemoglobin reductase system produced by two malaria parasites, viz. *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *Plasmodium berghei*. *Comp. Biochem. Phys. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 725-731
- Stadtman ER, Levine RL (2000) Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 191-208
- Starke DW, Chock PB, Mieyal JJ (2003) Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction. *J. Biol. Chem.* 278, 14607-14613
- Stocker R, Weidemann MJ, Hunt NH (1986) Possible mechanisms responsible for the increased ascorbic acid content of *Plasmodium vinckei*-infected mouse erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 881, 391-397
- Sugioka Y, Suzuki M, Sugioka K, Nakano M (1987) A ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex promotes membrane phospholipid peroxidation. A possible mechanism for antimalarial action. *FEBS Lett.* 223, 251-254
- Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Goldberg DE (1996) *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* 271, 219-222
- Sun QA, Kirmarsky L, Sherman S, Gladyshev VN (2001a) Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3673-3678
- Sun QA, Zappacosta F, Factor VM, Wirth PJ, Hatfield DL, Gladyshev VN (2001b) Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. *J. Biol. Chem.* 276, 3106-3114
- Surolia N, Surolia A (2001) Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat. Med.* 7, 167-173
- Sztajer H, Gamain B, Aumann K-D, Slomianny C, Becker K, Brigelius-Flohé R, Flohé L (2001) The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 276, 7397-7403
- Takemoto T, Zhang QM, Yonei S (1998) Different mechanisms of thioredoxin in its reduced and oxidized forms in defense against hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 556-562

Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, Nishiyama A, Takeda S, Wada H, Spyrou G, Yodoi J (2002) Thioredoxin-2 (*TRX-2*) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO Journal* 21, 1695-1703

Tappel AL (1953) The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 44, 378-394

Tavazzi D, Duca L, Graziadei G, Comino A, Fiorelli G, Cappellini MD (2001) Membrane-bound iron contributes to oxidative damage of beta-thalassaemia intermedia erythrocytes. *Br. J. Haematol.* 112, 48-50

Tongren JE, Zavala F, Roos DS, Riley EM (2004) Malaria vaccines: If at first you don't succeed... *Trends Parasitol.* 20, 604-610

Topolska AE, Lidgett A, Truman D, Fujioka H, Coppel RL (2004) Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 279, 4648-4656

Trager W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675

Trebitsch T, Meiri E, Osterseker O, Adam Z, Danon A (2001) The protein disulfide isomerase-like RB60 is partitioned between stroma and thylakoids in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 276, 4564-4569

Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Yonehara S, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J (1998) Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: Regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J. Immunol.* 161, 6689-6695

Van der Vlies D, Makkinje M, Jansens A, Braakman I, Verkleij AJ, Wirtz KW, Post JA (2003) Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: Effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 381-387

Van Dooren GG, Su V, D'Ombra MC, McFadden G (2002) Processing of an apicoplast leader sequence in *Plasmodium falciparum* and the identification of a putative leader cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.* 277, 23612-23619

Van Dooren GG, Waller RF, Joiner KA, Roos DS, McFadden GI (2000) Traffic Jams: Protein transport in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 16, 421- 427

Vergauwen B, Pauwels F, Jacquemotte F, Meyer TE, Cusanovich MA, Bartsch RG, Van Beeumen JJ (2001) Characterization of glutathione amide reductase from *Chromatium gracile*. *J. Biol. Chem.* 276, 20890-20897

Villarejo MR, Zabin I (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J. Bacteriol.* 120, 466-474

Vollmer M, Thomsen N, Wiek S, Seeber F (2001) Apicomplexan parasites possess distinct nuclear-encoded, but apicoplast-localized, plant-type ferredoxin-NADP+ reductase and ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 276, 5483-5490

Von Heijne G, Nishikawa K (1991) Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett.* 278, 1-3

Wahl MC, Irmeler A, Hecker B, Schirmer RH, Becker K (2005) Comparative structural analysis of oxidized and reduced thioredoxin from *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 345, 1119-1130

- Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12352-12357
- Waller RF, Reed MB, Cowman AF, McFadden GI (2000) Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J.* 19, 1794-1802
- Watanabe J, Sasaki M, Suzuki Y, Sugano S (2002) Analysis of transcriptomes of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using full-length enriched library: Identification of novel genes and diverse transcription start sites of messenger RNAs. *Gene* 291, 105-113
- Weichsel A, Gasdaska JR, Powis G, Montfort WR (1996) Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: Evidence for a regulatory homodimer. *Structure* 4, 735-751
- Wells WW, Xu DP, Yang Y, Rocque PA (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.* 265, 15361-15364
- Wen S-T, Van Etten RA (1997) The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev.* 11, 2456-2467
- Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M (2003) New antimalarial drugs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 5274-5293
- Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM (2002) *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13453-13458
- Wilkinson SR, Taylor MC, Touitha S, Mauricio IL, Meyer DJ, Kelly JM (2002) TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 364, 787-794
- Williams CH Jr. (1992) in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Müller F, ed) Vol. 3; pp. 121-211; CRC Press, Inc.; Boca Raton, FL, USA
- Williams CH Jr., Arscott LD, Müller S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang P-F, Veine DM, Becker K, Schirmer RH (2000) Thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6110-6117
- Williamson DH, Denny PW, Moore PW, Sato S, McCready S, Wilson RJ (2001) The *in vivo* conformation of the plastid DNA of *Toxoplasma gondii*: Implications for replication. *J. Mol. Biol.* 306, 159-168
- Wilson, CM (1993) Plastids better red than dead. *Nature* 366, 638
- Wilson RJM, Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A, Strath M, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH (1998) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 261, 155-172
- Wilson RJM (2004) The transcriptome: Malariologists ride the wave. *BioEssays* 26, 339-342
- Winkler BS, Orselli SM, Rex TS (1994) The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol. Med.* 17, 333-349



