

Das
Selenoproteom
des Malariaerregers
Plasmodium falciparum

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

eingereicht von

Dipl. Biol. Anne Röseler
aus Burg

angefertigt an der Professur für
Biochemie der Ernährung des Menschen,
Interdisziplinäres Forschungszentrum,
Justus-Liebig-Universität Gießen,
unter der Leitung von Prof. Dr. Katja Becker.

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Katja Becker
 2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Gabriele Klug
- Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt
Prof. Dr. Albrecht Bindereif

Tag der Disputation: 07.10.2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Frau **Prof. Katja Becker** für die Betreuung und Bereitstellung meiner Doktorarbeit bedanken. Ohne das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch danke ich Frau **Prof. Gabriele Klug** für die Co-Betreuung meiner Arbeit sowie für die netten Worte und konstruktiven Hilfestellungen.

Lieber **Stefan**, du bist ein Trumpf in der AG. Danke für dein stets offenes Ohr und für die Hilfsbereitschaft bei allen möglichen und unmöglichen Fragen.

Ohne **Beate** und **Rimma** wären viele Daten zu *PfSel1* und *PfSel4* nicht möglich gewesen. Danke für eure Ausdauer, Elan und Motivation.

In diesem Zuge danke ich auch meinen beiden erfolgreich studierten Masterstudenten **Nicole** und **Raphael**. Auch euch danke ich für eure Motivation und Elan sowie für den Input den Ihr dem Selenoprotein-Projekt gegeben habt. Raphael, danke für die vielen netten und aufbauenden Worte im Labor. Ich hoffe, ich bin zu deiner Nobelpreis-Verleihung eingeladen. Nicole, vielen Dank für eine Menge toller (realistischer) Gespräche: „Der Mann der Wissenschaft muß ständig bemüht sein, an seinen eigenen Wahrheiten zu zweifeln.“ (José Ortega y Gasset).

Elisabeth, Marina und **Anette** möchte ich für die experimentelle Unterstützung im Labor danken. Für eine tolle Atmosphäre und manch einen Lacher im Büro und Labor danke ich **Sebastian** und **Esther**.

Allen **Mitarbeitern der AG Becker**, deren Wege sich im Laufe der drei Jahre mit meinem gekreuzt haben, möchte ich für drei inspirierende Jahre danken.

Ein großer spezieller Dank geht an **Bork** und **Aaron** aus der AG Klug für euer Verständnis und die Kooperation für den wochenlang stark gefüllten qRT-PCR-Plan in den letzten Zügen meiner Laborarbeiten.

Julia, Artur und **Lara; Gert** und **Gaby; Kathrin** und **Fabian**: Vielen Dank für die schöne gemeinsame Zeit - Spieleabende, Badminton, Kino und Co. Ich hoffe, wir werden noch viele gemeinsame Stunden verbringen.

Auch wenn wir etliche Hunderte an Kilometern voneinander entfernt sind und wir uns nur sehr selten sehen, sind mir meine Freundschaften zu **Vangelis, Jana** und **René** sowie **Kat** sehr wichtig. Danke für eure Unterstützung, offenen Ohren und Arme.

Ein großer Dank geht an meine **Familie**, insbesondere meinen **Eltern** für die immerwährende Unterstützung.

Ein besonderer Dank gebührt **Markus**. Danke, dass du mich so sehr unterstützt und hinter mir stehst: „Liebe besteht nicht darin, dass man einander anschaut, sondern dass man gemeinsam in dieselbe Richtung blickt.“ (Antoine de Saint-Exupéry).

Publikationen

Mecklenburg, S., Shaaban, S., Ba, L. A., Burkholz, T., Schneider, T., Diesel, B., Kiemer, A. K., **Roseler, A.**, Becker, K., Reichrath, J., Stark, A., Tilgen, W., Abbas, M., Wessjohann, L. A., Sasse, F., and Jacob, C. (2009) Exploring synthetic avenues for the effective synthesis of selenium- and tellurium-containing multifunctional redox agents. *Org Biomol Chem* 7, 4753-62

Tripathi, T., **Roseler, A.**, Rahlfs, S., Becker, K., and Bhakuni, V. (2009) Conformational stability and energetics of *Plasmodium falciparum* glutaredoxin. *Biochimie* 92, 284-91

Roseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Hecker, B., Ronzheimer, N., Eberle, R., Przyborski, J. M., Becker, K. (In Vorbereitung) Insight into the selenoproteome of *Plasmodium falciparum*.

Vorträge

Röseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Hecker, B., and Becker, K. (2008) Selenoproteins in *Plasmodium falciparum*. 23. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg

Röseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Kazosi, D. M., Hecker, B., and Becker, K. (2009) The selenoproteome of *Plasmodium falciparum* as potential drug target. 10th Drug Development Seminar, Rauschholzhausen

Röseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Hecker, B., and Becker, K. (2009) Selenoproteins in *Plasmodium falciparum*. 2nd Annual Conference of the International Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL), Giessen

Röseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Hecker, B., and Becker, K. (2009) Four unique selenoproteins in *Plasmodium falciparum*. "New Trends in Infectious Diseases" - 5th joint Ph.D Students Meeting of the Collaborative Research Centres SFB 544 Heidelberg and SFB 630 Würzburg, Heidelberg

Poster

Röseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Hecker, B., and Becker, K. (2008). Selenoproteins in *Plasmodium falciparum*. *1st Annual Conference of the International Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL)*, Giessen.

Röseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Hecker, B., and Becker, K (2008) Selenoproteins in *Plasmodium falciparum*. *6. Jahrestreffen der AG Malaria der Paul-Ehrlich-Gesellschaft in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit*, Tübingen

Röseler, A., Rahlfs, S., Iozef, R., Hecker, B., and Becker, K.. (2009) Selenoproteins in *Plasmodium falciparum*. *5th Annual BioMalPar Conference on the Biology and Pathology of the Malaria Parasite*, Heidelberg

***“Malaria is
[...] a thousand different
diseases and epidemiological puzzles.
Like chess, it is played with a few pieces,
but is capable of an infinite variety of situations.”***

(L. W. Hackett in *Malaria in Europe, An Ecological Study*, 1937)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	XIII
Summary.....	XV
1 Einleitung	XV
1.1 Malaria	1
1.1.1 Verbreitung und Bedeutung der Malaria	1
1.1.2 Erreger, Krankheitsbild und Vektor.....	3
1.1.3 Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	6
1.1.4 Medikamente, Resistenzen und Vakzine.....	8
1.2 Entwicklung neuer Wirkstoffe	12
1.3 Oxidativer Stress.....	13
1.3.1 Oxidativer Stress in <i>Plasmodium</i>	13
1.3.2 Antioxidative Abwehr in <i>Plasmodium</i>	14
1.4 Selenoproteine	15
1.4.1 Selen und Selenoproteine	15
1.4.2 Biosynthese der Selenoproteine.....	16
1.4.3 Selenoproteine in <i>Plasmodium</i>	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Größenstandards	27
2.1.5 Kits für die Proteinbiochemie und Molekularbiologie	27
2.1.6 Enzyme.....	28

2.1.7	Antikörper.....	28
2.1.8	Säulenmaterial für Affinitäts-Chromatographie	28
2.1.9	Antibiotika	29
2.1.10	Plasmide	29
2.1.11	Organismen	29
2.1.11.1	<i>E. coli</i> -Stämme.....	29
2.1.11.2	<i>P. falciparum</i> -Stamm.....	30
2.1.12	Puffer und Lösungen.....	30
2.1.12.1	Puffer für die SDS-PAGE	30
2.1.12.2	Puffer für den Western Blot.....	31
2.1.12.3	Puffer für die DNA-Elektrophorese.....	31
2.1.12.4	Puffer für die Proteinaufreinigung.....	31
2.1.12.5	Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen	31
2.1.12.6	Puffer für Assays.....	32
2.1.12.7	Puffer für SDS-Polyacrylamidgele	32
2.1.12.8	Puffer für die Zellkultur	33
2.1.12.9	Stammlösungen	34
2.1.13	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	34
2.1.14	Oligonukleotide	35
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1.1	Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren.....	38
2.2.1.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.2.1.1.2	Alkohol-Fällung von DNA.....	39
2.2.1.1.3	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA	39
2.2.1.1.4	Sequenzierungen und Auswertungen der Sequenzen	39
2.2.1.1.5	Gelelektrophorese von DNA	39
2.2.1.1.6	Gelextraktion	40
2.2.1.1.7	Transkriptionsprofiling.....	40
2.2.1.1.8	Isolierung von RNA.....	40
2.2.1.1.9	hcDNase und RNA-CleanUp	40
2.2.1.1.10	cDNA-Synthese	41
2.2.1.1.11	Quantitative <i>real time</i> -PCR	41
2.2.1.1.12	Auswertung der qRT-PCR	42
2.2.1.1.13	RT-PCR.....	43
2.2.1.2	<i>In vitro</i> -Modifikationen und Rekombinationen von DNA.....	43
2.2.1.2.1	Herstellung von C-terminal GFP-getaggten <i>PfSel</i> -Konstrukten.....	43

2.2.1.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
2.2.1.2.3	Gerichtete Mutagenese	44
2.2.1.2.4	DNA-Restriktion.....	45
2.2.1.2.4.1	<i>Bgl</i> II- und <i>Xma</i> I-Restriktion.....	45
2.2.1.2.4.2	<i>Xho</i> I-Restriktion.....	46
2.2.1.2.4.3	<i>Dpn</i> I-Restriktion	46
2.2.1.2.5	Dephosphorylierung.....	46
2.2.1.2.6	Reinigung des PCR-Produktes	46
2.2.1.2.7	Ligation.....	47
2.2.1.2.8	Gensynthese	47
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	47
2.2.2.1	Flüssigkulturen von <i>E. coli</i>	47
2.2.2.2	Plattenkulturen von <i>E. coli</i>	48
2.2.2.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	48
2.2.2.3.1	Chemisch-kompetente Zellen mittels Schwermetallen	48
2.2.2.3.2	Chemisch-kompetente Zellen mittels Calciumchlorid	48
2.2.2.4	Transformation und Selektion positiver Klone	49
2.2.2.5	Heterologe Überexpression.....	49
2.2.2.5.1	Heterologe Überexpression der <i>PfSel</i> 1 Cysteinmutante	50
2.2.2.5.2	Heterologe Überexpression der <i>PfSel</i> 2 Cysteinmutante	50
2.2.2.5.3	Heterologe Überexpression des <i>PfSel</i> 2 Wildtyps.....	50
2.2.2.5.4	Heterologe Überexpression der <i>PfSel</i> 3 Cysteinmutante	50
2.2.2.5.5	Heterologe Überexpression der <i>PfSel</i> 4 Cysteinmutante	51
2.2.3	Methodik <i>Plasmodium falciparum</i>	51
2.2.3.1	Mikroskopische Darstellung von <i>P. falciparum</i> mittels Giemsa-Färbung.....	51
2.2.3.2	Bestimmung der Parasitämie und Zellzahl	51
2.2.3.2.1	Mittels Giemsa-gefärbten Ausstrichen	51
2.2.3.2.2	Mittels einer Neubauer- <i>improved</i> Zählkammer	52
2.2.3.3	Morphologische Untersuchungen.....	52
2.2.3.4	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7-Zellkultur	52
2.2.3.5	Synchronisation mittels Sorbitol	52
2.2.3.6	Transfektion von <i>P. falciparum</i> mittels Elektroporation und Selektion.....	53
2.2.3.7	GFP-Lokalisationsstudien und Immunfluoreszenz.....	53
2.2.3.8	Methylenblau-, SNP-, Paraquat- und Natrium-Selenit-Behandlung	53
2.2.3.9	Ernte von <i>P. falciparum</i>	54
2.2.3.10	Calcium-Assay	54
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	56

2.2.4.1	Reinigung von Proteinen.....	56
2.2.4.1.1	Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus <i>P. falciparum</i>	56
2.2.4.1.2	Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus <i>E. coli</i>	56
2.2.4.1.3	Proteinreinigung	56
2.2.4.1.3.1	Affinitätschromatographie.....	56
2.2.4.1.3.1.1	Affinitätschromatographie mittels PolyHis-Tag.....	56
2.2.4.1.3.1.1.1	Reinigung von <i>PfSel1</i>	57
2.2.4.1.3.1.1.2	Reinigung von <i>PfSel2</i>	57
2.2.4.1.3.1.1.3	Reinigung von <i>PfSel3</i>	58
2.2.4.1.3.1.1.4	Reinigung von <i>PfSel4</i>	58
2.2.4.1.3.1.2	Affinitätschromatographie mittels PAO-Sepharose	58
2.2.4.1.3.2	Gelfiltrations-Chromatographie.....	58
2.2.4.1.4	Aufkonzentrierung.....	59
2.2.4.1.5	Dialyse.....	59
2.2.4.2	Proteinanalysen	59
2.2.4.2.1	Proteinbestimmung nach BRADFORD.....	59
2.2.4.2.2	SDS-PAGE.....	60
2.2.4.2.3	Western Blot.....	60
2.2.4.2.4	Redox-aktive Assays	62
2.2.4.2.4.1	Insulin-Assay.....	62
2.2.4.2.4.2	<i>Protection-Assay</i>	62
2.2.4.2.5	PolyHis-Tag- <i>pull-down-Assay</i>	63
2.2.4.2.6	Quervernetzung mittels Dimethyladipimidatdihydrochlorid.....	64
2.2.4.2.7	Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS	64
2.2.4.3	Herstellung von Antikörpern	64
2.2.4.3.1	Antikörper gegen das gesamte Protein.....	64
2.2.4.3.2	Peptid-Antikörper für <i>PfSel3</i>	65
2.2.5	Bioinformatische Analysen.....	65
2.2.5.1	BLAST-Suche	65
2.2.5.2	Alignment.....	66
2.2.5.3	Phylogenetische Stammbäume.....	66
2.2.5.4	Meta-Analyse	66
2.2.5.5	Identifizierung von Motiven und Signalsequenzen.....	66
2.2.5.6	Hydrophobizitäts-Plot	67
2.2.5.7	Mutanten-Nomenklatur.....	67
3	Ergebnisse.....	68
3.1	Alignments	68

3.2	Phylogenetische Bäume.....	71
3.3	Motiv Scan	75
3.4	Heterologe Überexpression.....	78
3.5	Oligomerisierung von <i>PfSel1</i> und <i>PfSel2</i>	80
3.6	Redoxaktive Assays	81
3.7	Interaktomanalysen <i>PfSel1</i> und <i>PfSel4</i>	81
3.8	Lokalisationsstudien	82
3.9	Calcium-Assay	85
3.10	RT-PCR	85
3.11	Transkriptionsprofiling	86
3.11.1	Nach Natrium-Selenit-Zugabe	86
3.11.1.1	Selenoproteine	86
3.11.1.2	Faktoren, die an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligt sind	87
3.11.2	Nach SNP-, MB- und Paraquat-Zugabe	89
3.11.2.1	Selenoproteine	89
3.11.2.2	Faktoren, die an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligt sind	91
3.11.2.3	Redox-aktive plasmodiale Proteine	92
3.12	Morphologische Untersuchungen.....	94
4	Diskussion.....	95
4.1	<i>PfSel1</i> als ein SelK-Homologon	95
4.2	<i>PfSel2</i> als ein SelT-Homologon.....	98
4.3	<i>PfSel3</i> : duale Funktion?	104
4.4	<i>PfSel4</i> als ein SelS-Homologon	106
4.5	Biosynthesemaschinerie von Selenoproteinen	109
4.6	Regulation redoxaktiver Proteine im Vergleich der Selenoproteine	110
5	Literaturverzeichnis	111

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Malaria-Verbreitung zwischen der Mitte des 19. Jahrhunderts und 2007.....	2
Abb. 1.2 Weltweite Verbreitung von <i>Plasmodium falciparum</i> und <i>Plasmodium vivax</i>	4
Abb. 1.3 Weltweite Verbreitung einiger dominanter oder potenzieller Malaria-Vektoren.	5
Abb. 1.4 Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	8
Abb. 1.5 Stufen des Wirkstoff- <i>Research- & Discovery</i> -Prozesses.	13
Abb. 1.6 Übersicht redox-aktiver Stoffwechselwege in <i>Plasmodium</i>	14
Abb. 1.7 Synthese von Sec an seiner tRNA ^{ser[sec]}	17
Abb. 1.8 Die zwei verschiedenen Typen der eukaryotischen SECIS-Elemente.	18
Abb. 1.9 Die Proteinkomplexe während der Selenoprotein-Biosynthese.	19
Abb. 1.10 Die Genorganisation der plasmodialen Selenoproteine.	20
Abb. 1.11 Organisation des Selenocysteins in den plasmodialen Selenoproteinen.	21
Abb. 2.1 Aufbau eines <i>semidry</i> -Western Blots.....	61
Abb. 3.1 Alignment von PfSel1 mit hSelK.	69
Abb. 3.2 Alignment von PfSel1 mit SelK von <i>Toxoplasma gondii</i>	69
Abb. 3.3 Alignment von PfSel2 mit hSelT.	71
Abb. 3.4 Alignment von PfSel4 mit hSelS.	71
Abb. 3.5 Kladogramm von PfSel1 und SelK-Sequenzen.	72
Abb. 3.6 Kladogramm von PfSel2 und SelT-Sequenzen.....	73
Abb. 3.7 Kladogramm von PfSel4 und SelS-Sequenzen.	74
Abb. 3.8 Kladogramm aller plasmodialen Selenoproteine und verschiedenen Sel-Sequenzen unterschiedlicher Organismen.....	75
Abb. 3.9 Diagramm zur Hydrophobizität in PfSel2 und der Ratten-SelT.	76
Abb. 3.10 Rekombinante plasmodiale Selenoproteine nach Überexpression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	79
Abb. 3.11 <i>Protection</i> -Assay mit PfSel1 und PfSel4.....	81
Abb. 3.12 <i>Pull-down</i> -Assays mit PfSel1:p.115u>c und PfSel4:p.133u>c.	82
Abb. 3.13 Lokalisationsstudie zu PfSel1, PfSel2 und PfSel4.	83
Abb. 3.14 Lokalisationsstudien zu PfSel3.....	84
Abb. 3.15 Messung der freien intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration in <i>P. falciparum</i> nach PfSel2 Überexpression.	85
Abb. 3.16 Transkriptionsprofiling plasmodialer Selenoproteine nach Zugabe von Natriumselenit.	88
Abb. 3.17 Transkriptionsprofiling plasmodialer Selenoproteine und Faktoren, die an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligt sind, nach Zugabe von SNP, Paraquat und Methylenblau.....	90
Abb. 3.18 Transkriptionsprofiling plasmodialer redox-aktiver Proteine nach Zugabe von SNP, Paraquat und Methylenblau.....	93