- Wiser MF, Lanners HN, Bafford RA, Favaloro JM (1997) A novel alternate secretory pathway for the export of *Plasmodium* proteins into the host erythrocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9108-9113
- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang K-S, Kang SW, Kim K, Rhee SG (2003) Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300, 653-656
- Wood WB (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* 16, 118-133
- Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus PA (2002) Dimers to doughnuts: Redox sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41, 5493-5504
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650-653
- Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32-40
- Xia L, Nordman T, Olsson JM, Damdimopoulos A, Bjorkhem-Bergman L, Nalvarte I, Eriksson LC, Arner ES, Spyrou G, Bjornstedt M (2003) The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 2141-2146
- Xiao R, Wilkinson B, Solovyov A, Winther JR, Holmgren A, Lundström-Ljung J, Gilbert HF (2004) The contributions of protein disulfide isomerase and its homologues to oxidative protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279, 49789-49786
- Xu DP, Washburn MP, Sun GP, Wells WW (1996) Purification and characterization of a glutathione dependent dehydroascorbate reductase from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 221, 117-121
- Xu DP, Wells WW (1996) Alpha-lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 77-85
- Zerez CR, Hseih JW, Tanaka KR (1987) Inhibition of red blood cell enzymes by hemin: A mechanism for hemolysis in hemoglobinopathies. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 100, 329-338
- Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM (1997) Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 272, 30615-30618
- Zhou Y, Kok KH, Chun ACS, Wong C-M, Wu HW, Lin MCM, Fung PCW, Kung H, Jin D-Y (2000) Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 921-927
- Zou C-G, Agar NS, Jones GL (2002) Enhancement of glutathione-dependent haemin degradation by ascorbic acid. *Biochem. Pharmacol.* 64, 565-572

## 6.2 Eigene Veröffentlichungen

Christine Nickel und Katja Becker-Brandenburg (2001) Zur Biochemie des Alterns – ernährungswissenschaftliche Aspekte des Redoxstoffwechsels. *Ernährungs-Umschau* 48, 224-230

Christine Nickel (2002) Dem Altern auf der Spur. *UGB-Forum* 1, 6-9

Katja Becker, Stefan Rahlfs, Christine Nickel, and R. Heiner Schirmer (2003) Glutathione – function and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.* 384, 551-566

Stefan Rahlfs, Christine Nickel, Marcel Deponce, R. Heiner Schirmer, and Katja Becker (2003) *Plasmodium falciparum* thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Report* 8, 246-250

Naomi Campanale, Christine Nickel, Claudia Daubenberger, Dean Wehlan, Jeff Gorman, Nectarios Klonis, Katja Becker and Leann Tilley (2003) Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 278, 27354-27361

Ganapathy Sarma., Christine Nickel, Stefan Rahlfs, Marina Fischer, Katja Becker and P. Andrew Karplus (2005). Crystal structure of a novel *Plasmodium falciparum* 1-Cys peroxiredoxin. *J. Mol. Biol.* 346, 1021-1034

Christine Nickel, Stefan Rahlfs, Sasa Koncarevic, Lai Yu Kwok, Dominique Soldati, and Katja Becker (2005) A novel peroxiredoxin of the malarial parasite *Plasmodium falciparum* has glutaredoxin-dependent peroxidase activity. Manuskript eingereicht.

Christine Nickel, Marcel Deponce, Stefan Rahlfs, and Katja Becker (2005) Substrate specificity of *Plasmodium falciparum* thioredoxin peroxidase1: Functional contribution of cysteine residues. In preparation

Christine Nickel, Stefan Rahlfs, Lai Yu Kwok, Dominique Soldati, and Katja Becker (2005) Characterization of thioredoxin-like proteins of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In preparation

## Tagungsbeiträge

Stefan Rahlfs, Christine Nickel, R. Heiner Schirmer, und Katja Becker (2002) Glutathione and thioredoxin metabolism of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Poster zu dem Expert meeting "Proteins of the redox metabolism as targets for the development of new drugs against malaria and other protozoan infections" der European Commission COST Action B9 Chemotherapy of protozoal infections, 29.-31. August 2002 in Hamburg; abstract book, p. 9-10

Christine Nickel, Stefan Rahlfs, R. Heiner Schirmer, und Katja Becker (2003) Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathione S-transferase of *Plasmodium falciparum*. Poster zur Rockefeller Conference "Redox metabolism in Malaria"; 03.-07. Februar 2003 in Bellagio, Italien

Christine Nickel, Naomi Campanale, Leann Tilley und Katja Becker. Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Vortrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; 17.-20. März 2004 in Würzburg; abstract book p. 103

Christine Nickel, Ganapathy N. Sarma, Stefan Rahlfs, Sasa Koncarevic, Lai Yu Kwok, Dominique Soldati, P. Andrew Karplus und Katja Becker. A novel peroxiredoxin of the malarial parasite *Plasmodium falciparum* has glutaredoxin-dependent peroxidase activity, Poster zum BioMalPar Symposium, EMBL; 02.-04. März 2005 in Heidelberg

Christine Nickel, Ganapathy N. Sarma, Stefan Rahlfs, Sasa Koncarevic, Lai Yu Kwok, Dominique Soldati, P. Andrew Karplus und Katja Becker. A novel peroxiredoxin of the malarial parasite *Plasmodium falciparum* has glutaredoxin-dependent peroxidase activity, Vortrag zum Drug Development Seminar, BNI; 28.-29. April 2005 in Hamburg

## 6.3 Computerprogramme

### 6.3.1 Schnittstellensuche

JustBio Cutter

<http://www.justbio.com/cutter/index.php>

### 6.3.2 Sequenzübersetzung DNA→Protein

JustBio Translator

<http://www.justbio.com/aligner/index.php>

### 6.3.3 BLASTs

NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

PlasmoDB-BLAST

<http://plasmodb.org/plasmodb/servlet/sv?page=blast>

### 6.3.4 Proteinparameter

MBS ProtCalc (→ jetzt JustBio)

<http://www.justbio.com/protcalc/index.php>

### 6.3.5 Alignments

JustBio Aligner

<http://www.justbio.com/aligner/index.php>

ClustalW

<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>

### 6.3.6 Signalpeptidvorhersage

SignalP

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/#submission>

TargetP

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

PSORT /iPSORT

<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>

### 6.3.7 Vorhersage der Apicoplast-Lokalisation

PATS

<http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/pats/pats-index.php>

PlasmoAP

<http://plasmodb.org/restricted/PlasmoAPcgi.shtml>

### 6.3.8 Vorhersage der Mitochondrium-Lokalisation

#### PlasMit

<http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/plasmit>.