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Die humanen Selenoproteine und ihre Funktionen.	16
Tab. 2.1 Verwendete <i>primer</i> für qRT-PCR.....	35
Tab. 2.2 Verwendete <i>primer</i> für RT-PCR.....	37
Tab. 2.3 Verwendete <i>primer</i> für GFP-Konstrukte.....	37
Tab. 2.4 Pipettierschema für eine PCR.	44
Tab. 2.5 Programmschritte einer PCR.....	44
Tab. 2.6 Pipettierschema einer gerichteten Mutagenese.....	45
Tab. 2.7 Programmschritte einer gerichteten Mutagenese.	45
Tab. 3.1 Ähnlichkeit von <i>PfSel1</i> zu verschiedenen SelK-Sequenzen.....	70
Tab. 3.3 Ähnlichkeit von <i>PfSel2</i> zu verschiedenen SelT-Sequenzen.....	70
Tab. 3.4 Ähnlichkeit von <i>PfSel4</i> zu verschiedenen SelS-Sequenzen.....	70

Abkürzungsverzeichnis

(w/v)	Gewichtsvolumenprozent
[Ca ²⁺] _i	Konzentration an intrazellulären freiem Calcium
[x]	Konzentration an x
+TG1	Puffer mit 50 mM HEPES, 500 mM KCl, 10 % Glycerin, 0,1 % Triton X-100
+TG2	Puffer mit 50 mM HEPES, 500 mM KCl, 1 % Glycerin, 0,1 % Triton X-100
18s	18s rRNA
<i>A. bidest</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
<i>A. dest</i>	<i>Aqua destillata</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
ACT	<i>Artemisinin-based combination treatment</i>
AOP	<i>Anti-oxidant protein</i>
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
atRNAsyn	Arginyl-tRNA-Synthetase
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. intestinalis</i>	<i>Ciona intestinalis</i>
<i>C. muris</i>	<i>Cryptosporidium muris</i>
<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
cDNA	<i>complementary-DNA</i> (komplementäre DNA)
CQ	Chloroquin
CT	<i>cycle threshold</i>
C-Term	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
dd	doppelt destilliert

Abkürzungsverzeichnis

del.	Deletion
DIO	Deiodinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
<i>Ec / E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSec	Sec-spezifischer Elongationsfaktor
ELM	<i>Eukaryotic Linear Motif</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GS	Glutamin-Synthetase
GSH	Glutathion = γ -Glutamylcysteinylglycin (reduziert)
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
gtRNAsyn	Glutaminyl-tRNA-Synthetase
h	human
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
hcDNase	<i>high concentrated DNase I</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IC50	halbmaximale inhibitorische Konzentration eines Inhibitors
Indo-1/AM	Indo-1/Acetoxy-methylester
kb	Kilo-Basen
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LDH	Lactat-Dehydrogenase
<i>Lm / L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>M. pusilla</i>	<i>Micromonas pusilla</i>
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry</i>
MB	Methylenblau

Abkürzungsverzeichnis

mcm ⁵ Um	Methoxycarbonylmethyl-2'-O-Methyluridin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<i>N. mobilis</i>	<i>Nitrosococcus mobilis</i>
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
<i>Nc / N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF	Normfaktor
NLS	Kernimportsequenz (<i>nuclear localization sequence</i>)
NO	Stickstoffmonoxid
N-Term	Amino-Terminus
<i>O. mordax</i>	<i>Osmerus mordax</i>
OD	optische Dichte
P	Paraquat
PATS	<i>Prediction of apicoplast targeted sequences</i>
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. yoelii</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>Pc / P. humanus</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>Pf / P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfSel</i>	plasmodiales Selenoprotein
<i>PfSel1:c.345A>T</i>	auf cDNA des <i>PfSel1</i> -Gens ist das Adenin an Position 345 zu Thymin mutiert, daraus resultiert ein Cys-Codon, das SECIS-Element wurde deletiert, entspricht <i>PfSel1c</i>
<i>PfSel1:c.del.SECIS</i>	auf der cDNA des <i>PfSel1</i> -Gens wurde das SECIS-Element deletiert
<i>PfSel1c</i>	siehe <i>PfSel1:c.345A>T</i>
<i>PfSel2:c.216A>T</i>	auf cDNA des <i>PfSel2</i> -Gens ist das Adenin an Position 216 zu Thymin mutiert, daraus resultiert ein Cys-Codon, das SECIS-Element wurde deletiert, entspricht <i>PfSel2c</i>
<i>PfSel2:c.del.SECIS</i>	auf der cDNA des <i>PfSel2</i> -Gens wurde das SECIS-Element deletiert
<i>PfSel2c</i>	siehe <i>PfSel2:c.216A>T</i>
<i>PfSel3:c.78A>G</i>	auf cDNA des <i>PfSel3</i> -Gens ist das Adenin an Position 78 zu

	Guanin mutiert, daraus resultiert ein Trp-Codon, das SECIS-Element wurde deletiert
<i>PfSel3:c.78A>T</i>	auf cDNA des <i>PfSel3</i> -Gens ist das Adenin an Position 78 zu Thymin mutiert, daraus resultiert ein Cys-Codon, das SECIS-Element wurde deletiert, entspricht <i>PfSel3c</i>
<i>PfSel3:c.del.SECIS</i>	auf der cDNA des <i>PfSel3</i> -Gens wurde das SECIS-Element deletiert
<i>PfSel3c</i>	siehe <i>PfSel3:c.78A>T</i>
<i>PfSel4:c.400A>T</i>	auf cDNA des <i>PfSel4</i> -Gens ist das Adenin an Position 400 zu Thymin mutiert, daraus resultiert ein Cys-Codon, das SECIS-Element wurde deletiert, entspricht <i>PfSel4c</i>
<i>PfSel4:c.del.SECIS</i>	auf der cDNA des <i>PfSel4</i> -Gens wurde das SECIS-Element deletiert
<i>PfSel4c</i>	siehe <i>PfSel4:c.400A>T</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> DNA-Polymerase
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , pH-Wert
pI	Isoelektrischer Punkt
Plrx	Plasmoredoxin
Prx	Peroxiredoxin
PSTK	Phosphoseryl-tRNA-Kinase
PV	Parasitäre Vakuole
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -Polymerasekettenreaktion
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
r <i>PfSel</i>	rekombinantes <i>PfSel</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
<i>S. salar</i>	<i>Salmo salar</i>
SBP	SECIS-binding protein
SDS	Sodiumlauryldodecylsulfat (Natriumsulfat)
Se	Natriumselenit
Sec	Selenocystein

Abkürzungsverzeichnis

SECIS	Selenocystein Insertionssequenz
Sel	Selenoprotein
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SGC	<i>Structural Genomics Consortium</i>
SLA	<i>soluble liver antigen</i>
SNP	Natriumnitroprussid
SP	Signalpeptid
Sp1	<i>stimulating factor 1</i>
SPS	Selenophosphat-Synthetase
SpSp	Spatelspitze
SRE	<i>Sec redefinition element</i>
stRNAsyn	Seryl-tRNA-Synthetase
SV	Säulenvolumen
<i>T. guttata</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tb / T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TD	Transmembran-Domäne
<i>Tg / T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tlp	Thioredoxin-ähnliche Proteine (<i>Trx-like protein</i>)
TPx	Thioredoxinperoxidase
TPxGl	Glutathionperoxidase-ähnliche Thioredoxinperoxidase
tRNA	<i>transfer RNA</i>
tRNA ^{ser[sec]}	Selenocystein-spezifische tRNA
Trp	Tryptophan
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
<i>Tt / T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
<i>Tv / T. vivax</i>	<i>Trypanosoma vivax</i>
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
<i>X. tropicalis</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>

Zusammenfassung

Die Protozoen des Genus *Plasmodium* verursachen weltweit rund 247 Millionen Malariafälle jedes Jahr. Da der Malariaparasit schnell und effektiv Resistenzen gegen neue Antimalaria-Medikamente entwickelt, ist es notwendig, stets innovative Wirkstoffe zu finden. Dabei spielen das Verständnis der grundlegenden Stoffwechselfunktionen und die Entdeckung neuer potenzieller *drug targets* wichtige Rollen in der präklinischen Forschung.

Während ihrer Lebensphasen in menschlichen Erythrozyten und dem Mückenvektor sind die Malariaparasiten verschiedenen pro-oxidativen Umgebungen ausgesetzt. Daher haben die Parasiten ein komplexes Netzwerk aus antioxidativen schützenden Mechanismen entwickelt. Wie in vielen anderen Organismen repräsentieren redox-aktive Selenoproteine eine wichtige Komponente in diesem Netzwerk.

In der vorliegenden Arbeit wurden die vier Selenoproteine aus *Plasmodium falciparum* biochemisch und funktionell charakterisiert. Mittels bioinformatischer Analysen, wie Alignments und Motiv-Scans, konnten Ähnlichkeiten zwischen *PfSel1* und *SelK*, *PfSel2* und *SelT* sowie *PfSel4* und *SelS* herausgestellt werden. Hingegen erscheint *PfSel3* einzigartig unter den bisher bekannten Selenoproteinen.

Die Lokalisationsstudien mittels GFP-Fusions-Konstrukten unterstreichen die Ähnlichkeiten in den bioinformatischen Analysen. So befinden sich *PfSel1*, *PfSel2* und *PfSel4*, wie *SelK*, *SelT* und *SelS*, im Endoplasmatischen Retikulum. Hingegen ist *PfSel3* im Nukleus sowie im Apicoplasten aufzufinden und nimmt somit wieder eine Sonderstellung ein.

Transkriptionsprofile der vier Selenoproteine und anderer plasmodialer redox-aktiver Proteine wurden nach dem Zusatz der Zellkultur mit Paraquat, Natriumnitroprussid, Methylenblau bzw. Natriumselenit erstellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Transkripte der Selenoproteine durch die Selenverfügbarkeit reguliert werden. Methylenblau hat keinen Einfluß auf die Transkription der untersuchten Gene. Vergleiche der Selenoproteine-Transkriptlevel mit den Transkriptleveln bekannter redox-aktiver Proteinen zeigten, dass *PfSel1* und *PfSel4* ähnlich wie *PfTPx1*, *PfTPxGl* und *PfTrx1* durch oxidativen und nitrosativen Stress während des Wechels von Ring zu Trophozoiten stark reprimiert werden. Im Ringstadium werden hingegen die mRNA-Level von *PfSel3*, *PfSPS* und *PfAOP* extrem durch nitrosativen Stress reprimiert. Im Schizontenstadium reguliert *Plasmodium* ebenfalls durch nitrosativen Stress fast alle redox-aktiven Transkripte, namentlich *Pf1cys*, *PfAOP*, *PfGrx*, *PfTPxGl*, *PfTrx1* und *PfTrxR*, hoch.

Weiterhin wurde die heterologe Überexpression der plasmodialen Selenoproteine als Sec>Cys-Mutanten in *E. coli* optimiert. Mittels Gelfiltrationschromatographie und Quervernetzungs-experimenten konnten erste Eindrücke auf die Oligomerisierungszustände der rekombinanten Proteine gewonnen werden. Erste funktionelle Assays zeigen eine mögliche Redoxfunktion von *PfSel1* und *PfSel4*. Die Überexpression von *PfSel2* in *Plasmodium falciparum* führt zu einem

Anstieg des freien cytosolischen Calciums. Daneben konnten einige Interaktionspartner mittels *pull-down*-Analysen für PfSel1 und PfSel4 gefangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Informationen über die plasmodialen Selenoproteine gewonnen werden. Sie stellen potenzielle *drug targets* dar, die in weiteren Experimenten genauer analysiert werden müssen.

Summary

The protozoa of the genus *Plasmodium* cause 250 million cases of malaria worldwide each year. Because the malaria parasite develops resistance to antimalarial drugs rapidly and effectively, there is an urgent need to discover innovative active agents. Therefore understanding basic metabolism and the detection of new potential drug targets play important roles in preclinical research.

During their life cycle malaria parasites are exposed to various pro-oxidative environments in the human host and the mosquito vector. Consequently, the parasites have developed a complex network of antioxidative protective mechanisms. As in many other organisms, redox-active selenoproteins represent one important component of this network.

In this present work, the four selenoproteins of *Plasmodium falciparum* have been characterised biochemically and functionally. Through bioinformatical analyses such as alignments and motif scans, similarities between *PfSel1* and *SelK*, *PfSel2* and *SelT*, and between *PfSel4* and *SelS* were identified. In contrast, *PfSel3* seems to be unique among all currently known selenoproteins.

Localisation studies via GFP-fusion proteins underscore the similarities seen in the bioinformatical analyses. *PfSel1*, *PfSel2*, *PfSel4*, as well as *SelK*, *SelT*, and *SelS* are located in the endoplasmic reticulum. However, *PfSel3* is located in the nucleus or apicoplast and therefore takes an exceptional position.

Transcriptional profiles of the four selenoproteins and other plasmodial redox active proteins were prepared after supplementing the cell culture with sodium selenite, paraquat, sodium nitroprusside, and methylene blue, respectively. The results indicate that the transcripts of the selenoproteins are regulated via the availability of selenium. Methylene blue had no influence on the transcription of the examined genes. Comparisons of selenoprotein transcript levels with those of known redox-active proteins revealed a similar down-regulation of *PfSel1* and *PfSel4* to that of *PfTPx1*, *PfTPxGl*, and *PfTrx1* under oxidative and nitrosative stress during the parasite's transformation from ring to trophozoite stage. During the ring stage, the mRNA levels of *PfSel3*, *PfSPS*, and *PfAOP* were found to be extremely down-regulated after exposure to nitrosative stress. Almost all transcripts of redox active proteins, namely *Pf1cys*, *PfAOP*, *PfGrx*, *PfTPxGl*, *PfTrx1*, and *PfTrxR*, were also up-regulated under nitrosative stress in the schizont stage.

Furthermore, the heterologous overexpression of the plasmodial selenoproteins as Sec>Cys mutants in *E. coli* was optimized. First impressions of the oligomerisation state of the recombinant proteins were gained via gel-filtration chromatography and cross-linking experiments. Initial functional assays showed a possible redox activity for *PfSel1* and *PfSel4*. Overexpression of *PfSel2* in *Plasmodium falciparum* leads to an increase of free cytosolic calcium. Moreover, some interacting proteins were captured via pull-down assays with *PfSel1* and *PfSel4*.

New informations about the plasmodial selenoproteins were obtained in this study. These proteins

represent potential drug targets that have to be studied in further detail.

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Verbreitung und Bedeutung der Malaria

Malaria ist eine der bedeutendsten parasitären Infektionskrankheiten weltweit. Der Einzeller *Plasmodium* ist der Erreger dieser Krankheit, die heutzutage vor allem tropische und subtropische Länder betrifft. Durch den Stich einer weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles* wird der Erreger auf den Menschen übertragen. Durch die Verbindung der Erkrankung mit Sümpfen, Mooren und anderen Feuchtgebieten, wo sich die Moskitos aufhalten, entstand wahrscheinlich der italienische Begriff *mal'aria*, was übersetzt so viel wie „schlechte Luft“ bedeutet.

Bis weit ins 19. Jahrhundert hinein war Malaria in den meisten Ländern der Welt endemisch. So war eine ungefähre Grenze erst bei den Polarkreisen zu ziehen (siehe Abb. 1.1) [1].

Durch die Trockenlegung von Sümpfen, durch Ackerbewirtschaftung und durch verbesserte Wohnbedingungen in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurden Nord- und Zentraleuropa sowie Nordamerika malariafrei. Dazu beigetragen haben aber auch die Entdeckung des Malaria-Erregers *Plasmodium* durch CHARLES L. A. LAVERAN im Jahr 1880 und die Aufklärung des Verbreitungsmechanismus durch RONALD ROSS sowie BATTISTA GRASSI im Jahr 1897 [2].

Mit Unterstützung des 1955 gestarteten „*Global Malaria Eradication Programme*“ durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) konnten weitere 37 von 143 endemischen Ländern bis 1978 als malariafrei deklariert werden [1].

Trotz dieser weltweiten Erfolge musste in den nachfolgenden Jahren mit Rückschlägen umgegangen werden. Der Erreger passte sich den Bedingungen an und erste Resistenzen wurden Ende der 50er, Anfang der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts gegenüber dem Anti-Malaria-Medikament der 1. Wahl, Chloroquin (CQ), beobachtet. Ebenso wurde eine Resistenz der Moskitos gegenüber dem Insektizid DDT verzeichnet. Aus diesem Grund wurde die neue Initiative „*Roll Back Malaria*“ von der WHO gegründet. Durch diese und andere finanzielle Unterstützungen, wie z. B. der „*Global Fund to fight HIV, TB and Malaria*“, „*Malaria Initiative*“ des US Präsidenten, das „*Booster Programme*“ der Weltbank und der „*Bill and Melinda Gates Foundation*“, stehen jährlich bis zu 1 Milliarde US-Dollar für die Bekämpfung der Malaria bereit [3]. Jedoch rechnet der „*Global Fund to fight HIV, TB and Malaria*“ damit, dass mehr als 3,5 Milliarden US-Dollar gebraucht werden, um das Ziel der „*Roll Back Malaria*“-Initiative, die Malariafälle und -toten auf die Hälfte bis zum Jahr 2010, im Vergleich zum Jahr 2000, zu reduzieren [4].

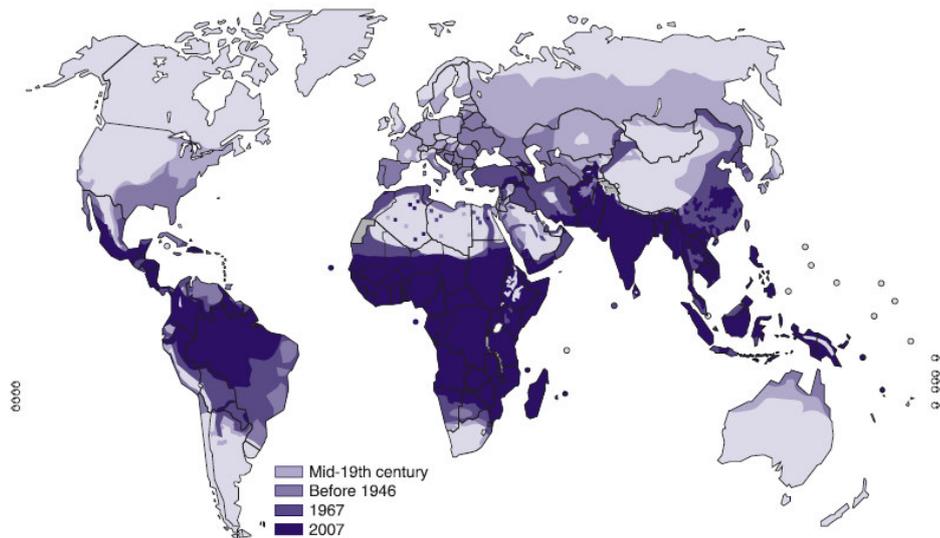


Abb. 1.1 Malaria-Verbreitung zwischen der Mitte des 19. Jahrhunderts und 2007. Das Bild wurde aus [1] entnommen.

Trotzdem konnten in den letzten 10 Jahren weitere Erfolge im Kampf gegen die Krankheit registriert werden und in weiteren 22 Ländern die Malariafälle auf einige wenige bis sogar auf Null reduziert werden [1].