#### MitoProt II

<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>

#### Predotar

<http://genoplante-info.infobiogen.fr/predotar/>

### 6.3.9 Analyse der *codon usage*

#### *E. coli* Codon Usage Analyzer by Morris Maduro

<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm>

### 6.3.10 Hydrophobizitätsplot und Transmembran-Vorhersage

#### Kyte Doolittle Hydropathy Plot

[http://ocawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc\\_mcampbell\\_genomics\\_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm](http://ocawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm)

#### SOSUI

[http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/adv\\_sosui.cgi](http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/adv_sosui.cgi)

#### TMpred

[http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED\\_form\\_parser](http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser)

#### “DAS”-Transmembrane Prediction server

<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>

#### PredictProtein

<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>

### 6.3.11 Konservierte Domänen

#### NCBI Conserved Domain (CD)-Search

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/BLAST/cdd\\_search.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/BLAST/cdd_search.html)

### 6.3.12 Posttranslationale Modifikationen

#### Prosite

<http://au.expasy.org/prosite/>

### 6.3.13 Disulfidbrücken

#### Disulfind

[\(http://cassandra.dsi.unifi.it/cysteines/\)](http://cassandra.dsi.unifi.it/cysteines/)

## 7 Anhang

Bezeichnung	Sequenz	Länge (bp)	Restriktionsstelle
OpfDynv	5'-CGCGGGATCCAAACGAACTGACGATAAAAATTACG-3'	35	BamHI
OpfDynh	5'-GCGCAAGCTTTCAATTTATTTTCTTATTCATCAAATG-3'	37	HindIII
OPfTrx9v1	5'-ATGTGAGAAGATATATACTTTGAAC-3'	25	
OPfTrx9v2	5'-GCTGGAACAACTCAATTATAACAATTCC-3'	29	
OPfTrx9vA	5'-ATGAAACCTAAAGATCCAGTAAC-3'	23	
OPfTrx9vB	5'-ATGATATATTTAAAAAAGAATACAT-3'	26	
OPfTrx9vC	5'-ATGATCATTTTTTATTTATTT-3'	21	
OPfTrx9vDB	5'-CGCGGGATCCTTTTTTCTTCAAATTTAAAAAAATTACC-3'	40	BamHI
OPfTrx9oSP	5'-CGCGGGATCCAAATATTTATGCACAAC-3'	27	BamHI
OPfTrx9h1	5'-CAATCACTCTGATGTTTTTCAACGG-3'	25	
OPfTrx9h2	5'-ACCTATAATCTGTCCAAATATTTC-3'	26	
OPfTrx9v1B	5'-CGCGGGATCCTATGTGAGAAGATATATACTTTGAAC-3'	36	BamHI
OPfTrx9h1H	5'-GCGCAAGCTTTCAATCACTCTGATGTTTTTCAACGG-3'	36	HindIII
OPfTrx13/52	5'-ACAAAAGAAGTAACATCAACAAATGATG-3'	28	
OPfTrx13/3	5'-TTATAAATGTTTTTAATTAATGCTATC-3'	28	
OPfTrx13/5	5'-ATGAAGAAGTATATATTTTTTCTTTCTC-3'	27	
OPfTrxIXs	5'-AAAAACACTGGAAGTTTAAACCAGG-3'	25	
OPfTrxIXas	5'-TAATGTTATGTTGATCATTTAATTTGG-3'	28	
OPfIXv1	5'-ATGAAGTGTATGAAATGATAAAC-3'	24	
OPfIXh2	5'-CTCATTATATAGAACAAGAAAATAA-3'	25	
OPf9API	5'-ATGGCTCTTATTTGCATCGGATCAG-3'	25	
OPf9-n	5'-CATATAAAAAAATATTTCTTCC-3'	24	
OPfIXN	5'-CGCGGGATCCGCTCTTATTTGCATCGGATCAGTATG-3'	36	BamHI
OPfIXN-ap	5'-CGCGGGATCCCATATAAAAAAATATTTCTTCC-3'	37	BamHI
OPfIXC	5'-GCGCAAGCTTTCATTTTGTCTTTTCTAAACAGTACTTC-3'	38	HindIII
pQE30-Hisfor*	5'-AATTCATTAAGAGGAGAAATTAATATG-3'	30	
pQE-Hisrev*	5'-GATCCCATATGTAATTTCTCTTTAATG-3'	30	
OPfTrxRaN	5'-ATGAACAATGTAATTTCTTTTATTGG-3'	26	
OPfTrxRas	5'-TTGTACAGTTGTAACATAATTTCTTCC-3'	26	
OPfTrxRaNB	5'-CGCGGGATCCAACAATGTAATTTCTTTTATTGG-3'	33	BamHI
OPfTrxRasH	5'-GCGCAAGCTTTTGTACAGTTGTAACATAATTTCTTCC-3'	36	HindIII
OPfTrxRcTerm	5'-TTATCCACATTTTCCACCCCCAC-3'	23	
altPffTrxR-hismut	5'-AACAATGTAATTTCTTTTATTGGAAATTC-3'	29	
TrxRmutr1	5'-CGATCCTCTCATAGTTAATTTCTTCC-3'	25	
TrxRshort Mutf	5'-GATTCGAAAGCATATGGATGG-3'	21	
TrxRshort Mutr	5'-CCATCCATATGCTTTTCAATC-3'	21	
OpfGrxPxvint	5'-AATGACGTAAGAAATATGAACAACATATCTG-3'	31	
OpfGrxPxh	5'-TTATAACTGATTATTTTTTAAAACTCTTTTAC-3'	33	
OpfGrxPxvgen	5'-AGAATGAGAAGAACAATACTAATATTTACTG-3'	31	
OpfGrxPxglm	5'-GTTACTTACTTTACATTTTTGAAATATAAATG-3'	32	
OpfGrxPxvgenB	5'-CGCGGGATCCAGAATGAGAAGAACAATACTAATATTTACTG-3'	41	BamHI