So kommt Malaria heute ausschließlich in den tropischen und subtropischen Ländern, v. a. aber in den Gebieten südlich der Sahara und in Südostasien vor. Im Jahr 2008 wurden 109 Länder von der WHO zu den Malaria-endemischen Gebieten gezählt. Davon liegen allein 45 Länder (41%) in Afrika. 3,3 Milliarden Menschen, das entspricht ca. 50% der Weltbevölkerung, leben in endemischen Gebieten. Im Jahr 2006 gab es weltweit ca. 247 Millionen Malariafälle, 86% davon traten in Afrika auf. Die WHO schätzte in ihrem Malaria Report 2008, das 2006 ca. 881000 Menschen an Malaria starben, davon waren 91% der Fälle in Afrika und 85% der Opfer Kinder unter 5 Jahren [5].

Von der Malaria sind damit fast nur arme Länder betroffen und in diesen werden vor allem die allerärmsten Menschen beeinträchtigt [6]. Die Malariaphylaxe, wie mit Insektizid behandelte Moskitonetze oder Insektizidsprays sowie Malariamedikamente, wie Artemisinin, erreichen nicht die Ärmsten der Armen [7, 8]. Die Ärmsten 20% der Bevölkerung in den Entwicklungsländern bekommen 2,5-mal weniger öffentliche Gesundheitsservices als die „obere Schicht“ der Armen [6]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die ärmsten Haushalte am wenigsten für die Malariaphylaxe ausgeben und am wenigsten Moskitonetze kaufen [8]. Was darin begründet liegen kann, dass die ärmsten Bevölkerungsschichten in den entlegensten Gebieten, am sozialen und kulturellen Rande sowie mit wenig Einkommen leben [6].

Durch Malariaerkrankte und -tote verliert Afrika jährlich ca. 12 Milliarden US-Dollar an Produktionsumsatz [3]. In den meisten afrikanischen Ländern wird rund ein Viertel eines jährlichen Familieneinkommens für die Behandlung der Malaria ausgegeben [3]. Durch diese ökonomischen Belastungen wird gleichzeitig die Weiterentwicklung der betroffenen Länder behindert. Dadurch entsteht ein Kreislauf in dem die Armut die Malariaverbreitung fördert und Malaria gleichzeitig

einen wirtschaftlichen Wachstumsverlust verursacht. Möglicherweise existiert eine viel größere Verbindung zwischen Malaria und der Unterentwicklung als angenommen wird [9].

Obwohl die Malaria in einigen Teilen der Welt zurückgedrängt werden konnte, wurden wieder Fälle, auch autochthone, in Ländern bekannt, in denen die Krankheit als ausgerottet galt [10, 11]. So wird deutlich, dass auch in nicht-endemischen Gebieten eine weitere Nachsorge gegen Malaria wichtig ist.

Weiterhin ist Malaria in der Reisemedizin immer wieder ein wichtiges Thema. Es kehren jährlich 6000 – 10000 an Malaria erkrankte Reisende aus Malaria-endemischen Gebieten in die EU zurück [12]. Falsche Beratung vor der Reise und Prophylaxe spielen hierbei eine große Rolle.

1.1.2 Erreger, Krankheitsbild und Vektor

Der Malariaerreger ist ein kleiner einzelliger Parasit, mit einem Durchmesser von ca. 45 – 60 µm, der Gattung *Plasmodium* aus dem Stamm der Apicomplexa. Neben Säugetieren können auch Vögel und Reptilien befallen werden. Zu den Apicomplexa zählen weitere bekannte parasitäre Vertreter, wie z. B. *Toxoplasma gondii*, der Erreger der Toxoplasmose, sowie die Gattung *Eimeria*, die zahlreiche Haustiere, v. a. Hühner, befällt. Alle Vertreter der Apicomplexa sind obligat intrazelluläre Parasiten, die die Erythrozyten, Lymphozyten, Makrophagen oder Zellen des Verdauungstraktes in Wirbeltieren befallen [13]. Sie alle, bis auf die *Cryptosporidium*-Spezies, besitzen ein spezielles Organell, den Apicoplasten [14]. Der Apicoplast ist ein Plastid, der durch eine bis jetzt noch unbekannt sekundäre Endosymbiose entstanden ist. Er besitzt ein eigenes kleines Genom, das v. a. für Proteine, die in der Fettsäuresynthese, Häm-Synthese und Isopentenyl-Diphosphat-Synthese involviert sind, codiert, und ist für die Parasiten unentbehrlich.

Die wichtigsten vier humanpathogenen Arten unter den rund 120 Vertretern der Plasmodien sind *P. ovale*, *P. vivax*, *P. falciparum* und *P. malariae* [15]. *P. vivax* sowie *P. ovale* verursachen die Malaria tertiana, bei der alle 48 Stunden ein Fieberanfall vorkommt. *P. vivax* tritt vor allem in Südasien auf (siehe Abb. 1.2), *P. ovale* hingegen in Westafrika. *P. malariae* kommt in West- und Ostafrika sowie in Teilen Indiens vor und ist der Erreger der Malaria quartana, hier treten die Fieberschübe alle 72 Stunden auf. Als gefährlichste Form der Malaria gilt, wegen der Auslösung einer cerebralen Form, die Malaria tropica, bei der unregelmäßige Fieberschübe auftreten. Der Erreger hierfür ist *P. falciparum*, der seine größte Verbreitung südlich der Sahara, aber auch in Südasien und Teilen von Südamerika, findet (siehe Abb. 1.2). Vor kurzem wurde der Malariaerreger *P. knowlesi* des Primaten *Macaca fascicularis* (Javaneraffen oder auch Langschwanzmakake) aus an Malaria erkrankten Menschen isoliert und als fünfter humanpathogener Erreger deklariert [16-18]. *P. knowlesi* ist der Hauptgrund für Malaria in Malaysia. Zu einer symptomatischen Erkrankung im Menschen führen in einzelnen Fällen außerdem die Primaten-Malariaerreger *P. simium*, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi* und *P. inui* [19].

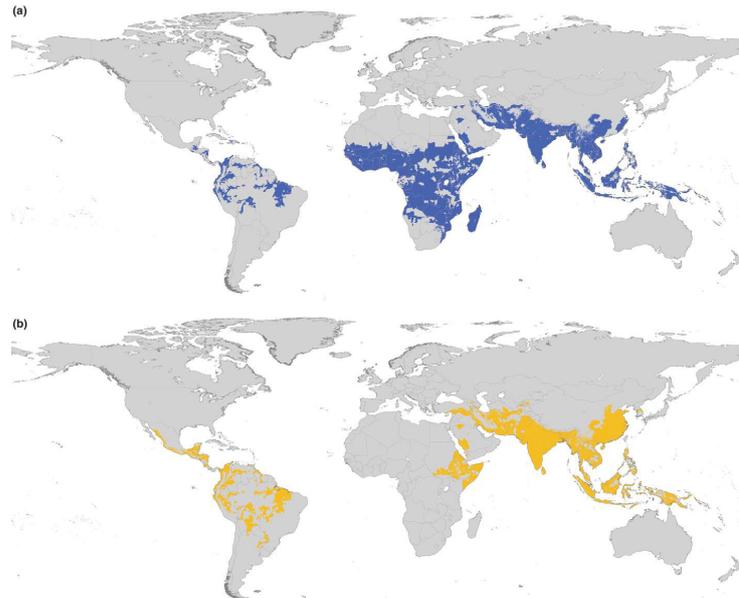


Abb. 1.2 Weltweite Verbreitung von (a) *Plasmodium falciparum* und (b) *Plasmodium vivax*. Das Bild wurde aus [20] entnommen

Im Allgemeinen bricht je nach Spezies der erste Fieberschub durchschnittlich nach einer Inkubationszeit von 12 – 17 Tagen (*Malaria quartana* meist nach 28 Tagen) aus. Anfänglich tritt das Fieber noch nicht in Intervallen auf. Dies entwickelt sich nur bei unbehandelter Malaria, bei der sich die Parasiten synchronisieren können. Die Patienten klagen zuerst über Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Übelkeit, Durchfall und allgemeines Unwohlsein. Die Körpertemperatur steigt nur wenig an. Durch diese Symptome kann die Malaria anfänglich mit einer Influenza oder gastrointestinalen Infektion verwechselt werden. Im weiteren Verlauf stellt sich Schüttelfrost ein und die Körpertemperatur steigt rapide an (kalte Phase). Es kommt zu einer peripheren Vasokonstriktion, die sich in einer kalten, blauen Haut und Gänsehaut äußert. Danach stellt sich die heiße Phase ein, währenddessen das Fieber ein Maximum von 40 – 41 °C oder mehr erreicht und die Patienten schwitzen. Kopfschmerzen, Brechreiz, Durst, Herzrasen und Tachypnoe treten dabei auf.

Komplikationen, wie Hypoglykämie, Anämien und Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma (cerebrale Malaria), können bei einem schweren Verlauf der *Malaria tropica* auftreten. *P. falciparum* besitzt die Fähigkeit Proteine, wie z. B. das Erythrozyten-Membranprotein 1, zu produzieren und diese auf die Oberfläche der Erythrozyten zu exponieren. Diese Oberflächenproteine binden an Rezeptoren der Endothelien der Blutgefäße. Die gebundenen infizierten Erythrozyten können weitere nicht infizierte Erythrozyten aggregieren (*rosetting*) [21, 22]. Dadurch können sich die Parasiten der Eliminierung aus der Blutzirkulation durch die Milz entziehen, verstopfen aber auch die Blutgefäße und stören so den Blutfluss und die Mikrozirkulation [23]. Der lebenswichtige Sauerstoff und Nährstoffe können nicht mehr in die entsprechenden Körperteile transportiert werden und es kommt zu einer Zellschädigung bis hin zur Nekrose. Geschieht dieser Prozess im Gehirn, treten die Symptome einer cerebralen Malaria auf. Bei schwangeren Frauen können die parasitierten Erythrozyten in der Plazenta aggregieren und

auch den Fötus infizieren. Eine schwangere Frau und deren Fötus sind besonders gefährdet. Sehr häufig kommt es hier zu einem Untergewicht des Fötus und des Neugeborenen, zu schweren Komplikationen bei der Mutter bis hin zu dem Tod von Mutter und/oder Fötus.

Als Vektor dienen den Plasmodien verschiedene Mückenarten der Gattung *Anopheles* aus der Familie der *Culicidae*. Von den etwa 430 bekannten *Anopheles*-Arten sind nur etwa 40 dazu befähigt, Plasmodien auf den Menschen zu übertragen [24]. Wobei die aggressivsten und auch zugleich effizientesten Überträger in Afrika vorkommen. Einer der wichtigsten und effizientesten Vektoren ist *A. gambiae* [25]. Diese Mückenart kommt überall südlich der Sahara vor. Ihre Blutmahlzeiten bestehen fast ausschließlich aus menschlichem Blut, die Larven können sich in den kleinsten Wasserlachen entwickeln und die adulte Form hat eine Lebensspanne von mehr als 30 Tagen. Die *Anopheles*-Mücken kommen nicht nur in tropischen Gebieten sondern bis weit in den Norden vor (siehe Abb. 1.3), jedoch findet man sie nicht in einer Höhe ab 2500 m.

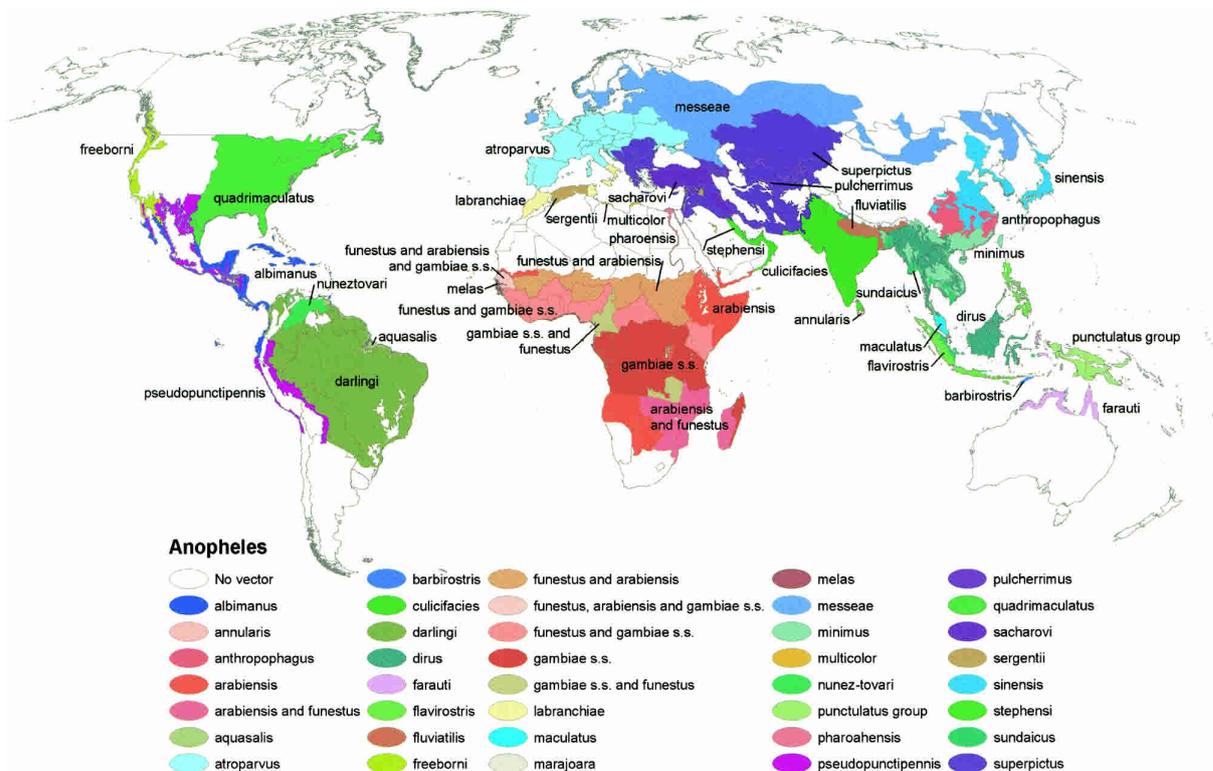


Abb. 1.3 Weltweite Verbreitung einiger dominanter oder potenzieller Malaria-Vektoren. Das Bild wurde aus [26] entnommen.

Im Jahr 1897 entdeckte RONALD ROSS den Übertragungsweg der Plasmodien von der Mücke zum Menschen [2]. Wie bei anderen Mücken saugt die weibliche *Anopheles* für die Ovaentwicklung Blut. Dadurch können bis zu 100 Eier produziert und nach 2 – 3 Tagen abgelegt werden. Die Eiablage erfolgt dabei im stehenden Gewässer, auch in der noch so kleinsten Wasserlache finden die Mücken diese Möglichkeit [25]. Die reife Mücke durchläuft innerhalb von wenigen Tagen bis mehreren Wochen die Stadien: Ei – Larve – Puppe – Adult. Die Dauer der Reifung hängt von der Temperatur und Lichtdauer ab. Die verschiedenen Mückenformen besitzen eine zirkadiane Rhythmik, wobei das Licht und die Temperatur die Zeitgeber zu einer Synchronisation sind [27].

Die adulten Mückenformen schlüpfen so z. B. in heißen Gebieten mit starker Sonneneinstrahlung immer in den Abendstunden. Daneben bewegen die Mücken sich mit Vorliebe innerhalb von Gebäuden [25].

Die weiblichen Mücken stechen meist in der Dämmerungszeit. Trinkt die Mücke dabei von dem Blut eines an Malaria erkrankten Organismus, werden einige sexuelle Formen der Parasiten, die Gametozyten, mitaufgenommen. Diese entwickeln sich in der Mücke innerhalb von 10 – 14 Tagen über Gameten zu Sporozoiten, die bei der nächsten Blutmahlzeit wieder auf den Zwischenwirt, z. B. Mensch, Affe oder Vogel, übertragen werden.

Die Fähigkeit der *Anopheles*-Mücke Plasmodien zu übertragen, hängt von einer Reihe von ökologischen und biologischen Prozessen, z. B. von der Häufigkeit der Blutmahlzeiten, der Lebenszeit der weiblichen Mücke oder der Populationsdichte der Mücken gegenüber dem Menschen, ab [24]. Diese Parasit – Mücken – (Mensch) – Interaktion kann sich so aber prinzipiell überall ergeben, wo Mücke und Parasit sich entwickeln können. *Plasmodium* braucht mindestens 15 – 18°C um sich in der Mücke zu entwickeln [28]. In Regionen mit Temperaturen unter 16°C ist es den Mücken und den Parasiten möglich, sich in den Wohnungen der Menschen oder anderen wärmeren Unterschlüpfen unabhängig von den Außentemperaturen zu entwickeln [29]. Malaria und andere Krankheiten, die über den Vektor „Mücke“ übertragen werden, sind somit nicht nur auf tropische und subtropische Gebiete begrenzt. Der medizinische Entomologe Prof. PAUL REITER sieht daher die globale Erwärmung – wie es von vielen anderen Wissenschaftlern und Nicht-Wissenschaftlern deklariert wird [30, 31] – auch nicht als Katalysator der tropischen Krankheiten, sondern vielmehr die Armut, menschliche Aktivitäten und die Bevölkerungsdichte [27, 32].

1.1.3 Lebenszyklus von *Plasmodium*

Plasmodium benötigt für seine Verbreitung zwei Wirte. Dabei ist die *Anopheles*-Mücke der eigentliche Endwirt. Der Mensch, andere Säugetiere sowie Vögel und Reptilien sind Zwischenwirte. Die Malaria-Parasiten besitzen drei Überlebensstrategien [15]:

- I. Schizogonie, bei der die Parasiten sich ungeschlechtlich replizieren. Innerhalb dieser Phase gibt es drei weitere Unterteilungen: 1a) Das Stadium der Oocyste in der Mücke wird Sporogonie genannt. 1b) Gewebs-Schizogonie, bei der sich die Parasiten in der Leber von Säugern bzw. im retikuloendothelialen System von Vögeln und Reptilien vermehren. 1c) Als dritte Form der Schizogonie ist die erythrozytäre Phase anzusehen, bei der sich innerhalb eines Erythrozyten ein oder mehrere Parasiten vermehren können.
- II. Extrazelluläre Formen, wie Ookinet, Sporozoit und Merozoit, sind auf die Invasion der Wirtszellen und der Verbreitung spezialisiert.
- III. Sexuelle Phase, bei der im Zwischenwirt Gametozyten ausgebildet werden und die sich bis zur Entwicklung der Ookineten in der Mücke erstreckt.