OpfGrxPxhH	5' - <u>GCGCAAGCTTT</u> TATAACTGATTATTTTTTAAAACTCTTTTAC - 3'	43	<i>HindIII</i>
OpfGrxPxB-24	5' - <u>CGCGGGATCCT</u> TATTTAAGCATTCTATTAATATAGTATCC - 3'	40	<i>BamHI</i>
OpfGrxPxvB	5' - <u>CGCGGGATCC</u> AAAGAAAATGATCTTATTCCTAACG - 3'	35	<i>BamHI</i>
OpfTPx1C74A forward	5' - TTGAATTAATAGGCGCTAGTGTGGATAG - 3'	28	
OpfTPx1C74A reverse	5' - CTATCCACACTAGCGCCTATTAATTCAA - 3'	28	
OpfTPx1C170A forward	5' - GATGTTGCTCCAGCAAAC TGAAAAAG - 3'	27	
OpfTPx1C170A reverse	5' - CTTTTTCCAGTTTGCTGGAGCAACATC - 3'	27	

**Tabelle A1. Verwendete Oligonukleotide.** Die unterstrichenen Basen stellen die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym mit Überhängen dar und hybridisieren nicht.

\* 5'-Phosphorylierung

magenta: *EcoRI*-Schnittstelle

grün: *BamHI*-Schnittstelle

blau: mutierte Basen, die die Einführung einer *NdeI*-Schnittstelle bewirken

MKRTDDKIYVDINNEEEYKNLFDDKNDILYIIDIIYTRWCGPCIFTFEMINKIYKNNLIFSENVKLF SICAQTVSS LKNYDNNCKPFYIILKNGEIIQQIQGCNIPLIFS FIDEHLMNKKIN
--

**Abb. A1. Aminosäuresequenz des Thioredoxin-like protein 1 aus *Plasmodium falciparum*.**

601	-	TATATTTATATTCATATTTATTTATTTAATATAACATTATG	TATGTGAGAAGATATATAC	-	660
	-	Y I Y I H I Y L F N I T L C M * E D I Y			
	-	I F I F I F I Y L I * H Y V C E K I Y T			
	-	Y L Y S Y L F I * Y N I M Y V R R Y I L			
661	-	TTTGAACATAATAACATTTCTGCATTCTCTTTTTTTTGTCTGCTTTATAAAAAATGTTTT		-	720
	-	F E H N N I S A F S F F C C F I K K C F			
	-	L N I I T F L H S L F F A A L * K N V F			
	-	* T * * H F C I L F F L L L Y K K M F F			
721	-	TTCTTCAAAATTTAAAAAATTACCCATCCAAATATTATGCACAACAATTAGAAGAA		-	780
	-	F F K I * K K L P I Q N I Y A Q Q L E E			
	-	S S K F K K N Y P S K I F M H N N * K K			
	-	L Q N L K K I T H P K Y L C T T I R R N			
781	-	ATGTGTACACAGTAAGGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCAT		-	840
	-	M C T Q * G * K K K K K K K K K K K I H			
	-	C V H S K D K K K K K K K K K K K S I			
	-	V Y T V R I K K K K K K K K K K K N P *			
841	-	AAATATATATATAATATATATTATAATATG	GCTGGAACAACTCAATTATAACAATTCCT	-	900
	-	K Y I Y N I Y Y N M A G T N S I I T I P			
	-	N I Y I I Y I I I W L E Q T Q L * Q F L			
	-	I Y I * Y I L * Y G W N K L N Y N N S F			
901	-	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAAATATGATTTGTTTTGCTCAAAAACAATAAT		-	960
	-	F F F F F F F F C N M Y L F L L K N N N			
	-	F F F F F F F F V I C I C F C S K T I I			
	-	F F F F F F F F * Y V F V F A Q K Q * F			
961	-	TTGTTTATATAAAAAATATAGGAATTAATAAAATGATGATTATCTTAGTAAGTTAA		-	1020
	-	L F I I K N I G I K * N * * L S * * G *			
	-	C L L * K I * E L N K I D D Y L S K V N			
	-	V Y Y Y K K Y R N * I K L M I I L V R L M			
1021	-	TGAAATAAATGGTTGTTGCTCAATTTGGTGCTTCATGGTGTGCCCTTGTAAAAAAAT		-	1080
	-	W K * I G C C S I W C F M V C P L * K N			
	-	G N K L V V A Q F G A S W C A P C K K M			
	-	E I N W L L L N L V L H G V P L V K K *			
1081	-	GAAACCAGTGGTAAATAAATAAATAAATATATATATATATATATATATATATAC		-	1140
	-	E T S G K * I N K Y I Y I Y I Y I Y I Y			
	-	K P V V N K * I N I Y I Y I Y I Y I Y T			
	-	N Q W * I N K * I Y I Y I Y I Y I Y I H			
1141	-	ATATTTATATATCTGTATATATTATAGATGAAAATGCTGGGAGAAGATAACGATAAC		-	1200
	-	I F I Y L L Y I Y R L K M L G E D N D N			
	-	Y L Y I C Y I F I D * K C W E K I T I T			
	-	I Y I S V I Y L * I E N A G R R * R * H			
1201	-	ATTGAATCTTTATATATAGACATTGACGAATTTCCAGGTATATTACTAGAAAAAATGA		-	1260
	-	I E S L Y I D I D E F P G I L L E K K *			
	-	L N L Y I * T L T N F Q V Y Y * K K N E			
	-	* I F I Y R H * R I S R Y I T R K K M K			
1261	-	AACTATAGTAATACCTATCTTTGTTTATGATACATTTATTCATTTAAATTATTTATTTG		-	1320
	-	N Y S N T Y L C L * Y I Y S F K L F I L			
	-	T I V I P I F V Y D T F I H L N Y L F C			
	-	L * * Y L S L F M I H L F I * I I Y F V			
1321	-	TTAATTTAACAGAAGTGGTAAAATGAAGATTAATGAATTACCTACAATTTGTTG		-	1380
	-	F N L T E L G E N E D I N E L P T I L L			
	-	L I * Q N * V K M K I L M N Y L Q F C *			
	-	* F N R T R * K * R Y * * I T Y N F V E			
1381	-	AGAAAAATGATTTGGACAAGATTATAGG	GACCTTATATCTCACACTAAAAATGGAAAT	-	1440
	-	R K N G K Y L D K I I G D L I S H T K N			
	-	E K M G N I W T R L * V T L Y L T L K I			
	-	K K W E I F G Q D Y R * P Y I S H * K Y			
1441	-	ATAAATATAATAACATAGAAGTGTCTTTTTCGTTCTATATATATATATATATATA		-	1500
	-	I N I I N I E V C L F R S I Y I Y I Y I			
	-	* I * * T * K C V F F V L Y I Y I Y I Y			
	-	K Y N K H R S V S F S F Y I Y I Y I Y I			
1501	-	TAATTTTTTCTTTTTTTTTAGGGATGAATGAGAGTGATTAATAAAAG	CCGTTGAAAAA	-	1560
	-	* F F S F F L G M N E S D L I K D V E K			
	-	N F F L F F * G * M R V I * * K P L K N			
	-	I F F F F F R D E * E * F N K S R * K T			
1561	-	CATCAGAGTGA	TTGATTACAAAAATTTGTATAAAGGGATTTTAAATGAACCTAGTTT	-	1620
	-	H Q S D * F T K I L Y K G I L K * T * F			
	-	I R V I D L Q K F C I K G F * N E P S L			
	-	S E * L I Y K N F V * R D F K M N L V *			

Abb. A2. Genomische Sequenz des Tlp2. Primer vA begann an Position 275. Grau: Primer v1; Hellgrün: Primer h1; Rot: Primer h2; Gelb: Primer v2; Grün: Aminosäure laut Vorhersage A. Magenta: orf. Fett: hier bearbeitete Tlp2-Sequenz.





Abb. A3. Alignment der Trx-Proteine aus Pf. Sterne zeigen Übereinstimmung, (Doppel-)Punkte (hohe) Ähnlichkeit an. Gelb unterlegt ist das Trx-active site-Motiv.

Konserviert in Säuger-Trx	PfTrx1	PfTrx2	PfTrx3
Phe-12	Phe-11	-	-
Pro-40	Pro-38	-	-
Asp-59	-	-	Asp-60
Lys-82	-	Lys-83	Lys-84
Ala-93	Ala-91 / Ala-95	Ala-91	-
Glu-57	-	-	Glu-58

Tabelle A2. Konservierte funktionale AS in Trx.

Position (AS)	Modifikation	Aminosäuremuster
2-9	Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle	KrtdDkiY
2-16	Tyrosin-Sulfatierungsstelle	krtddkiYvdinnee
11-25	Tyrosin-Sulfatierungsstelle	dinneeYknlfdk
75-77	Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle	SIK
109-112	Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle	SfiD

Tabelle A3. Mögliche posttranslationale Modifizierungsstellen in der Tlp1-Sequenz. Große Buchstaben bezeichnen die Consensus-Aminosäuren.

TMX	MAPSGSLAVPLAVLVLLWGA <b>PWTHG</b> RRSNVRVITDENWRELLEGD--WMIEFYAP <b>WCPA</b>
Tlp2	----MFFLQNLKKITHPKYLCTTIR-RNVYTELNKIDYLSKVNGNKLVAQFGAS <b>WCAP</b> : * :. :. : * . . . : : : : : * : * . * . * . .
TMX	<b>C</b> QNLQPEWESFAEWGEDLEVNIKVDVTEQPGLSGRFIITALPTIYHCKDGEFRRYQGPR
Tlp2	<b>C</b> KKMKPVIEKLGEDNDNIES--LYIDIDEFPELGENEDINELPTILLRKNK---KY---- * : : : * * . . . * : : : * : : : * * * . . * . * * * * * * * * * * * : *
TMX	TKKDFINFISDKEWKSIEPVSSWFGPGSVLMSSMSALFQLSMWIRTCHNYFIEDLGLPVW
Tlp2	-----
TMX	GSYTVFALATLFSGLLLGLCMIFVADCLCPSKRRRPQYPYPYPSKKLLSESAQPLKKVEEE
Tlp2	-----LDKIIGMNESDLIKAVEK . * : : . . . * * . * :
TMX	QEAEEDVSEEEAESKEGTNKDFPQNAIRQRSLGPSLATDKS
Tlp2	HQSD----- : : : *

**Abb. A4. Alignment des ER-Transmembranproteins TMX mit der PfTlp2-Sequenz.** Gelb unterlegt sind die Trx-active site-Motive, rote Unterlegung kennzeichnet das Signalpeptid des TMX.