Durch den Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke werden ca. 20 Sporozoiten auf den

Zwischenwirt „Mensch“ übertragen (siehe Abb. 1.4-1). Ein einzelner Sporozoit kann schon die Malaria auslösen. Die Sporozoiten gelangen mit dem Blutkreislauf zur Leber und dringen innerhalb weniger Minuten in die Hepatozyten ein (siehe Abb. 1.4-2). Hier bildet die Wirtszelle eine parasitophore Vakuole, die den Parasiten von dem Cytoplasma der Leberzelle trennt. Nun wird die Gewebs-Schizogonie eingeleitet. Mit der Zeit nimmt der sogenannte Schizont den ganzen Hepatozyten ein. Nach 5 (*P. falciparum*) bis 16 (*P. malariae*) Tagen reißt erst die parasitophore Vakuole, wenig später die Membran der Leberzelle und 10000 (*P. vivax*) bis zu 30000 (*P. falciparum*) neue Parasiten, die Merozoiten, werden freigesetzt (siehe Abb. 1.4-3). *P. ovale* und *P. vivax* ist es außerdem möglich, sich in der Leberzelle zu „verkapseln“ und Hypnozoiten auszubilden. Diese Stadien können auch nach Wochen und Monaten wieder in den Lebenszyklus eintreten. Ein Teil der Merozoiten wird durch die Kupffer-Zellen aufgenommen und aus dem Körper eliminiert. Jedoch entkommen einige der Merozoiten der Eliminierung und invadieren innerhalb von ca. 15 Minuten die Erythrozyten. Etwa 30 Sekunden später befinden sich die Parasiten innerhalb der Zellen (siehe Abb. 1.4-4). Es wird angenommen, dass ein Teil der durchdrungenen Erythrozytenmembran nach der Invasion die parasitäre Vakuole um den Parasiten bildet. Hier, vor dem Immunsystem geschützt, vermehrt sich der Parasit (erythrozytäre Schizogonie). Die Parasiten durchlaufen dabei drei verschiedene Stadien: Ring – Trophozoit – Schizont, in der sich die Parasiten teilen (siehe Abb. 1.4-5). Während der erythrozytären Phase nimmt der Parasit eine große Menge an Hämoglobin aus dem roten Blutkörperchen auf, baut dieses mittels verschiedener Proteasen ab und bezieht daraus die meisten Aminosäuren für die Proteinbiosynthese. Die toxischen Eisenreste des Häms formen unter Katalyse des *histidin rich protein-2* β -Hämatin-Strukturen, diese präzipitieren und kristallisieren zu dem Hämozoin [33]. Dieses „Malaria-Pigment“ kann unter einem Lichtmikroskop gesehen werden und dient zur Diagnose und Bestimmung des Parasitenstadiums. Wenn der Erythrozyt durch den Druck des Schizonten reißt, werden 8 – 32 neue Merozoiten freigesetzt, die weitere Erythrozyten befallen (siehe Abb. 1.4-6).

Das freiwerdende Hämozoin ist für den Wirt toxisch, dadurch werden Cytokine ausgeschüttet, die das Malaria-Fieber verursachen. Die Dauer der erythrozytären Phase beträgt bei den humanpathogenen Plasmodien-Arten meist 48 – 50 Stunden, außer *Plasmodium malariae* bei der sich das Stadium auf 72 Stunden beläuft. Die immer regelmäßig wiederkehrenden Fieberschübe sind der Ursprung der Namensgebung für die Malariaformen. Zum Anfang einer Malariaerkrankung tritt oft kein klares Muster auf. Es kommt wahrscheinlich erst durch die Fieberschübe und den Tag-Nacht-Rhythmus des Wirtes zu einer Synchronisation der verschiedenen Stadien im Wirtsorganismus [34-36].

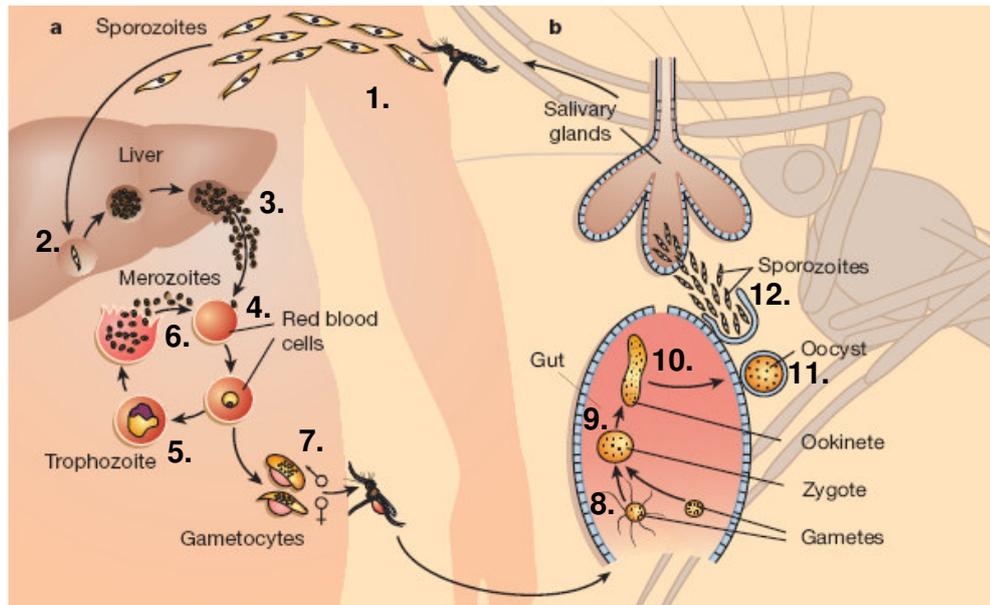


Abb. 1.4 Lebenszyklus von *Plasmodium*. Das Bild wurde nach [37] modifiziert

Durch bis jetzt noch nicht vollständig bekannte Mechanismen wird die Gametozytogenese eingeleitet und einige Merozoiten entwickeln sich in den Erythrozyten zu männlichen sowie weiblichen Gametozyten (siehe Abb. 1.4-7) [38, 39]. Diese geschlechtlichen Formen der Parasiten können bis zu 22 Tage in dem Zwischenwirt überleben. Durch die Blutmahlzeit einer *Anopheles*-Mücke werden die Gametozyten von der Mücke aufgenommen und gelangen in deren Darm. Hier triggert der Temperaturunterschied von ca. 5°C, im Vergleich zu der Temperatur des Menschen, gleichzeitig mit der Xanthurensäure in der Mücke die Formung von Gameten aus den Gametozyten innerhalb weniger Minuten (siehe Abb. 1.4-8). Die männlichen Gameten wandern dann zu den weiblichen Gameten, beide verschmelzen miteinander und formen eine Zygote (siehe Abb. 1.4-9). Diese durchläuft eine Meiose und formt einige Stunden nach der Blutmahlzeit der Mücke eine Ookinete, die die Darmwand der Mücke befällt (siehe Abb. 1.4-10). In der Basallamina der Darmwand differenziert sich die Ookinete in eine Oocyste (siehe Abb. 1.4-11). Durch den Prozess der Mitose teilt sich die Oocyste mehrmals, dadurch können bis zu 8000 Tochterzellen entstehen. Diese Sporozoiten werden freigesetzt. Nur einige dringen aber in die Speicheldrüsen der Mücke ein (siehe Abb. 1.4-12), von wo aus die Parasiten den Menschen erreichen (siehe Abb. 1.4-1).

1.1.4 Medikamente, Resistenzen und Vakzine

Naturstoffe, die gegen Fieber und Malaria wirken, sind schon seit Jahrhunderten bekannt. Chinin, aus der Rinde des Chinabaumes (*Cinchona pubescens*) gewonnen, und Artemisinin, aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*), sind zwei Vertreter dieser Stoffe. In Europa wurde Chinin durch heimkehrende Jesuiten aus Peru im 17. Jahrhundert mitgebracht und wurde durch die Chemiker JOSEPH PELLETIER und JEAN CAVENTOU im Jahr 1820 isoliert [40]. Artemisinin wird schon

seit 2000 Jahren von Medizinern in Asien gegen Fieberschübe benutzt, konnte aber erst in den 70ern des vergangenen Jahrhunderts isoliert werden [41, 42].

Die Entwicklungen für Antimalaria-Medikamente sind noch nicht viel weiter vorangeschritten als am Anfang des 20. Jahrhunderts. So sind unter den 1400 weltweit registrierten Medikamente in den Jahren 1975 – 1999 nur vier gegen Malaria wirksam [42]. Noch vor dem 2. Weltkrieg wurden die Substanzen Pamaquin, Chloroquin und Mepacrin entwickelt. Hinzu kamen in den 40ern des 20. Jahrhunderts Proguanil und Amodiaquin, sowie etwas später Primaquin und Pyrimethamin (in den 1950er), Sulfadoxin/Pyrimethamin (1960er) und Artemisinin (1970er). In den 80ern des 20. Jahrhunderts wurden Mefloquin, Halofantrin und einige chinesische Stoffe, wie Piperaquin, daneben die Artemisinin-Derivate Artemether, Artesunat sowie Dihydroartemisinin und vor wenigen Jahren Atovaquon-Proguanil entwickelt.

Artemisinin und dessen Derivate entsprachen lange Zeit nicht den internationalen Richtlinien für Medikamente und kamen daher fast ausschließlich in China sowie einigen anderen asiatischen Ländern auf den Markt. Im Jahr 2006 verkündete die WHO, dass der Einsatz von Artemisinin in einer Monotherapie eingestellt werden soll. So ist Artemisinin zwar in der Praxis fähig, Malaria innerhalb von sieben Tagen zu kurieren, jedoch kann mit einer Kombination aus Artemisinin und einem zweiten Wirkstoff, wie z. B. Lumefantrin, die Wirkung erhöht und die Malaria schon nach drei Tagen besiegt werden. Neben der schnelleren Wirkung soll diese Kombinations-Therapie (*Artemisinin-based combination therapies*, ACT) auch eine Resistenzausbildung gegenüber beiden eingesetzten Wirkstoffen reduzieren [43, 44].

Zur Zeit befinden sich einige weitere vielversprechende Wirkstoffe in den verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung, wie z. B. Fosmidomycin in Kombination mit Clindamycin [45], Isoquin, Dihydroartemisinin-Piperaquin oder Chlorproguanil-Dapson [42].

Die Wirkmechanismen beruhen bei den meisten der Wirkstoffe auf einer Interaktion mit dem Hämoglobin-Abbau. Für Chinin und seine chemischen Abkömmlinge, wie Chloroquin und Mefloquin, wird angenommen, dass sie mit dem Häm oder Hämatin in Wechselwirkung treten und so die Ausbildung des Hämozoins verhindern, wodurch sich der toxische Effekt des Eisenrestes im Parasiten entfalten kann [33, 41]. Artemisinin und die Abkömmlinge Artemether, Artesunat und Dihydroartemisinin werden wahrscheinlich im Parasiten von dem Häm homolytisch gespalten, wodurch sich freie Radikale bilden, die zu Membranschäden führen [33, 41]. Sulfadoxin, Proguanil und Pyrimethamin sind hingegen Antifolate. Sie verhindern die Folatbiosynthese entweder durch Inhibition der Dihydropteroat-Synthase (Sulfadoxin) oder der Dihydrofolat-Reduktase (Proguanil und Pyrimethamin) [41]. Primaquin löst indessen oxidativen Stress in den Parasiten aus.

Die meisten Mechanismen wirken somit vor allem auf Blutschizonten. Proguanil und Primaquin wirken hingegen auf Plasmodien, die sich im Stadium der Gewebsschizogonie befinden. Primaquin wirkt daneben auch auf Hypnozoiten. Desweiteren gibt es noch einige Wirkstoffe, wie Primaquin, Chinin, Mefloquin, CQ und Amodiaquin, die die Malaria durch Wirkung auf Gametozyten ausheilt

[46].

CQ war lange Zeit das Medikament der 1. Wahl. Jedoch bildeten sich in den späten 1950ern bzw. frühen 1960ern unabhängig voneinander an der kambodschanisch-thailändischen Grenze sowie in Venezuela und Kolumbien Resistenzen aus, die sich schnell verbreiteten. Heute wird CQ nur noch teilweise in den wenigen CQ-sensitiven Gebieten verwendet. Noch in dem gleichen Jahrzehnt wurden Resistenzen von *Plasmodium falciparum* gegenüber Sulfadoxin/Pyrimethamin entdeckt. Mefloquin wurde ab 1983 in Thailand und Kambodscha als Medikament der 1. Wahl eingeführt. In Kombination mit Sulfadoxin/Pyrimethamin sollte die Resistenzbildung verzögert werden. Jedoch wurden schon nach vier Jahren erste sinkende Sensitivitäten von *Plasmodium* gegenüber Mefloquin in Thailand und Kambodscha entdeckt, die sich bis Anfang der 1990er weltweit ausbreiteten. Ab 1994 wurden hohe Dosen an Mefloquin in Kombination mit Artesunat als Standardtherapie verschrieben [47]. Bei dieser Kombination sollte Artesunat Mefloquin vor Resistenz schützen [48]. Die Kombinationstherapie konnte weltweit Erfolge erzielen und die Malariamortalität ist drastisch gesunken. Jedoch wurde in den letzten Jahren eine verringere Sensitivität von *Plasmodium falciparum* gegenüber dieser Kombinationstherapie in Kambodscha/Thailand, dem Epizentrum der Resistenzbildung gegenüber Wirkstoffen, erfaßt [48]. Dabei ist diese Resistenz wahrscheinlich vor allem mit der Mefloquin-Resistenz verbunden. Dabei liegt eine erhöhte *copy number an multidrug resistance-1 gene* vor, welches mit der Mefloquin-Resistenz verknüpft ist [48]. In jüngster Zeit wird aber auch, wieder im Westen Kambodschas an der Grenze zu Thailand, eine verringerte Sensitivität der Parasiten gegenüber Artesunat beobachtet [49, 50]. Die Gefahr und das Potenzial sind groß, dass sich eine Resistenz gegen Artemisinin und dessen Derivate ausbildet und sich die resistenten Parasiten weltweit verbreiten. Zur Zeit ist kein weiterer Wirkstoff auf dem Markt vorhanden, der die ACT ablösen könnte. Jedoch wird für die kambodschanisch-thailändische Region bald ein neues Medikament gebraucht werden [48]. Dies wird durch mehrere Faktoren hervorgerufen: ein unsachgemäßer Gebrauch der Medikamente, Fehl- und Eigendiagnosen der Einwohner – in Kambodscha sind Artesunat und Mefloquin öffentlich zugänglich – und Wanderarbeiter, die aus nicht endemischen Gebieten in das hochendemische Gebiet gelangen, sowie deren Arbeits- und Wohnbedingungen [48, 51]. Wahrscheinlich war die Mefloquin-Resistenz aber auch schon zu groß, als dass sie durch die Kombination mit Artemisinin-Derivaten hätte aufgehalten werden können. Daneben ist die Halbwertszeit für Artesunat kürzer als die des Mefloquins, so dass eine erneute Ansteckung der Patienten zu einer Toleranz führen kann. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass der *Plasmodium falciparum*-Stamm in der Region von Kambodscha und Thailand eine besondere Fähigkeit besitzt, Resistenzen auszubilden [48].

Die große Bedeutung der Wirkstoffresistenzen der Plasmodien auf die Malaria-Verbreitung und -Mortalität zeigte der dramatische Anstieg an Malariafällen und -toten zwischen den Jahren 1983 und 1986 nach der Chloroquin-Resistenzbildung in Zaire [52].

Die schnellen Resistenzbildungen der Plasmodien auf Antimalaria-Mittel sowie der *Anopheles*-Mücke auf Insektizide führt zu einem ständigen Druck auf die Entwicklung und Erforschung neuer wirksamer Wirkstoffe und Vakzine. Auch in Gebieten, die in den letzten Jahren durch den Erfolg von Mefloquin und Artemisinin von Malaria befreit sind, kann die Krankheit wieder zurückkehren [53]. Daher ist es wahrscheinlich unerlässlich einen Immunschutz für die Bevölkerung zu entwickeln. Jedoch hat sich dieses über Jahrzehnte hinweg als schwierig gestaltet. So kann sich *P. falciparum* dem Immunsystem durch Antigen-Variation mittels *var*-Genen, Polymorphismen oder Interaktionen mit dem Wirtsimmunsystem entziehen. Zu den Interaktionen zählen z. B. die Bindung des Toll-like receptor 4 durch Glycosylphosphatidyl-Inositol, welches durch die Erythrozytenlyse freigesetzt wird, oder auch die Bindung des Toll-like receptor 9 durch Hämозоин.

Malaria wirkt schon Jahrhunderte auf den Menschen ein und löst damit einen selektiven genetischen Druck in hochendemischen Gebieten aus. So sind heute einige Mutationen im menschlichen Genom bekannt, die die Anfälligkeit gegen Malaria senken. Die am Besten untersuchten Beispiele sind einige Hämoglobinopathien, wie Sichelzellanämie oder Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel. Daneben sind aber auch Polymorphismen in dem Erythrozyten-Membranprotein 3, dem Toll-like receptor 4, dem Duffy-Antigen-Rezeptor für Chemokine oder Mutationen im humanen Leukozyten Antigen B bekannt [54, 55]. In jüngster Zeit konnte ein weiterer möglicher Polymorphismus in der ethnischen Gruppe der Fulani im Sudan und Burkina Faso aufgedeckt werden. Dabei handelt es sich um einen *single nucleotide polymorphism*, der eine höhere Affinität zu Immunglobulin G2 hat. Dieser wiederum ist ein schlechter Aktivator des klassischen Komplementsystems und es steht offen, ob dieser eventuell eine Rolle in der Immunantwort gegen *P. falciparum* spielt [56]. Eine natürliche Immunität gegen die schwere Form der Malaria kann sich vor allem bei Kindern zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr entwickeln. Eine vollständige Immunität gegen die Infektion mit dem Parasiten *Plasmodium falciparum* gibt es – anders wie bei Individuen, die Duffy-negativ sind und dadurch gegen *P. vivax* immun sind – allerdings nicht [54, 57].

Die Entwicklung der Impfstoffe basiert auf zwei Ansätzen. Zum einen sollen Wirkstoffe entwickelt werden, die den Krankheitsausbruch verhindern. Diese Vakzine greifen vor allem das vorerythrozytäre oder erythrozytäre Stadium an. Einige Impfstoffe befinden sich zur Zeit in den klinischen Phasen der Erprobung. Von durch Bestrahlung abgeschwächten Parasiten über genetisch veränderten Sporozoiten bis hin zu synthetischen Impfstoffen basierend auf Oberflächenproteinen des Parasiten wurden in den letzten Jahren viele Ansätze getestet. Aber vor allem Letztere sind meist durch die klinische Phase durchgefallen [53, 57]. Der zur Zeit vielversprechendste Impfstoff ist RSS,S, welcher gegen das Oberflächenprotein Circumsporozoiten-Protein wirkt. In der Phase IIa konnten 30 – 50% der geimpften Freiwilligen einen Schutz aufbauen und in Feldstudien der Phase IIb konnte gezeigt werden, dass die Wirkung in Kindern 18 Monate anhält [57]. Dies zeigt aber auch, dass eine erworbene Immunität gegen Malaria nach kurzer Zeit

wieder die Wirkung verliert. Was zu dem zweiten Ansatz zur Entwicklung von Impfstoffen führt. Dieser beruht auf der Behinderung der Übertragung der Erreger vom Zwischenwirt auf den Vektor und somit auf der Eliminierung und Verhinderung der Verbreitung der Parasiten. Diese Transmissions-blockierenden Impfstoffe zielen vor allem auf Oberflächenproteine im sexuellen Stadium, die für die Befruchtung der weiblichen Gameten durch die männlichen wichtig sind [53]. Die derzeitigen Vakzine, die auf diesen Mechanismus beruhen, induzieren eine gute, aber keine komplette Transmissions-Blockade.

Weitere Möglichkeiten zur Bekämpfung der Malaria werden über transgene Vektoren oder die Reduzierung der *Anopheles*-Population eröffnet [58-61]. Ersteres bietet die Möglichkeit, *Anopheles*-Mücken gentechnisch so zu verändern, dass es diesen nicht mehr möglich ist, als Wirt der Plasmodien-Spezies zu dienen. Die gentechnisch veränderten Mücken müssen sich daneben aber auch im freien Feld behaupten und die Wildtyp-*Anopheles*-Arten ersetzen.

1.2 Entwicklung neuer Wirkstoffe

Am Anfang der Entwicklung eines neuen Wirkstoffes steht die Identifizierung und Charakterisierung eines Proteins, das als *drug target* dienen soll. Darauf bauen Röntgenstrukturanalysen und *Screening*-Assays, bei denen eine Reihe an Wirkstoffen als mögliche Inhibitoren des Proteins getestet werden. Wirkstoffe, die bei niedrigen Konzentrationen das Protein hemmen und daher einen kleinen IC50-Wert (halbmaximale inhibitorische Konzentration eines Inhibitors) besitzen, werden weiter analysiert und eventuell chemisch optimiert. Danach folgen erste Versuche an Mäusen oder Ratten. Nach diesen Analysen tritt der potenzielle neue Wirkstoff in die vorklinische Phase ein und durchläuft dann, beim guten Abschneiden, drei weitere klinische Phasen, bei denen er auf Toxikologie und Pharmakologie geprüft wird (siehe Abb. 1.5). Nur ungefähr einer von 5000 gescreenten Wirkstoffen erreicht dann die Registrierung [62].

Die akademische Forschung übernimmt in dem Entwicklungsprozess v. a. die Grundlagen und das Aufdecken, Analysieren und Charakterisieren neuer potenzieller *drug targets* und Wirkstoffe. Als sehr gutes *drug target* dienen Proteine, die ausschließlich im Parasiten vorkommen, wodurch Nebenwirkungen am Menschen so gering wie möglich gehalten werden. Trotzdem kann auch ein Wirkstoff, der auf homologe humane Proteine wirkt, als Medikament dienen [63]. Hier ist es allerdings wichtig, dass die Wirkung des Stoffes am Parasiten größer ist als am Menschen. Möglich ist aber auch, dass im humanen System weitere Faktoren eine Rolle spielen, die den Wirkstoff schneller abbauen und es dadurch zu einer geringeren Wirkung für den Menschen kommt bzw. dass die intrazelluläre Aufnahme des *drugs* nur für die Parasiten möglich ist.

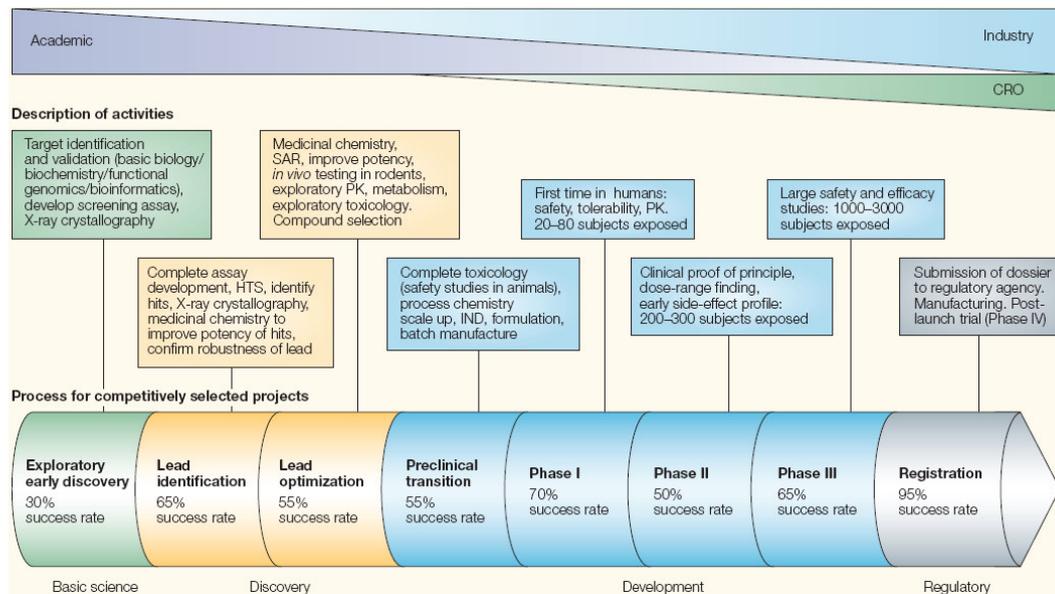


Abb. 1.5 Stufen des Wirkstoff-Research- & Discovery-Prozesses. Die Übersicht zeigt den Prozess eines Wirkstoffs auf Seiten der Akademien, der Industrie und der Vertragsforschungsorganisationen (CRO). Die Erfolgsraten beziehen sich auf Daten der Malariaforschung. Das Bild wurde aus [64] entnommen.

1.3 Oxidativer Stress

1.3.1 Oxidativer Stress in *Plasmodium*

Die Malariaparasiten sind während ihres erythrozytären Lebenszyklus' oxidativem Stress ausgesetzt. Die pro-oxidative Umgebung wird vor allem durch Sauerstoff und Eisen ausgelöst, die nach der FENTON-Reaktion miteinander reagieren [65]. Die Hauptursache der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie z. B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxid (O_2^-) liegt in dem Abbau von Hämoglobin, welches in der Nahrungsvakuole verdaut wird. Dabei entstehen neben den gewünschten Aminosäuren auch toxische Nebenprodukte und ROS. So kann das Hämoglobin spontan zu Methämoglobin oxidiert werden und führt damit zu der Bildung von Superoxidanionen. Es fällt weiterhin toxisches Häm an. Zwar wird der größte Teil zu Hämozin kristallisiert, ein weiterer Teil entkommt aber diesem Prozeß. Dieser diffundiert in das Cytosol der Parasiten und kann zu Membranschäden führen und weitere ROS verursachen [66]. Superoxidanionen werden in der Zelle zu Wasserstoffperoxid umgesetzt und können gleichzeitig mit diesem wiederum interagieren und Hydroxylradikale bilden. Weiterhin kann Wasserstoffperoxid zusammen mit Eisen reagieren und ebenfalls Hydroxylradikale, wie es in der FENTON-Reaktion beschrieben ist, bilden. Aber nicht nur der Abbau von Hämoglobin führt zu ROS. Auch durch das schnelle Wachstum und die hohe Proliferationsrate werden ROS infolge des Sauerstoff-Metabolismus gebildet [65]. Daneben ist der Parasit dem Immunsystem des Wirtes, welches ebenfalls Stickstoffmonoxid (NO) und ROS produziert, ausgesetzt.

Um gegen den ständigen Druck durch ROS gewappnet zu sein, besitzt der Malariaerreger eine Vielzahl von antioxidativen Mechanismen. Dazu zählen die Superoxid-Dismutasen und Glutathion (GSH) sowie die GSH- und Thioredoxin-abhängigen Proteine [65]. Ungleich vieler anderer Zellen

exprimiert *Plasmodium* aber keine Katalase und keine klassische Glutathion-Peroxidase.

1.3.2 Antioxidative Abwehr in *Plasmodium*

Die Malariaerreger besitzen neben zwei verschiedenen Superoxid-Dismutasen, eine cytosolische und eine mitochondriale, auch ein Glutathion- und Thioredoxin-System.

GSH ist ein kleines Tripeptid, das als Thiol-Redox-Puffer dient [65]. Es wird in *Plasmodium de novo* durch die Ligation von Glutamat und Cystein (Cys) zu Glutamylcystein und dessen weiteren Verbindung mit Glycin unter der Katalyse der Enzyme γ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase gebildet. GSH dient als Co-Faktor für die Glutathion-S-Transferase (GST), Glutaredoxin (Grx), Glyoxalase und in *P. falciparum* nur in einem geringen Maße für die Glutathion-abhängige Peroxidase (GPx). Durch die Oxidation von GSH entsteht das Glutathion-Disulfid (GSSG), welches wieder unter Verbrauch von NADPH und durch die Katalyse von Glutathion-Reduktase (GR) zu GSH reduziert wird (siehe Abb. 1.6).

Thioredoxine (Trx) sind kleine redox-aktive Proteine aus der Trx-Superfamilie, zu der unter anderem auch Grx, Trx-ähnliche Proteine (Tlp) oder Tryparedoxin, spezifisch für die *Trypanosoma*-Spezies, gehören. In *Plasmodium* wurden drei verschiedene Trxs [67], zwei Tlps [67] sowie ein für *Plasmodium* einzigartiges Plasmoredoxin (Plrx) [68] identifiziert, die überlappende Funktionen ausüben. Alle haben ein aktives Zentrum mit einem redoxaktiven CxxC-Motiv [69]. Sie spielen als *redox messenger* eine wichtige Rolle. Dabei interagieren sie mit redox-aktiven Proteinen und Metaboliten, wie der Ribonukleotid-Reduktase, Peroxidasen, Transkriptionsfaktoren und GSH [65]. Trx wird durch die Thioredoxin-Reduktase (TrxR), Grx und Plrx werden hingegen durch GSH reduziert (siehe Abb. 1.6).

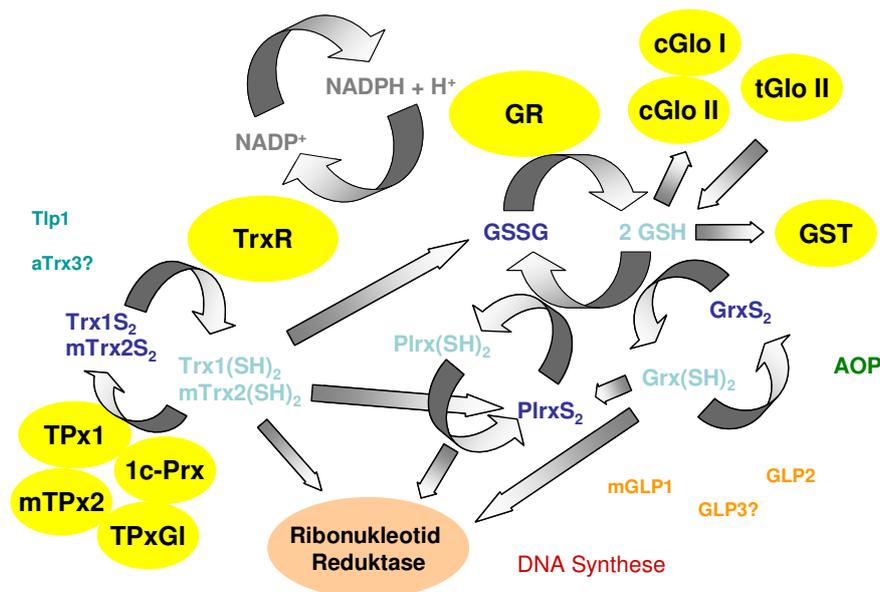


Abb. 1.6 Übersicht redox-aktiver Stoffwechselwege in *Plasmodium*. Erklärungen und Abkürzungen im Text; gelbe/orange Kreise zeigen enzymatische Komponenten an, blaue Schriftzüge sind nichtenzymatische Komponenten, wobei hellblau reduzierte Protein-Form und dunkelblau oxidierte Form bedeuten. Modifiziert nach [70].

Prx kann daneben auch von Trx und Grx reduziert werden. Die Tlps sind ebenfalls reduzierende Agenzien, die aber nicht durch TrxR reduziert werden [67].

Daneben sind in *Plasmodium* fünf verschiedene Peroxiredoxine (Prx) bekannt. Eine klassische 1-Cys- und zwei 2-Cys-Prx (TPx1 und TPx2) sowie eine GPx-ähnliche Thioredoxin-Peroxidase (TPxGI) und das Antioxidant-Protein (AOP), ein 1-Cys-Prx, das einzigartig für *Plasmodium* ist [71]. Die Prxs besitzen die Funktionen der Peroxidasen und können verschiedenste Peroxide, wie H₂O₂, t-butyl-Hydroperoxid, Linolensäure und sogar reaktive Nitrogen-Spezies (RNS) reduzieren.

Anders als die menschliche TrxR ist die PTrxR nicht selenhaltig. Im Menschen ist auch in GPx Selen in Form von Selenocystein (Sec) eingebaut. Wie schon erwähnt, besitzt *Plasmodium* aber eine selenunabhängige TPxGI und keine klassischen GPxs. Durch die vielen Unterschiede in der antioxidativen Abwehr stellen diese Systeme potenzielle Angriffsziele für neue Wirkstoffe dar.

1.4 Selenoproteine

1.4.1 Selen und Selenoproteine

Selen wurde 1817 durch BERZELIUS entdeckt. Aber erst 1957 wurde es als ein Spurenelement durch SCHWARTZ und FOLTZ identifiziert. Selen hat antioxidative, anti-inflammatorische und antivirale Eigenschaften [72]. Die wohl höchste Aktivität erreicht Selen in Form der 21. Aminosäure Sec in Selenoproteinen (Sel). Hierbei wird Selen anders als alle anderen Aminosäuren co-translational in die aufbauende Peptidkette eingebaut. Selenoproteine kommen in allen Domänen des Lebens, *Archaea*, *Bacteria*, *Eukarya*, vor. Es wurden dazu bis jetzt 30 Sel-Familien identifiziert. Dabei sind jedoch die Selenoproteome innerhalb einer Spezies relativ klein. Die größten Selenoproteome wurden bisher in Fischen mit 30 und im Menschen mit 25 Selenoproteinen identifiziert (siehe Tab. 1.1). Hefen und höhere Pflanzen scheinen jedoch keine Selenoproteine zu exprimieren. Hier kommen vor allem cysteinhaltige Homologe vor. Dies hängt wahrscheinlich mit dem begrenzten Angebot an Selen in der Natur und der energieaufwendigen Biosynthese zusammen. In den Säugetieren haben viele der Sel's noch unbekannte Funktionen. In den bisher am besten charakterisierten Sel's GPx, TrxR, Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2) und den Deiodinasen befindet sich Sec im aktiven Zentrum mit einer katalytische Funktion. Sec wird auch als ein Analogon zu Cys gesehen, wobei Sec bei physiologischen pH in einer reaktiveren, ionisierten Form gegenüber Cys vorliegt. Sec ist stark nukleophil und kann so reduziert werden. Aus diesen Gründen ist Sec ein effektives Antioxidans. Der Effekt von Selen ist jedoch konzentrationsabhängig: Ist es im nM-Bereich ein Antioxidans, wirkt es in höheren Konzentrationen, v. a. über Bereichen, die für die Sel-Biosynthese benötigt werden, als Prooxidans. Dabei akkumuliert Selen in der Zelle und wird im Redoxzyklus metabolisiert, wobei ROS, wie H₂O₂ und O₂⁻ entstehen. In *knock out*-Mäusen konnte die essenzielle Funktion dreier Selenoproteine – GPx4, TrxR1 und TrxR2 – belegt werden [73]. Alle anderen Selenoproteine sind nicht essenziell. Ein Verlust dieser führt aber oft zu dramatischen phänotypischen Veränderungen.

Selenoproteine sind an grundlegenden zellulären Prozessen, wie z. B. TrxR an der DNA-Synthese, beteiligt und sind vor allem wichtige Spieler im Redoxzyklus.

Tab. 1.1 Die humanen Selenoproteine und ihre Funktionen. Die Funktionen wurden zusammengestellt aus PAPP *et al.* [72] und REEVES *et al.* [74].

Funktion	Selenoprotein	Abk.
Antioxidative Enzyme	Cytosolische Glutathionperoxidase	GPx1
	Gastrointestinale Glutathionperoxidase	GPx2
	Plasmatische Glutathionperoxidase	GPx3
	Phospholipid-Hydroperoxid Glutathionperoxidase	PhGPx4
	Olfaktorische Glutathionperoxidase	GPx6
	Selenoprotein K	SelK
	Selenoprotein R	SelR
	Selenoprotein W	SelW
Redox-Signalisierung	Thioredoxinreduktase Typ I	TrxR1
	Thioredoxinreduktase Typ II	TrxR2
	Thioredoxinreduktase Typ III	TrxR3
Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel	Deiodinase Typ I	DIO1
	Deiodinase Typ II	DIO2
	Deiodinase Typ III	DIO3
Sec-Synthese	Selenophosphatsynthetase 2	SPS2
Se Transport und Speicherung	Selenoprotein P	SelP
Unbekannte Funktion (potenzielle Funktion)	Selenoprotein H (<i>de novo</i> -Synthese von Glutathion, Phase II Detoxifikation)	SelH
	Selenoprotein I (Phospholipid Biosynthese)	SelI
	Selenoprotein M (Thioldisulfidoreduktasen im ER)	SelM
	Selenoprotein 15 (Thioldisulfidoreduktasen im ER)	Sep15
	Selenoprotein N (Muskelformation, Ryanoidrezeptor-vermittelte Calcium-Mobilisierung im ER)	SelN
	Selenoprotein O	SelO
	Selenoprotein S (Proteinfaltung, antioxidative Funktion im ER)	SelS
	Selenoprotein T (Calcium-Mobilisierung im ER)	SelT
Selenoprotein V (männliche Reproduktion)	SelV	

Ein Selenmangel führt daher zu einem erhöhten Krebs- und Infektionsrisiko, zu Unfruchtbarkeit beim Mann sowie neurologischen Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson [72]. In Gebieten mit extrem niedrigen Selenvorkommen, wie in einigen Teilen Chinas, wo die Selenaufnahme mit <10 µg/Tag weit unter der empfohlenen Dosis von rund 60 µg/Tag liegt, kommt auch die sehr seltene Keshan-Krankheit, eine tödlich verlaufende Form der Kardiomyopathie, vor.

1.4.2 Biosynthese der Selenoproteine

Mit einigen kleinen Unterschieden zwischen der Biosynthese in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeaen, ist die Selenoproteinbiosynthese ein evolutionär konservierter Prozess [72]. Allen Lebewesen sind das *in-frame* UGA-Codon, das SECIS-Element, die spezifische tRNA^{ser[sec]} sowie verschiedene *trans*-Faktoren gemein. Normalerweise codiert UGA für die Termination der

Translation. In früheren Studien konnte der Einbau von Tryptophan für UGA in dem mitochondrialen Genom der Hefe gezeigt werden [75]. Einige Jahre später, 1986, wurde auch in dem Bakterium *Mycoplasma* diese doppelte Funktion von UGA identifiziert [76, 77]. Etwa zur gleichen Zeit entdeckte die Gruppe um Böck den co-translationalen Einbau von Sec durch UGA in *E. coli* [78]. Aber auch der Einbau von Cystein und Arginin in die Polypeptidkette wird durch UGA getriggert [79-82]. Bei allen wird eine bestimmte Abfolge von Nukleotiden auf der mRNA nach dem UGA-Codon gebraucht (*cis*-Faktoren). Nicht-favorisierte Codons, die direkt hinter dem UGA liegen, und die Wobble-Positionen der tRNA's sind bei dem Überlesen des Stoppsignals und den damit verbundenen Einbau von Cys, Trp und Arg wichtig [83]. Für die Insertion von Sec durch UGA ist hingegen eine eigene Translationsmaschinerie zuständig.