Putative posttranslationale Modifikationen an Trx2		
Position (AS)	Modifikation	Aminosäuremuster
29-32 30-33 90-93 145-148	Caseinkinase-Phosphorylierungsstellen	StnD TndD TemD SsnD
58-61 113-116 133-136	N-Glycosylierungsstellen	NGSN NESL NKTM
99-102	Amidierungsstelle	yGKR
118-121	cAMP-/cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsstelle	RKfS
121-123	Proteinkinase C- Phosphorylierungsstelle	SvK

**Tabelle A4. Mögliche posttranslationale Modifikationen an PfTrx2 nach Vorhersage von Prosite.**

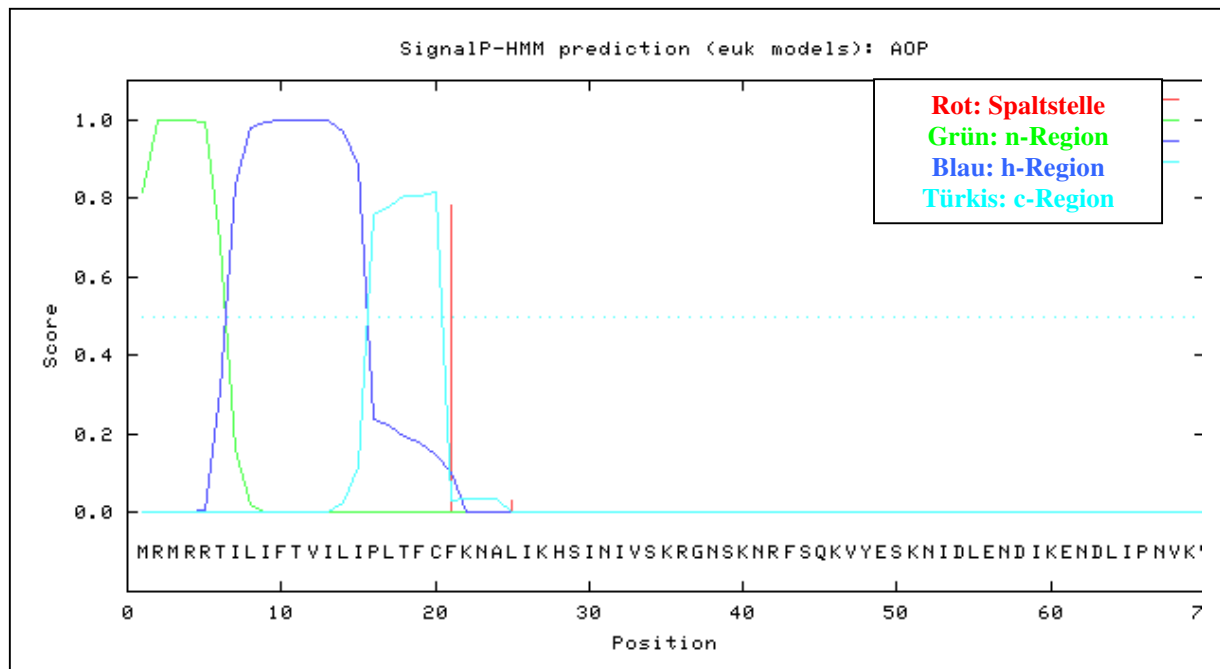
Putative posttranslationale Modifikationen an Trx3		
Position (AS)	Modifikation	Aminosäuremuster
62-69	Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle	Kql.EqsiY
87-90	N-Glycosylierungsstelle	NSSI
95-100 161-166	N-Myristoylierungsstelle	GAvwCK GAnqND
119-122	Caseinkinase-Phosphorylierungsstellen	TlvD

**Tabelle A5. Mögliche posttranslationale Modifikationen an PfTrx3 nach Vorhersage von Prosite.**

Tg	MNKRVYRFFSHSAGFKQTKFLLMTKTMAKALCCTATMATVALLATVLLGNLPAGSFSFVI	60
Pf	----- <u>MRMRRTILIFTVILIPLTF</u> CFKNALIKHSINIVSKRGN SKN-----	41
Py	----- <u>MKRIIFLIFPILLNVYL</u> CFKNLAHNKPLNFVSKRWNFNN-----	39
Vp	-----MFVSKEGQN	9
Vc	-----MRNTMFTSKEGQT	13
Pt	-----MAPIAVGDV	9
At	-----MAPIAVGDV	9
Hs	-----MAPIKVGDA	9
Tg	GTKAVGSVPLGSAASSGGMCSSVSGGPASVFSSSALKAAASALGSRSLAFAKTKTLSEGD	120
Pf	-----RFSQKVYESKNIDLENDIKENDL	64
Py	-----RFSHKLGESKNIDLANDIKENDL	62
	..	
Vp	VPQVTFPTRQ-----GDTWVNVTSDDLFGKKTIVIVFSL <u>PGAF</u> <b>TPTC</b>	50
Vc	IPQVTFPTRQ-----GDAWVNVTSDELFGKKTIVIVFSL <u>PGAF</u> <b>TPTC</b>	54
Pt	LPDGKLAYFDE-----QDQLQEVSVHSLVAGKKVILFGV <u>PGAF</u> <b>TPTC</b>	51
At	VPDGTISFFDE-----NDQLQTASVHSLAAGKKVILFGV <u>PGAF</u> <b>TPTC</b>	51
Hs	IP--AVEVFE-----GEPGNKVNLAELFKGKGVLFV <u>PGAF</u> <b>TPTC</b>	48
Tg	APECVWKVRAAAP-----EGGMTWAELESTMFKNKRVIIVFSL <u>PGAF</u> <b>TPTC</b>	166
Pf	IPNVKVMIDVRNM---NNISD TD---GSPNDFTSIDTHELFNNKILLISL <u>PGAF</u> <b>TPTC</b>	117
Py	IPNVKVMVDVGNIGIVNNFGEEEEKSSGEE SPFRSIDTHELFKSKRILLISL <u>PGAF</u> <b>TPLC</b>	122
	* : .* ::::***** *	
Vp	SSSHLPRYNELFP-VFKEHGVDEILCISVNDAFVMNAWKHDQ-EAEHITFIPDGNGEFTD	108
Vc	SSTHLPRYNELFP-VFKEHGVDSILCVSVNDTFVMNAWKDDQ-NADNITFIPDGNGEFTD	112
Pt	SLKHVPGFIEKAG-ELKSKGVTEILCISVNDPFVMKAWAKSYENKHVKFLADGSATYTH	110
At	SMKHVPGFIEKAE-ELKSKGVDEICFSVNDPFVMKAWGKTYENKHVKFVADGSGEYTH	110
Hs	SKTHLPGFVEQAE-ALKAKGVQVACLSVNDAFVTGEWGRAHKAEGKVRLADPTGAFGK	107
Tg	SSRHLPDFDKEYD-AIRALGIDEVYCLSVNDTFVMNAWASSL-NVKHVKMIPDGNGCFTS	224
Pf	STKMIPGYEEYDYFIKENNFDDIYCITNNDIYVLKSWFKSM-DIKKIKYISDGNSSFTE	176
Py	TSKMIPYEYKEYDNFIRENKFDDIYCITNNDIYVLKSWFKSM-DIKKIKYISDGNSSFTE	181
	: :* : : :: . : * : * : * * : : : : * . . . :	
Vp	GMGMLVD--KNDIGFGKR <sup>SW</sup> <b>RY</b> SMLVKDGVIEKMFIEPNE----PGDPFKVSDADTMLNY	162
Vc	GMGMLVD--KNDLGFGR <sup>SW</sup> <b>RY</b> SMLVKDGVVEKMFIEPNE----PGDPFKVSDADTMLKY	166
Pt	ALGLELD--LQEKGLGTR <sup>SR</sup> <b>RF</b> FALLVDDLKVKAAANIEG-----GGE-FTVSSAEDILKD	161
At	LLGLELD--LKDKGLGVR <sup>SR</sup> <b>RF</b> FALLLDDLKVTVANVES-----GGE-FTVSSADDILKA	161
Hs	ETDLLLDDSLVSIFGNRRLK <sup>RF</sup> SMVVDGIVKALNVEP-----DGTGLTCSLAPNIISQ	161
Tg	KMGMLVD--KTNLGFGR <sup>SW</sup> <b>RY</b> AMVVRNGTIEKLLVEPEKRDDAEDDPFVASDVASVLKY	282
Pf	SMNMLVD--KSNFFMGR <sup>PW</sup> <b>RF</b> VAIVENNILVKMFQEKDKQHNIQTDYPDISTVNNVKEF	234
Py	SMNMLVD--KSNYFMGR <sup>PW</sup> <b>RF</b> VAIVENNILIKIFQENEKQHNIQTDYPDISSVDHVKEF	239
	:: :* . . * * : : : : * * . . . :	
Vp	IAPEYRTQESITVFTKPGCF <sup>CM</sup> KAKQNLIDHGLQYEEVILGKDATSVSLRAITGR <sup>TT</sup> VP	222
Vc	IAPQYKVQESVITFTKPGCPY <sup>CA</sup> KAKQALIDAGLQYEEVILGKDATTVSLRAVSGR <sup>TT</sup> VP	226
Pt	L-----	162
At	L-----	162
Hs	L-----	162
Tg	LRDSADVKG A-----	292
Pf	LKNNQL-----	240
Py	LKHNKI-----	245
	:	
Vp	QVFIGGKHIGGSEELETYLG-	242
Vc	QVFIGGKHIGGSDDLEVYLNQ	247

**Abb. A5. Multialignment von PfAOP mit einigen Typ V-Prx.** Die putativen Signalsequenzen der *Plasmodium*-Orthologe sind grau unterlegt. Stabile Expression und Prx-Aktivität wurde mit der Pf-AOP-Sequenz ab K60 erzielt (AOPsk). Die Proteine aus *Vibrio* stellen Hybridproteine eines PrxV mit einer C-terminalen Grx-Domäne dar, die *active site* des Grx ist unterstrichen. In Prx konservierte Reste sind fettgedruckt, die hochkonservierten Cysteinreste gelb unterlegt. Das C<sub>R</sub> der Säuger-PrxV ist grau unterlegt. Pf, *Plasmodium falciparum* (acc. no. AY306209); Py, *P. yoelii* (acc. no. EAA20812); Hs, man (acc. no. AAF27531); Pt, *Populus tremula* (acc. no. AAL90751); At, *Arabidopsis thaliana* (acc. no. AAD28242); Vc,

*Vibrio cholerae* (acc. no. AAF95778); Vp, *Vibrio parahaemolyticus* (acc. no. BAC61016); Tg, *Toxoplasma gondii* (ToxoDB: TgTwinScan\_3569).



**Abb. A6. Regionen und Spaltstelle des putativen Signalpeptids von PFAOP nach der Analyse von SignalP.** Score: von 0 = nicht wahrscheinlich bis 1 = sehr wahrscheinlich.