Selen wird meistens in Form von Selenit aufgenommen und zu Selenid in der Zelle metabolisiert [72]. Hier wird es für den Einbau in die Selenoproteine als Monoselenphosphat durch die SPS2 zugänglich (siehe Abb. 1.7). SPS2 ist in den meisten Organismen selbst ein Selenoprotein und wirkt damit regulierend auf die Sel-Biosynthese. Sec wird direkt an der eigenen tRNA ($tRNA^{ser[sec]}$) mit Serin als Intermediat synthetisiert. Zwei verschiedene Isoformen der $tRNA^{ser[sec]}$ werden von einem Gen (*trsp*) codiert. Beide Formen unterscheiden sich nur durch eine Methylgruppe an dem Ribosylrest an der Position 34 – die nicht-methylierte 5-Methoxycarbonylmethyl-Uridin- und die methylierte 5-Methoxycarbonylmethyl-2'-O-Methyluridin (mcm^5Um)- Form. Die beiden Isoformen sind an der Regulation der Sel-Biosynthese involviert. Ist genug Selen vorhanden, liegt mcm^5Um vor und spielt vor allem eine Rolle bei der Synthese von stressregulierten Selenoproteinen. Die nicht-methylierte Form ist hingegen auch in Zeiten von Selenmangel vorhanden und ist für die Synthese der *housekeeping* Proteine, wie z. B. TrxR1 und TrxR2 in Säugetieren, zuständig.

Die mit Serin beladene $tRNA^{ser}$ wird durch die Phosphoserinyl-tRNA-Kinase (PSTK) phosphoryliert (siehe Abb. 1.7). Das Phosphat wird dann durch das Monoselenphosphat mittels der Sec-Synthase ausgetauscht.

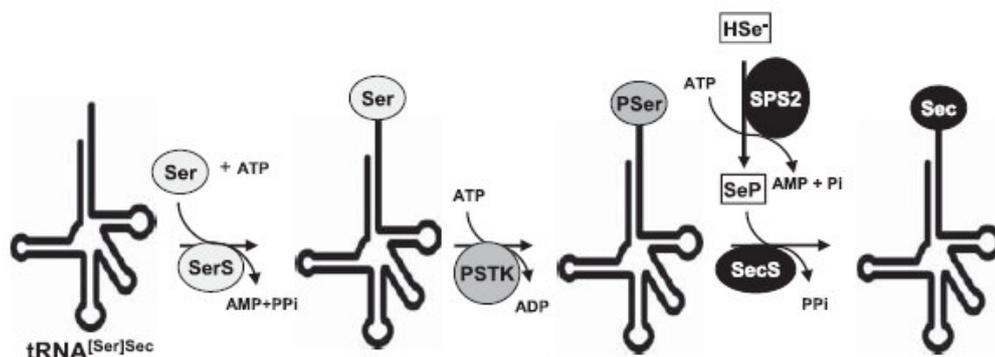


Abb. 1.7 Synthese von Sec an seiner $tRNA^{ser[sec]}$. Erläuterungen sind im Text. Das Bild wurde aus Xu *et al* [84] entnommen.

In Eukaryoten wurde als Homologon zu der in Prokaryoten seit längerem bekannten Sec-Synthase das *soluble liver antigen* (SLA) erst im Jahr 2006 entdeckt [84]. Secp43 bindet SLA sowie die

tRNA^{ser[sec]} [85]. Es ist sowohl an der Regulation von mcm⁵Um als auch an der Stabilisierung des EFSec-SBP2-tRNA^{ser[sec]}-Komplexes und dem damit verbundenen Schutz der mRNA vor Abbau durch den *nonsense-mediated decay* beteiligt [86]. Bei Eukaryoten befindet sich in der 3'-untranslatierten Region auf der mRNA eine Sec-Insertionssequenz (SECIS). Diese kann bis zu mehrere kb von dem UGA-Codon entfernt sein. Es scheint, dass durch unterschiedliche Entfernungen des SECIS-Elementes zu dem UGA-Codon die Expression der Gene verschieden reguliert werden. Dadurch entsteht eine Hierarchie in der Sel-Synthese [87]. Bei Prokaryoten liegt das SECIS-Element hingegen direkt hinter dem UGA-Codon. Die Sequenzen der SECIS-Elemente der verschiedenen Organismen sind untereinander nur schwach ähnlich, haben aber eine starke konservierte sekundäre Struktur [72]. Dieses *cis*-agierende Element formt eine Haarnadelschleife (siehe Abb. 1.8). In der apikalen Schleife liegen zwei konservierte Adenine (AA), selten auch zwei Cytosine (CC). Der SECIS-Kern besteht aus einer Abfolge von drei Nukleotiden, die sich nicht nach den Gesetzen von WATSON und CRICK mit gegenüberliegenden Nukleotiden paaren (*non-Watson-Crick motif*). In der internen Schleife liegt vor dem SECIS-Kern ein konserviertes Adenin, selten ein Guanin. Es sind zwei verschiedene Formen des SECIS-Elementes bekannt. Wobei sich Typ II durch eine zweite apikale Schleife von Typ I unterscheidet.

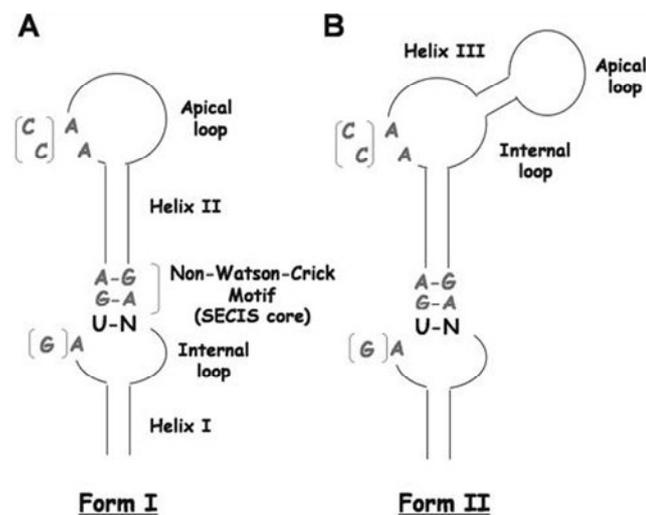


Abb. 1.8 Die zwei verschiedenen Typen der eukaryotischen SECIS-Elemente. Erklärungen sind im Text. Das Bild wurde aus PAPP *et al.* [72] entnommen.

Als ein weiterer *cis*-Faktor wurde auf der mRNA des SelP's von Säugetieren eine zweite RNA-Schleife wenige Nukleotide hinter dem UGA entdeckt [88, 89]. Das *Sec redefinition element* (SRE) ist wahrscheinlich am *fine-tuning* des Sec-Einbaus beteiligt. Daneben kann es aber auch eine Sec-Inkorporation unabhängig von dem SECIS-Element auslösen.

In einem Multiprotein-Komplex sind das SECIS-bindende Protein (SBP2), der spezifische Elongationsfaktor (EFSec), SPS1 – eine zweite Selenophosphat synthetase, die das aus metabolischen Prozessen anfallende Sec recycelt [90] – sowie Secp43 und SLA miteinander verbunden (siehe Abb. 1.9) [86]. Dabei bindet SBP2 an das SECIS-Element mittels der L30-Typ RNA-bindenden Domäne und interagiert mit der 28s rRNA. Dadurch nimmt SBP2 eine zentrale

Rolle in der Sel-Synthese ein [72]. EFSec bindet an SBP2 sowie an der tRNA^{ser[sec]}. Es interagiert jedoch mit fast allen Protein- und RNA-Komponenten der Sel-Synthesemaschinerie. Zu dieser zählt auch L30, welches ebenfalls an das SECIS-Element bindet [91]. Der Vorgang wird als eine kompetitive Verdrängung von SBP2 angenommen und als wichtiger Schritt zur Förderung der Interaktion von tRNA^{ser[sec]} mit der Aminoacyl-Stelle der Ribosomen.

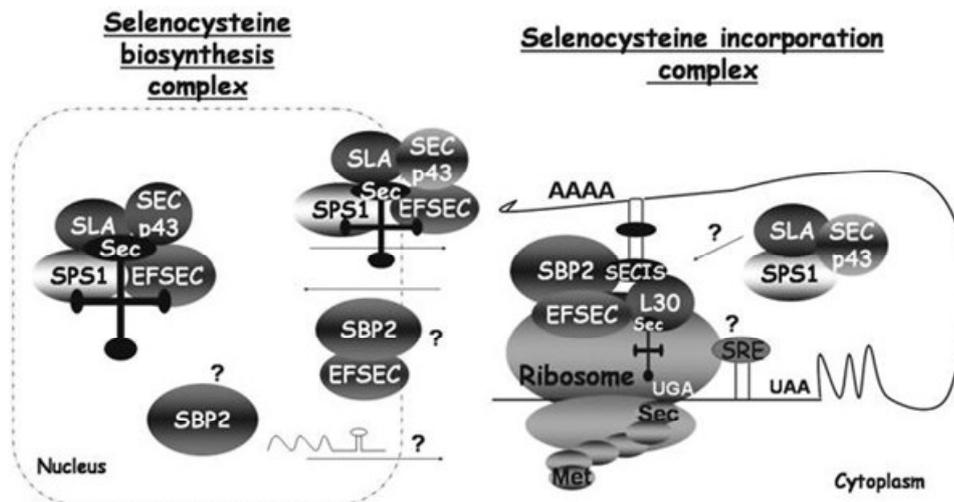


Abb. 1.9 Die Proteinkomplexe während der Selenoprotein-Biosynthese. Erläuterungen sind im Text. Das Bild wurde aus PAPP *et al.* [72] entnommen.

Der Komplex kann wahrscheinlich zwischen Nucleus und Cytosol, vermittelt durch ein Nucleus-Lokalisationssignal (NLS) und ein Nucleus-Exportsignal, in den Sequenzen von EFSec und SBP2 pendeln [72].

Die Biosynthese der Selenoproteine in Säugetieren wird auf transkriptionaler, post-transkriptionaler und translationaler Ebene reguliert. Bei allen Regulationsmechanismen sind Hierarchien erkennbar. Selen nimmt selbst eine zentrale Rolle ein. Ist Selen vorhanden, wird die Stabilität der mRNA erhöht und der Abbau dieser über den *nonsense-mediated decay* erniedrigt. Selen reguliert die Effizienz des Sec-Einbaus für UGA und reguliert das Verhältnis der beiden tRNA^{ser[sec]}-Isoformen, wodurch sich eine Hierarchie in der Expression der Selenoproteine ergibt. Der Proteinlevel der Säuger-Sel's wird auch durch oxidativen Stress reguliert [72]. Wobei in einer cysteinreichen Region in SBP2 durch ROS Disulfide geformt werden und sich dadurch die Aktivität und Lokalisation von SBP2 ändert [92].

1.4.3 Selenoproteine in *Plasmodium*

In den *Plasmodium* Spezies wurden 2006 die Gene für SBP2, EFSec, SPS und tRNA^{ser[sec]} durch BLAST entdeckt [93]. Weiterhin wurden in *Plasmodium falciparum* vier SECIS-Elemente gefunden, die für jeweils vier verschiedene Gene plasmodialer Selenoproteine fungieren. Diese SECIS-Elemente ordnen sich in den TypII ein: Sie besitzen alle eine zusätzliche apikale Schleife, zwei ungepaarte Adenine in der ersten apikalen Schleife, den SECIS-Kern mit der UGAN...NGAN-Sequenz, die nicht nach den Kriterien von WATSON und CRICK gepaart ist, sowie ein ungepaartes

Adenin in der inneren Schleife vor dem SECIS-Kern.

Zwei der vier Gene für die Selenoproteine, *pfSel1* und *pfSel4*, liegen auf dem Chromosomen 14. Hingegen liegen *pfSel2* und *pfSel3* auf den Chromosomen 9 bzw. 8 und werden jeweils durch ein einzelnes Exon codiert (siehe Abb. 1.10). Die Gene für die Selenoproteine *PfSel1* und *PfSel4* sind dagegen in drei bzw. zwei Exons unterteilt. Allen vier Genen ist gemein, dass das UGA in dem letzten Exon liegt.

Für die vier Selenoproteine konnten durch BLAST keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen außerhalb der Spezies *Plasmodium* gefunden werden. Innerhalb der *Plasmodium*-Gruppe sind die Proteine indessen stark konserviert.

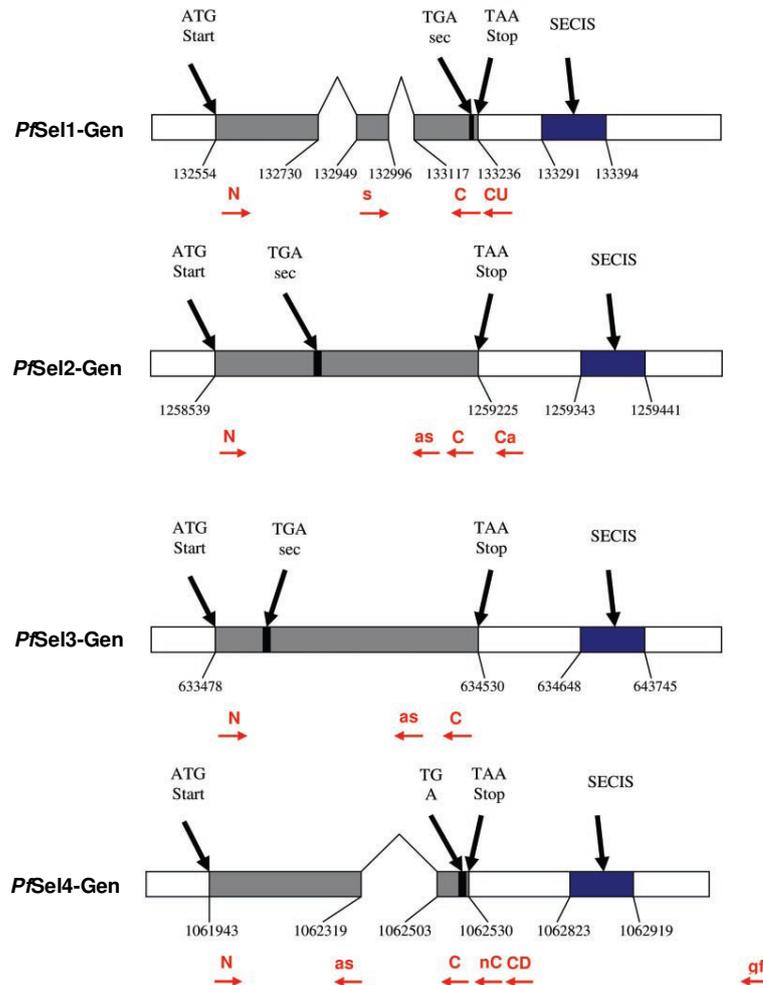


Abb. 1.10 Die Genorganisation der plasmodialen Selenoproteine. Erläuterungen sind im Text. Das Bild wurde aus LOBANOV *et al.* [93] entnommen.

Das Sec von *PfSel1* (PlasmoDB: *Pf14_0033*) und *PfSel4* (PlasmoDB: *Pf14_0251*) ist jeweils am C-Term als vorletzte Aminosäure lokalisiert (siehe Abb. 1.10). Dies ähnelt verschiedenen Säuger-Selenoproteinen, wie TrxR, SelK, SelS und SelO. Das Sec ist in *PfSel1* in dem Redox-Motiv CxxxxU organisiert (siehe Abb. 1.11), welches ähnlich dem CxxxxC-Motiv der GR und TrxR [94] ist und somit eine mögliche Redoxaktivität von *PfSel1* vermuten lässt. Auch *PfSel2* (PlasmoDB: PFI1515w) weist Sec in einem Redox-Motiv CxxU auf (siehe Abb. 1.11). Dieses ist jedoch, wie in

PfSel3 (PlasmoDB: MAL8P1.86), am N-Term lokalisiert. CxxU-Motive sind auch in verschiedenen Säugetier-Selenoproteinen, wie SelH, SelM, SelO, SelP, SelT, SelV und SelW bekannt. Auch hier lässt das CxxU-Motiv in *PfSel2* auf eine Redoxaktivität, wie für *PfSel1*, schließen. Das Sec von *PfSel3* und *PfSel4* ist hingegen in keinem bekannten Motiv angeordnet.

<i>PfSel1</i>GT <u>CL</u> GSTUG
<i>PfSel2</i>	<u>M</u> KAYVYV <u>V</u> IILKVVLLLLFFSYDFIFLKNEDNIIKG KGSSFLKSSYELLFVQKDVLLPHIKKNNQISIF L <u>CR</u> S <u>U</u> QS.....
<i>PfSel3</i>	<u>M</u> ILKKVYILILILLSILSRTVDSG <u>U</u> SKQLHIK....
<i>PfSel4</i>RYNNRKS <u>U</u> R

Abb. 1.11 Organisation des Selenocysteins in den plasmodialen Selenoproteinen. Die Selenocysteine und Cysteine sind fett hervorgehoben. Mögliche Signalpeptide sind unterstrichen.

Für *PfSel2* und *PfSel3* stellten LOBANOV *et al.* die These auf, dass diese Proteine in dem Apicoplasten lokalisiert sind. Die Signalpeptide dafür sind zweiteilig [95, 96]. Der erste hydrophobe Teil signalisiert für einen co-translationalen Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Eine basische zweite Sequenz, das sogenannte Transitpeptid, liegt *downstream* des ersten Teils und fungiert für den Transport in den Apicoplasten. Eine Apicoplasten-Lokalisation ist bis heute noch nicht vollständig verstanden und eine Vorhersage damit ungenau. In Abb. 1.11 sind daher nur die vorhergesagten ER-Signalpeptide hervorgehoben. Für *PfSel1* und *PfSel4* konnten keine möglichen Signalpeptide vorhergesagt werden. Es wurde somit angenommen, dass die Proteine im Cytosol aufzufinden sind.

Eine Expression in dem erythrozytären Lebenszyklus konnte für alle vier Selenoproteine durch Analysen der Microarray-Daten von PlasmoDB bestätigt werden. Dabei scheint *PfSel1* vor allem in Schizonten, *PfSel2* über den gesamten Zyklus, *PfSel3* in Trophozoiten und *PfSel4* in Ringen/Schizonten exprimiert zu werden.

Aufgrund der Einzigartigkeit der plasmodialen Sel's, deren Expression während des erythrozytären Lebenszyklus', der vorhergesagten Lokalisation von *PfSel2* und *PfSel3* in dem Apicoplasten, einem Organell, das nur in den Parasiten der Apicomplexa vorkommt, sowie der Insertion von Selenocystein, das stark auf elektrophile Komponenten und Inhibitoren anspricht, sind diese vier Proteine vielversprechende *drug targets*.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das bisher weitgehend unbekanntes Selenoproteom aus *P. falciparum* genauer zu charakterisieren und die Funktion der vier Selenoproteine aufzuklären. Selenoproteine sind durch die Insertion von Selenocystein nukleophil. Studien an humanen Selenoproteinen zeigen gute Inhibitionen dieser Proteine durch verschiedene elektrophile Komponenten. Die vier plasmodialen Selenoproteine, *PfSel1* – *PfSel4*, sind zu bisher bekannten Selenoproteinen aus anderen Organismen nicht homolog und scheinen für die *Plasmodium*-Spezies einzigartig zu sein. Daneben wurde für zwei der Proteine eine Lokalisation in dem Apicoplasten, einem Organell, das nur in dem Phylum Apicomplexa vorkommt, vorhergesagt. Weiterhin werden diese Selenoproteine in dem erythrozytären Lebenszyklus des Malariaerregers exprimiert. Aufgrund dessen stellen die plasmodialen Selenoproteine potenzielle *drug targets* für die Bekämpfung der Malaria dar. Somit ergibt sich das sekundäre Ziel dieser Arbeit: einen Beitrag in der rationalen Medikamenten-Entwicklung gegen Malaria zu leisten.

Für die genauere Charakterisierung wurden bioinformatische Analysen herangezogen und die Sequenzen der plasmodialen Selenoproteine gegenüber verschiedenen Selenoprotein-Sequenzen aus anderen Organismen verglichen sowie deren Verwandtschaftsverhältnisse in phylogenetischen Bäumen dargestellt. Durch diese Methoden konnten neue Informationen gewonnen werden, auf die sich weitere Experimente im *wetlab* aufbauten. Es wurden aus *E. coli* überexprimierte, rekombinante Proteine gewonnen, anhand derer erste Untersuchungen auf Redox-Aktivität, Oligomerisierungszustände und Interaktomanalysen durchgeführt wurden.

Die quantitative *real time*-PCR wurde zur Erforschung des mRNA-Levels der vier Selenoproteine sowie einiger Faktoren, die in der Selenoprotein-Synthese beteiligt sind und einiger plasmodialer redox-aktiver Proteine unter nitrosativen und oxidativen Stressbedingungen sowie unter verschiedenen Selenverfügbarkeiten genutzt.

Lokalisationsstudien von Zielproteinen, die an das grün-fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt sind, sind anerkannte Methoden. Daher wurden für die plasmodialen Selenoproteine verschiedene GFP-Fusionskonstrukte erstellt und diese *in vivo* lokalisiert. Mit einem dieser Konstrukte für *PfSel2* wurde weiterhin ein Calcium-Assay *in vivo* durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
BioPhotometer	Eppendorf Hamburg
Elektrophoreseapp. Mini-Protean 3 Cell mit Power Pac 300	BioRad, München
Elektrophoreseapp. Owl EasyCast Minigel System	Thermo Scientific, Dreieich
Elektroblotapp. Pharmacia LKB Multiphor II Novablot mit EPS 200	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektroporator BioRad X-Cell	BioRad, München
FPLC-Fraktionssammler Frac-900	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FPLC-System ÄKTA	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FPLC-Säule HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FPLC-Software Unicorn	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000	BioRad, München
Heizblock neoBlockII	neoLab, Heidelberg
Hybridisierungssofen OV2	Biometra, Göttingen
Infinite M200 multiplate reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Inkubator Certomat® H	Sartorius, Göttingen
Inkubator Hera Cell für <i>P. falciparum</i> -Kultur	Heraeus Instruments, Hanau
Inkubator <i>Orbital shaker</i>	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Magnetrührer RCT <i>basic</i>	IKA Werke, Staufen
Mikroskop Axiostar	Zeiss, Jena
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher, Wilmington, USA
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckmann, München
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Gilson Pipetman	Abimed, Langenfeld
Reinstwasseranlage OPTILAB-Plus	membraPure, Bodenheim
Optimax Typ TR für Röntgenfilmentwicklung	Protec, Oberstenfeld

Quadro MACS [®] magnetische Affinitätssäulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Rotor-Gene 3000 Real-Time PCR	Corbett Research, Sydney, Australien
Schüttler UNIMAX 2010	Heidolph, Schwabach
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Thermomixer Comfort	Eppendorf, München
Ultraschallapparat	Bandelin Electronics, Berlin
UV-Tischlampe	Gibco BRL, Scientific Industries, Eggenstein
UV/Vis-Spectrophotometer Beckman DU [®] 650	Beckmann, München
Vaccusafe comfort	IBS Intrega Biosciences, Fernwald
Vakuumzentrifuge SpeedVac	Thermo Scientific Savant, Milford, USA
Vortex Minishaker MS2	IKA Werke, Staufen
Waage 474-32	Beckmann, München
Waage Bosch PE626	Bosch & Sohn, Jungingen
Waage SBC 22 Präzisionswaage	Scaltec Instruments, Göttingen
Zählkammer Neubauer improved	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Zentrifugenbecher	Nalgene, Rochester, USA
Zentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf, München
Zentrifuge Sorvall RC5 Plus (Rotor SS-34 und SLA-3000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm [™] ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpipetten	Greiner, Kremsmünster
Elektroporationsküvette (Biorad: 165-2086)	BioRad, München
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Impfösen	Nunc, Dänemark
Konische Zentrifugenröhrchen (Falcons)	Roth, Karlsruhe
Microplatte 96-Well schwarz, flach, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger SuperFrost Color geschliffen	Menzel, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt

Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (Cup)	Eppendorf, Hamburg
Roti®- PVDF Membran	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter 0,2 µm FP030	Schleicher & Schüll, Kassel
Strip-Tubes (0,1 µl) und Deckel VE 1000 für qRT-PCR	LTF Labortechnik, Wasserburg/B.
UVetten	Eppendorf, Hamburg
Vivaspin 20, 500	Sartorius Stedim, Göttingen

2.1.3 Chemikalien

4-Aminophenylarsenoxid	Toronto Research Chemicals, North York, Kanada
6-Aminohexansäure	Merk, Darmstadt
Adenosin-5'-diphosphat	Sigma, Steinheim
Albumax	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bio-Rad <i>Protein Assay</i> (Bradford-Reagenz)	BioRad, München
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl)	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R 250	Sigma, Steinheim
Cumarinsäure	Sigma, Steinheim
Cystatin	Sigma, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dimethyladipimidatdihydrochlorid (DMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisenchlorid (FeCl ₃)	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Gentamicin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

Giemsa (0,4%,w/v)	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, UK
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hydroxylamin (NH ₂ OH)	Sigma, Steinheim
Hypoxanthin	Sigma, Steinheim
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Indo-1/Acetoxymethylester	Invitrogen, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumarsenat (KH ₂ AsO ₄)	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-Cystein	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma, Steinheim
Manganchlorid (MnCl ₂)	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MOPS	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumnitroprussid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumselenit	Sigma, Steinheim
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe
Paraquat	Chem Service, West Chester, USA
PBS	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Steinheim
Rhamnose	Becton Dickinson, Sparks, USA

Rinder-Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Gibco	Invitrogen, Karlsruhe
Rubidiumchlorid (RbCl)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Saponin	Roth, Karlsruhe
SELECT Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim
Triethanolamin (TEA)	Sigma, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe
WR99120	Jacobus Pharmaceutical Industry, Princeton, USA

2.1.4 Größenstandards

6xHis Protein Marker	Qiagen, Hilden
GeneRuler™ 100 bp bzw. 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Marker (Spectra™)	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Marker (<i>unstained</i>)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5 Kits für die Proteinbiochemie und Molekularbiologie

6x <i>loading dye</i> für DNA	Fermentas, St. Leon-Rot
HiSpeed Plasmid Maxi-Kits	Qiagen, Hilden
Jumpstart Taq Ready Mix Kit	Sigma, Steinheim
NucleoSpin RNA/Protein-Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep Mini Spin prep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Frankfurt

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SensiMix Sybr Kit	Bioline, London, UK
Verso™ Reverse Transcriptase Kit	ThermoScientific, Wilmington, USA

2.1.6 Enzyme

AccuPrime™ Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase + Puffer	Roche, Mannheim
Desoxyribonuklease I (DNase I bzw. hcDNase) für die Molekularbiologie	Fermentas, St.Leon-Rot
DNase I	Roche, Mannheim
<i>E. coli</i> Glutamin-Synthetase	Sigma, Steinheim
Insulin	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, Steinheim
<i>PfTPx1</i>	AG Becker, JLU Gießen
<i>PfTrx</i>	AG Becker, JLU Gießen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
RedTaq® DNA Polymerase	Sigma, Steinheim
Restriktionsenzyme (alle)	Fermentas, St.Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot

2.1.7 Antikörper

Anti-(His) ₆ ; Maus	Dianova, Hamburg
Anti-ACP, Kaninchen	AG Przyborski, Marburg
Anti-BiP, Kaninchen	AG Przyborski, Marburg
Anti-GFP, Huhn	AG Przyborski, Marburg
Anti-Mouse IgG, Peroxidase-konjugiert, Ziege	AG Przyborski, Marburg

2.1.8 Säulenmaterial für Affinitäts-Chromatographie

ECH Sepharose 4B	Pharmacia Biotech, Stockholm, Schweden
Nickel-Nitrilotriacetat-Agarose (Ni-NTA)	Qiagen, Hilden
Protino®-Ni-TED-Granulat	Machery-Nagel, Düren
TALON Metal Affinity Resin	Clontech, Mountain View, USA

2.1.9 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Einsatz
Carbenicillin (C)	50 mg/ml in 50% Ethanol	50 µg/ml
Chloramphenicol (Ch)	25 mg/ml in 100% Ethanol	12,5 µg/ml
Kanamycin (K)	25 mg/ml in Wasser, sterilfiltriert	25 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in 75% Ethanol	20 µg/ml

2.1.10 Plasmide

Vektor	Resistenz in <i>E. coli</i>	Besonderheit	Bezug
pARL	Carbenicillin	Resistenz für WR99120	AG Cowman, Universität Melbourne, Australien
pARL2	Carbenicillin	Resistenz für WR99120, GFP N-Terminal an Zielsequenz	AG Przyborski, Universität Marburg
pET-28a	Kanamycin		Novagen, Darmstadt
pGEX-4T-1	Carbenicillin	Glutathion-S-Transferase-Fusions-Tag	GE Healthcare, Freiburg
pGRO7	Chloramphenicol	Chaperon-Helferplasmid	TaKaRa über MoBiTec, Göttingen
pQE 30	Carbenicillin		Qiagen, Hilden
pRAREII	Chloramphenicol	Expression von 7 seltenen <i>EctRNAs</i>	Novagen, Darmstadt
pRSETa	Carbenicillin		Invitrogen, Karlsruhe
pSELABC	Chloramphenicol	Expression von <i>Ecselabc</i>	AG Gromer, Universität Heidelberg
pSK	Carbenicillin		Stratagen, La Jolla, USA

2.1.11 Organismen

2.1.11.1 *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Bezug
KRX	[F ⁺ , <i>traD36</i> , $\Delta ompP$, <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , $\Delta(lacZ)M15$] $\Delta ompT$, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96(Naf)</i> , <i>thi-1</i> ,	Promega, Mannheim

	<i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), $e14^-$ (<i>McrA</i> $^-$), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$, $\Delta(rhaBAD)$: T7 RNA Polymerase	
M15 [pREP4]	<i>Nal^S</i> , <i>str^S</i> , <i>rif^S</i> , <i>Km^R</i> , <i>lac⁻</i> , <i>ara⁺</i> , <i>gal⁺</i> , <i>mtl</i> , <i>F</i> , <i>recA⁺</i> , <i>uvr⁺</i> , <i>lon⁺</i>	Qiagen, Hilden
XL-1 Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA</i> , <i>gyrA46 thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>F'</i> [<i>proAB+</i> , <i>lacIq</i> , LacZ M15, Tn10(<i>tetr</i>)]	Stratagene, La Jolla, USA

2.1.11.2 *P. falciparum*-Stamm

3D7 (Chloroquin-sensitiver Stamm) AG Prof. Lanzer, Heidelberg

2.1.12 Puffer und Lösungen

2.1.12.1 Puffer für die SDS-PAGE

Trenngelpuffer	1,5 M TRIS pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS pH 6,8
SDS-Elektrophorese- Puffer	193 mM Glycin 25 M TRIS 0,1% SDS pH 8,3
SDS-Probenpuffer (1x)	12,5 ml Trenngelpuffer 25 ml Glycerin 20 ml SDS (10%) 2 ml Bromphenolblau (0,5%) 35 ml H ₂ O Lagerung bei RT, vor Gebrauch 5% 2-ME zusetzen
SDS-Probenpuffer (4x)	3 ml Sammelgelpuffer 300 mg DTT 400 mg SDS 2 ml Glycerin 1 SpSp Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 40% Isopropanol 10% Essigsäure
Coomassie-Entfärber	8% EtOH 10% Essigsäure

2.1.12.2 Puffer für den Western Blot

Anodenpuffer I	300 mM	TRIS
Anodenpuffer II	25 mM	TRIS
Kathodenpuffer	40 mM	6-Aminohexansäure
Absättigungspuffer	5%	Milchpulver in TBST-Puffer
TBS (<i>TRIS buffered saline</i>)	10 mM	TRIS
	155 mM	NaCl
	pH 7,4	mit HCl einstellen
TBST (<i>TRIS buffered saline Tween</i>)	0,05%	Tween 20 in
	1000 ml	TBS
<i>Ponceau</i> -Färbelösung	1%	Ponceau S
	1%	Essigsäure
<i>Ponceau</i> -Entfärbelösung	1%	Essigsäure
Lösung für Chemiluminiszenz- Detektion	5 mg	Luminol
	20 ml	TRIS (0,1 M, pH 8,6)
	6,3 µl	H ₂ O ₂

2.1.12.3 Puffer für die DNA-Elektrophorese

10x TBE	1 M	TRIS
	1 M	Borsäure
	20 mM	EDTA
	pH 8,0	mit Essigsäure

2.1.12.4 Puffer für die Proteinaufreinigung

+TG-Puffer mit 10% Glycerin (+TG1)	50 mM	HEPES
bzw.	500 mM	KCl
+TG-Puffer mit 1% Glycerin (+TG2)	10% bzw. 1%	Glycerin
	0,1%	Triton X-100
	pH 8,0	
-TG-Puffer (-TG)	50 mM	HEPES
	500 mM	KCl
	pH 8,0	
Ultraschall-Puffer (US-Puffer)	50 mM	Na ₃ PO ₄ ,
	300 mM	NaCl
	pH 8	

2.1.12.5 Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen

TFB1-Puffer	100 mM	RbCl
-------------	--------	------

	30 mM	MnCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	CaCl ₂
	15%	Glycerin
	pH 5,8	mit 1 M HCl
TFB2-Puffer	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	pH 8,0	

2.1.12.6 Puffer für Assays

Stress-Mix	3 µM	FeCl ₃
	10 mM	DTT
	50 mM	Imidazol
	pH 7,0	
Glutamyltransferase-Mix	0,4 mM	ADP
	150 mM	Glutamin
	10 mM	KH ₂ AsO ₄
	20 mM	NH ₂ OH
	0,4 mM	MgCl ₂
	100 mM	HEPES
	pH 7,4	
Stopp-Mix	55 g	FeCl ₃
	20 g	Essigsäure
	21 ml	Konzentrierte HCl/ Liter
TE-Puffer für Insulin-Assay	50 mM	TRIS
	2 mM	EDTA
	pH 7,4	
TE-Puffer für die Alkohol-Fällung	10 mM	TRIS
	1 mM	EDTA
	pH 7,5	mit HCl

2.1.12.7 Puffer für SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel 15% (für 4 Gele)	3,6 ml	H ₂ O _{dd}
	3,75 ml	Trenngelpuffer
	7,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
	0,15 ml	SDS (10%)

Material und Methoden

	75 µl	APS (10%)
	7,5 µl	TEMED
Trenngel 12% (für 4 Gele)	5,1 ml	H ₂ O _{dd}
	3,75 ml	Trenngelpuffer
	6 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
	0,15 ml	SDS (10%)
	75 µl	APS (10%)
	7,5 µl	TEMED
Sammelgel 4% (für 4 Gele)	3,05 ml	H ₂ O _{dd}
	1,25 ml	Sammelgelpuffer
	0,65 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
	0,05 ml	SDS (10%)
	25 µl	APS (10%)
	5 µl	TEMED
Gradientengel 5 -15%	0,66 ml	H ₂ O _{dd}
	0,78 ml	Glycerin
	1,5 ml	Trenngelpuffer
	3 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
	0,06	SDS (10%)
	Davon	5,5 ml einsetzen
	25 µl	APS (10%)
	5 µl	TEMED

2.1.12.8 Puffer für die Zellkultur

Saponin Lyse-Puffer	7 mM	K ₂ HPO ₄
	1 mM	NaH ₂ PO ₄
	11 mM	NaHCO ₃
	58 mM	KCl
	56 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
	14 mM	Glucose
	0,02%	Saponin
	pH 7,4	mit HCl
Ringer-Puffer	122,5 mM	NaCl
	5,4 mM	KCl
	1,2 mM	CaCl ₂
	0,8 mM	MgCl ₂

	11 mM	Glucose
	25 mM	HEPES
	1 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH 7,4	
Cytomix	12 mM	KCl
	0,15 mM	CaCl ₂
	5 mM	MgCl ₂
	10 mM	K ₂ HPO ₄
	10 mM	KH ₂ PO ₄
	25 mM	HEPES
	2 mM	EGTA
	pH 7,6 mit KOH einstellen	

2.1.12.9 Stammlösungen

APS	10% in H ₂ O _{dd} , Lagerung bei -20 °C
Cystatin	40 µM in US-Puffer, Lagerung bei -20 °C
DTT	200 mM in H ₂ O _{dd} , Lagerung bei -20 °C
Indo-1/Acetoxymethyl	2 mM in DMSO, Lagerung bei -20 °C
IPTG	1 M in H ₂ O _{dd} , sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C
Pepstatin A	0,3 mM in US-Puffer, Lagerung bei -20 °C
PMSF	100 mM in DMSO, Lagerung bei RT
Rhamnose	20% in H ₂ O _{dd} , sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C
SDS	10% in H ₂ O _{dd} ; Lagerung bei RT

2.1.13 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Die Medien wurden mit H₂O_{dd} hergestellt und bei 120 °C autoklaviert. Die Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren in den, unter 2.1.9 genannten, Arbeitskonzentrationen zugesetzt. Bei Flüssigmedien geschieht dies kurz vor Gebrauch, bei Agarplatten, wenn das Medium auf 50 – 60 °C abgekühlt ist. Die hier aufgeführten Rezepte beziehen sich jeweils auf 1 l Medium.