Pt	-----MAPIA	5
Hs	-----MAPIK	5
Pf	<u>MRMRRILIFTVILIP LTF C FKNALIKHSINIVSKRGNSKNRFSQKVYESKNIDL ENDIK</u>	60
PfTPx1	-----MASYV	5
Pt	VGDVLPDGKLAYFDE-----QDQLQEVSVHSLVAGKKVILFGV <b>P</b> GAF <b>TPT</b> C <b>S</b> SLK	54
Hs	VGDAIP--AVEVFE-----GEPGNKVNLAELFKGKKGVLF <b>P</b> GAF <b>TPG</b> C <b>S</b> SKT	51
Pf	ENDLIPNVKVMIDVRNMNISD TDGSPNDFTSIDTHELFNKKILLISL <b>P</b> GAF <b>TPT</b> C <b>S</b> TK	120
PfTPx1	GREAPYFKAEAVFAD-----NTFGEVNLHDFIGKKYVLLYFY <b>P</b> LDF <b>TFV</b> C <b>P</b> SE	53
Pt	HVPGFIEKAGELKSKG-VTEIL <b>C</b> ISVNDPFVMKAWAKSYENKHVKFLADGSATYTHALG	113
Hs	HLPGFVEQAEALKAG-VQVVA <b>C</b> LSVNDAFVTGEWGRAHKAEGKVRLADPTGAFGKETD	110
Pf	MIPGYEEYDYFIKENNFDDI <b>C</b> ITNNDIYVLKSWFKSMDIK-KIKYISDGNSSFTESMN	179
PfTPx1	IIA-LDKALDAFKERN-VELIG <b>C</b> S-VDSKYTHLAWKKTPLTKGGIGNIQHTLISDITKSI	110
Pt	LELDLQEKGLG--TRSR <b>R</b> FALLVDD-LKVKAANIEGGGE-FTVSSAEDILKDL	162
Hs	LLDDSLVSIFGNRRLK <b>R</b> FSMVVQD-GIVKALNVEPDGTGLT- <b>C</b> SLAPNIISQL	162
Pf	MLVDKSNFFMG--MRPW <b>R</b> FVAIVENNILVKMFQ-EKDKQHNIQTDYPDISTVNNVKEFLKNNQL	240
PfTPx1	SRSYNVL---FGDSVSL <b>R</b> AFVLIDKQGVVQHLLVNNLAIGRSVEEVLRIIDAVQHHEQHG	167
PfTPx1	DV <b>C</b> PANWKKGKVAMKPSEEGVSEYLSKL	195

**Abb. A7. Aminosäuresequenzvergleich verschiedener Typ V-Prx mit PfTPx1.**

Die unterstrichene Sequenz von *P. falciparum* (59 Aminosäuren) zeigt die mögliche zweiteilige Signalsequenz für den Transport in den Apicoplasten (zur stabileren heterologen Expression wurde Pf-PrxV (AOP) ab K60 exprimiert). Die in allen Peroxiredoxinen konservierten Reste sind durch Fettdruck hervorgehoben, die Cystein-Reste sind gelb markiert.

Pf, *Plasmodium falciparum* (acc. no. AY306209); Hs, man (acc. no. AAF27531); Pt, *Populus tremula* (acc. no. AAL90751); PfTPx1 (acc. no. AAF67110).

## Danksagungen

Bedanken möchte ich mich bei...

- ...Frau Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg für die Überlassung des Themas. Besonders herzlichen Dank für die stets offene Tür zu Deinem Büro trotz vollem Terminkalender und für die vielen fachlich und menschlich guten Gespräche.
- ...Frau Prof. Dr. Gabriele Klug für die Übernahme der Erstbegutachtung. Vielen Dank für die unkomplizierten Gespräche und konstruktiven Hilfestellungen.
- ...den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Leann Tilley, Dr. D. Soldati und Dr. F. Bernhard für die gute Kooperation.
- ...Herrn Dr. Stefan Rahlfs für die Rund-um-die-(Labor-)Uhr-Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für jedes „Komm rein“, wenn ich mal wieder mit einem seltsamen Gelfoto an der Tür stand. Danke für Deinen Optimismus trotz zig leerer PCR-Spuren und Plasmid-Preps!
- ...Frau Dr. Angelika Irmeler für die nette Zeit als Schreibtischnachbarn und alle aufmunternden Worte zwischen „Ratschen“ und Zentrifugieren! Danke ebenso für die geduldige Anleitung und Unterstützung bei der FPLC!
- ...Marina, Elisabeth, Beate, Petra, Tamara und Marita für Messungen, Expressionen, Kristallansätze und spontane Hilfeleistungen, wenn ich mir wie so oft viel zu viel vorgenommen hatte.
- ...Uli für zig Insulin-Assay- und andere Kurven und viele Hilfestellungen bei Computer-Problemen.
- ...Julia, Marcel, Monique, Sabine, Sasa und Solange für die nette Atmosphäre, viele konstruktive Gespräche und gute Zusammenarbeit. Dir, Monique, danke für Deine ruhige Art, die über unsere Schreibtische auf mich übersprang. Danke auch für die unterhaltsamen Plaudereien über Bananenblätter uvm.
- ...Annette und Doris für alle Hilfe bei formalen Dingen und manchen netten Plausch.
- ...allen AG-Mitgliedern für das gute Miteinander in der Gruppe. Entschuldigt bitte, wo immer ich Eure Hilfsbereitschaft nicht erwidert habe („...tut mir leid, ich muss ganz dringend zum Zug...“)
- ...Katrin und Gerson für Formatierung, Service-Hotline und Erfrischungstücher. Was hätte ich ohne Euch gemacht?
- ...meinen Eltern für die jederzeit volle Unterstützung jeder Art. Danke, dass Ihr mein so oft stress-geprägtes Verhalten ertragen habt!
- ...Dirk, dafür, dass Du mich hast machen lassen, wenn Du auch einiges, v. a. meine emotionale Beteiligung, oft nicht nachvollziehen konntest. Danke für Deine Geduld, obwohl so viel unserer gemeinsamen Zeit am Computer drauf ging („Du bist (dr)üben? Ich bin hier – o.k.“).
- ...Dirk und Nils, dass Ihr mir gezeigt habt, dass andere Dinge wichtiger sind!
- ...meinem himmlischen Vater, der mich so gut kennt und mich trotzdem lieb hat!

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden, wo sie aufhört.“

(Justus Freiherr von Liebig)