- Luria-Bertani (LB): 5 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
- Modifiziertes LB-Medium (mod LB): 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 5 g K₂HPO₄, 0,142 Na₂SO₄, 40 ml Glycerin
- *Terrific Broth* (TB): 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 9,4 g K₂HPO₄, 2,2 g KH₂PO₄, 4 ml Glycerin
- 2x YT: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
- Agarplatten: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar

2.1.14 Oligonukleotide

Die in Tab. 2.1 – Tab. 2.3 aufgeführten *primer* für die qRT-PCR, die PCR und die Sequenzierung wurden von Operon bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Die *primer* wurden per Hand oder mit Hilfe des Software FastPCR 5.2 [97] entwickelt. Hierbei wurden die Standardeinstellungen des Programms genutzt bzw. auf einen niedrigen GC-Gehalt eingestellt, da das plasmodiale Genom 19% GC-Gehalt besitzt. Die *primer*-Sequenzen wurden dann mit dem Online-Hilfsprogramm OligoCalc [98] auf Selbstdimerisierung und Haarnadelbildende Sequenzen kontrolliert. Weiterhin wurden die gewählten *primer*-Sequenzen gegen das *P. falciparum* Genom geblastet, um die Spezifität zu überprüfen.

Tab. 2.1 Verwendete *primer* für qRT-PCR. Die Bestellbezeichnung des jeweiligen *primers* ist in Klammern angeben. T_m = *annealing*-Temperatur des *primers*, as = *antisense*, s = *sense*, Pol. = Polerisation mit *sense* (+) und *antisense* (-).

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	T _m (°C)	Pol.
<i>Pf18srRNA (Pf18sas)</i>	5' - ACAATTCATCATATCTTTCAATCGG - 3'	60	-
<i>Pf18srRNA (Pf18ss)</i>	5' - AGGCTGCACGCGTCTACAC - 3'	60	+
<i>Pf1cysPrx (Pf1cas)</i>	5' - TATATCTTCAATCCATTGATCGTG - 3'	58	-
<i>Pf1cysPrx (Pf1cs)</i>	5' - GTTTGTACCACTGAACTTGCTG - 3'	58	+
<i>PfAOP (PfAOPas3)</i>	5' - CTCTTTTACATTATTGACAGTTG - 3'	53	-
<i>PfAOP (PfAOPs3)</i>	5' - TGATGGTAATAGTTCATTTACAG - 3'	53	+
<i>PfArginyl-tRNA-Synthetase (PfatRNAsyns)</i>	5' - AAGAGATGCATGTTGGTC - 3'	50	+
<i>PfArginyl-tRNA-Synthetase (PfatRNSsynas)</i>	5' - GTACCCAATCACCTA - 3'	50	-
<i>PfEFSec (OPfefsecas)</i>	5' - GTTCTTTTCATACTCCACGTCG - 3'	55	-
<i>PfEFSec (OPfefsecs)</i>	5' - CAAGACGAAAGTTCTTCAGAAG - 3'	55	+
<i>PfGlutaminyl-tRNA-Synthetase (Pfgtrnasynas)</i>	5' - TAATATAGCCTCACAAGC - 3'	53	-
<i>PfGlutaminyl-tRNA-Synthetase (Pfgtrnasyns)</i>	5' - GGCACTTCAAGGGTACCT - 3'	53	+
<i>PfGrx (OPfGrxas)</i>	5' - TTTAAGTATGCTTGAATATTAGCC - 3'	58	-
<i>PfGrx (OPfGrxs)</i>	5' - GAFAACATCATTGCTGTATTTGC - 3'	58	+

<i>Pf</i> Lactat-Dehydrogenase (<i>Pf</i> LDH _{as})	5' - CATT ^{TT} TATT ^{TT} CCATGAGCACCTAC - 3'	58	-
<i>Pf</i> Lactat-Dehydrogenase (<i>Pf</i> LDH _s)	5' - AAACCCAGTAGATGTTATGGTAC - 3'	58	+
<i>Pf</i> SBP2 (<i>OPf</i> SBP2 _{as})	5' - CATTACATTCTTTTATATAAGAATCG - 3'	54	-
<i>Pf</i> SBP2 (<i>OPf</i> SBP2 _s)	5' - ATTGCTCCGAATATTGAACCATC - 3'	54	+
<i>Pf</i> Sel1 (<i>OPf</i> Sp1 _s)	5' - TTAAGACCCTACTTGGACAATC - 3'	60	+
<i>Pf</i> Sel1 (<i>Pf</i> Sp1 _c)	5' - TCAGGTACTTCCCAAGCAGG - 3'	60	-
<i>Pf</i> Sel2 (<i>Pf</i> sp2 _{as4})	5' - CAGATTTGTCCTTAACGTCTGAATGA - 3'	52	-
<i>Pf</i> Sel2 (<i>Pf</i> sp2 _{s4})	5' - TTACCAAACACTGTGAATT - 3'	52	+
<i>Pf</i> Sel3 (<i>OPf</i> sp3 _{as})	5' - CGATTGCATTAATAATATCATACG - 3'	53	-
<i>Pf</i> Sel3 (<i>OPf</i> Sp3 _s)	5' - TAAGTGATGATAACACAACATCC - 3'	53	+
<i>Pf</i> Sel4 (SP4 _{as4})	5' - TATCGTCAGGATTTGCGA - 3'	52	-
<i>Pf</i> Sel4 (SP4 _{s4})	5' - ATGCAGACCAAGCAAACCAAAGTTGG - 3'	52	+
<i>Pf</i> Seryl-tRNA-Synthetase (stRNA _{synas})	5' - TTCGGCACATTCTTCCATAA - 3'	55	-
<i>Pf</i> Seryl-tRNA-Synthetase (stRNA _{syns})	5' - AAGTAGCAGGTCATCGTGGTT - 3'	55	+
<i>Pf</i> SPS (<i>OPf</i> sp _{as})	5' - TCCTGTGCCATGTGTCTAGAC - 3'	60	-
<i>Pf</i> SPS (<i>OPf</i> sp _{ss})	5' - GAGGCCTTTTCTATCTCCACG - 3'	60	+
<i>Pf</i> TPx1 (TPx1 _{as})	5' - TCTGATGGTTTCATGGCTACC - 3'	58	-
<i>Pf</i> TPx1 (TPx1 _s)	5' - TCGACAAGCAAGGTGTTGTTTC - 3'	58	+
<i>Pf</i> TPxGl (<i>Pf</i> TPxGl _{as})	5' - CTTCTCCATTTTATCGACGAG - 3'	58	-
<i>Pf</i> TPxGl (<i>Pf</i> TPxGl _s)	5' - GTAATGGGGATAATACACACC - 3'	58	+
<i>Pf</i> tRNA ^{ser[sec]} (<i>OPf</i> tRNA _{as})	5' - GTGCTCGTTCGCACCGAAGG - 3'	58	-
<i>Pf</i> tRNA ^{ser[sec]} (<i>OPf</i> tRNA _s)	5' - ATGCACCGATGAGTTAGCATG - 3'	58	+
<i>Pf</i> Trx1 (<i>OPf</i> Trx1 _{as})	5' - TTAATGCTGAGTCGTTTGCTCC - 3'	58	-
<i>Pf</i> Trx1 (<i>OPf</i> Trx1 _s)	5' - TGGACCATGCAAAGAATTGCC - 3'	58	+
<i>Pf</i> TrxR (<i>Pf</i> TrxR _{as})	5' - CTGGTATATGTGGTCTACATCC - 3'	58	-
<i>Pf</i> TrxR (<i>Pf</i> TrxR _s)	5' - ATGGGTTAGCCAAGTTAAAAGAC - 3'	58	+

Tab. 2.2 Verwendete primer für RT-PCR. Die Bestellbezeichnung des jeweiligen primers ist in Klammern angeben. Tm = *annealing*-Temperatur des primers, as = *antisense*, s = *sense*, Pol. = Polarisation mit sense (+) und antisense (-)

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Pol.
<i>PfSel3</i> (<i>OPfsp3s</i>)	5' - TCAGCAGTGTCTGTGTATACC - 3'	+
<i>PfSel3</i> (<i>PfSP3s3</i>)	5' - ATGATTTTTAAAAAAGTGTATATACTA - 3'	+
<i>PfSel3</i> (<i>PfSP3s4</i>)	5' - CATTTTAATATTATTAAGTATATTATCC - 3'	+
<i>PfSel3</i> (<i>PfSP3s5</i>)	5' - GAACTGTAGATTCAGGGTGA - 3'	+
<i>PfSel3</i> (<i>PfSP3s6</i>)	5' - ATTACCAGATGAAGATGATGATT - 3'	+
GFP (<i>GFPas1</i>)	5' - CAAAGCATTGAAGACCATACGC - 3'	-

Tab. 2.3 Verwendete primer für GFP-Konstrukte. Die Bestellbezeichnung des jeweiligen primers ist in Klammern angeben. Tm = *annealing*-Temperatur des primers, as = *antisense*, s = *sense*, Pol. = Polarisation mit sense (+) und antisense (-). In fett gedruckter Schrift sind die *linker*, unterstrichen die Restriktionsschnittstellen und umrahmt die Mutationsstellen. Die primer für die Mutagenesen wurden phosphoryliert bestellt.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Pol.
<i>PfSel1</i> mit <i>AvrII</i> (<i>OPfSP1A</i>)	5' - ACGCCTAGG ACCTGCTGC ACCTCAGGTA CTTCCCAAG - 3'	-
<i>PfSel1</i> mit <i>BglII</i> (<i>OPfSP1B</i>)	5' - CATAGATCTATGGATGACAGAAAGGAAAAC - 3'	+
<i>PfSel1:c.345A>T</i> (<i>SP1GFPsmu1</i>)	5' - TGGGAAGTACCTG T GGTGCAGCAG - 3'	+
<i>PfSel1:c.345A>T</i> (<i>SP1GFPasmu1</i>)	5' - CTGCTGCACC A CAGGTA CTTCCCA - 3'	-
<i>PfSel2</i> mit <i>AvrII</i> (<i>OPfSp2A</i>)	5' - ACGCCTAGG ACCTGCTGCT TTTATGAATATTTTTCAGATTTGTC - 3'	-
<i>PfSel2</i> mit <i>BglII</i> (<i>PfSP2B2</i>)	5' - TTAAGATCTATGAAAGCTTATTACGTGGTGATAAT - 3'	+
<i>PfSel2:c.216T>A</i> (<i>SP2mu1s</i>)	5' - TGTGTAGATCTTG A CAATCTCAGTATATA - 3'	+
<i>PfSel2:c.216T>A</i> (<i>SP2mu1as</i>)	5' - TATATACTGAGATTG T CAAGATCTACACA - 3'	-
<i>PfSel3</i> mit <i>AvrII</i> (<i>OPfSp3A</i>)	5' - ACGCCTAGG ACCTGCTGCT GTCCTTTTAAATTTAAAAGGTAAC - 3'	-
<i>PfSel3</i> mit <i>BglII</i>	5' - CATAGATCTATGATTTTTAAAAAAGTGTATATAC - 3'	+

(OP/SP3B)		
<i>PfSel3:c.78T>A</i> (SP3GFPsmu2)	5' - GTAGATTCAGGGTG A TCCAAACAATTA - 3'	+
<i>PfSel3:c.78T>A</i> (SP3GFPasmu2)	5' - TAATTGTTTGGAT T CACCCTGAATCTAC - 3'	-
<i>PfSel3:c.78T>G</i> (SP3GFPsmu3)	5' - GTAGATTCAGGGTG G TCCAAACAATTA - 3'	+
<i>PfSel3:c.78T>G</i> SP3GFPasmu3	5' - TAATTGTTTGGAT C CACCCTGAATCTAC - 3'	-
<i>PfSel3:c.993_994ins.A</i> (SP3smu)	5' - GAAGAGTAAATTTTTTTTTTTTT T ATAATTCTTG - 3'	-
<i>PfSel3:c.993_994ins.A</i> (SP3asmu)	5' - CAAGAATTAT A AAAAAAAAAAAAATTTACTCTTC - 3'	+
<i>PfSel3:c.del.1_998</i> (SP3NLSATGas)	5' - AGAGTAAATTTTT C ATCTCGAGGGGG - 3'	+
<i>PfSel3:c.del.1_998</i> (SP3NLSATGs)	5' - CCCCCTCGAGAT G AAAAAATTTACTCT - 3'	-
<i>PfSel4 mit AvrII</i> (OP/SP4A)	5' - ACG C CTAGG A ACCTGCTGCT CGTCAGGATTTGCGATTATTG - 3'	-
<i>PfSel4 mit BglII</i> (OP/SP4B)	5' - CAT A GATCTATGGACACAAATGAAAATATGAAA - 3'	+
<i>PfSel4:c.399A>T</i> (SP4GFPsmu1)	5' - TCGCAAATCCTG T CGAGCAGCAGG - 3'	+
<i>PfSel4:c.399A>T</i> (SP4GFPasmu1)	5' - CCTGCTGCTCG A CAGGATTTGCGA - 3'	-

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde im kleinen Maßstab mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits bzw. im großen Maßstab für die *P. falciparum*-Transfektionen (siehe Kapitel 2.2.3.6) mit dem HiSpeed Plasmid Maxi-Kits von Qiagen nach Protokoll des Herstellers isoliert.

2.2.1.1.2 Alkohol-Fällung von DNA

Die DNA-Fällung mit Alkohol schloss sich nach einem Maxi-Präp zur Reinigung der konstruierten Vektoren pARL mit den cDNAs der *PfSel*'s und GFP an.

Präzipitiert wurde durch Aussalzen der DNA mit hohen Salzkonzentrationen und Ethanol.

Zur Fällung von DNA aus dem vorliegenden Puffer wurde die Probe zunächst mit 0,1 Volumen von einer 3 M Natriumacetat-Lösung (Endkonzentration 0,3 M) und dann mit 2,5 Volumina kaltem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte bei -20°C für 30 Minuten. Die ausgefällte DNA wurde bei 13000 rpm und 4°C für 15 min sedimentiert und das DNA-Pellet zweimal mit 70% kaltem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Danach konnte das Pellet in 60 – 90 µl TE-Puffer aufgenommen werden.

2.2.1.1.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA

Die Konzentration der DNA kann mittels eines Photometers direkt bei 260 nm gemessen werden.

Dabei ist die Absorption der ultravioletten Strahlung direkt proportional zum Gehalt an DNA.

Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$$(\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung}) \div 1000 = \text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \quad \text{Gl. (1.)}$$

Um den Reinheitsgrad der Probe zu bestimmen, betrachtet man den Quotienten ($\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$). Für eine reine Probe sollte dieser Quotient 1,8 – 2,0 betragen.

2.2.1.1.4 Sequenzierungen und Auswertungen der Sequenzen

Die Sequenzierung wurde zur Analyse der Plasmid-DNA auf (un)erwünschte Mutationen genutzt. Das zu untersuchende Plasmid wurde dazu mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben der Sequenzierlabores des Institut für Mikro- und Molekularbiologie, JLU Gießen, isoliert, in sterilem Wasser verdünnt und dort sequenziert.

Sequenzvergleiche, Vorhersagen der Restriktionsschnittstellen und virtuelle Translationen wurden mittels FastPCR 5.2 [97] und teilweise mit MAFFT Version 6 [99] durchgeführt.

2.2.1.1.5 Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA genutzt. Dadurch war es möglich, bestimmte DNA-Fragmente zu identifizieren und eventuell zu reinigen. Hierbei wurden 0,7 – 1%ige Gele gegossen, welche aus Agarose, 1x TBE-Puffer und *A. bidest* bestanden.

Die Proben wurden mit 6x *loading dye* gemischt (1:6) und in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert und in einem 1x TBE-Puffer für ca. 40 min bei 100 V elektrophoretisch getrennt. Zur genauen Größenabschätzung wurde ein DNA-Größenmarker, 100 bp oder 1 kb, auf dasselbe Gel aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) für 20 Minuten gefärbt, wobei das Ethidiumbromid in die Helices der DNA interkaliert und somit die DNA-

Fragmente unter UV-Licht (254 nm) visualisiert werden konnten. Das Gelbild wurde dann entweder fotografiert oder die gewünschte DNA-Bande bei einer niedrigen UV-Dosis aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Kapitel 2.2.1.1.6).

2.2.1.1.6 Gelextraktion

Auf Agarose getrennte DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht visualisiert und das entsprechende Fragment aus dem Gel ausgeschnitten.

Die DNA wurde anschließend sofort mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück aufgereinigt.

2.2.1.1.7 Transkriptionsprofiling

Zur Analyse der Expression bestimmter Gene wurde die mRNA behandelter Parasiten isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.1.8) und gereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.1.9), in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.2.1.1.10) und mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 2.2.1.1.11) auf Unterschiede untersucht. Die einzelnen Schritte der Isolierung und des Umschreibens in cDNA wurden so weit wie möglich unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.1.8 Isolierung von RNA

Die behandelten Malaria-Parasiten (siehe Kapitel 2.2.3.8) wurden aus -80 °C auf Eis aufgetaut.

Die Isolierung der RNA wurde nach dem Protokoll für das NucleoSpin RNA/Protein-Kit mit einigen Modifikationen durchgeführt.

So wurden 100 – 200 µl Parasitenpellet mit 350 µl RP1-Puffer durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren sowie leichtes Vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde mit weiteren 350 µl RP1-Puffer gemischt und die Parasiten durch dreimal Frieren und Tauen im flüssigen Stickstoff und im Wasserbad geknackt. Anschließend wurde die RNA weiter nach Protokoll des Kit-Herstellers gereinigt. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop™ 1000 gemessen.

Die gereinigte RNA wurde entweder bei -80 °C aufbewahrt oder sofort zur weiteren hcDNase – Behandlung und anschließender cDNA-Synthese genutzt.

2.2.1.1.9 hcDNase und RNA-CleanUp

6 µg der gereinigten RNA wurden zum Verdau eventuell noch vorhandener DNA in einem 60 µl Ansatz mit 1,5 µl *high concentrated* DNase (hcDNase, 50 u/µl) für 30 Minuten bei 37 °C behandelt. Die Reaktion wurde mit 6 µl 25 mM EDTA bei 65 °C in 10 Minuten abgestoppt.

Der gesamte Ansatz wurde im Nachhinein von DNase, Pufferkomponenten und EDTA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kit gereinigt.

Die Konzentration der RNA wurde mittels eines NanoDrop™ 1000 gemessen und die Proben entweder bei -80 °C gelagert oder zur weiteren cDNA-Synthese verwendet.

2.2.1.1.10 cDNA-Synthese

700 ng der isolierten, hcDNase-verdauten und gereinigten RNA wurden in einem 20 µl Ansatz nach Protokoll des Verso™ Reverse Transcriptase Kits in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde ein 1:3-Mix aus oligo-dT *primern* und *random* Hexameren benutzt. Das Volumen und somit die Menge an RNA konnte in einer Reaktion aufgestockt werden.

Für ein Ausschließen etwaiger Fehler in der RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurden jeweils zwei cDNA-Reihen erstellt, die in der qRT-PCR gesondert voneinander analysiert wurden.

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.1.11 Quantitative *real time*-PCR

Durch die quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR) kann die Amplifizierung eines bestimmten PCR-Produktes in Echtzeit verfolgt und die mRNA-Konzentration bestimmt werden. Die Produktzunahme wird durch den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes in das PCR-Produkt gemessen. Innerhalb der exponentiellen Phase der Produktbildung kann ein Rückschluss auf die eingesetzte Menge der untersuchten RNA in der gesamten RNA gezogen werden.

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in dieser Arbeit Sybr Green I genutzt. Für die unterschiedlichen Behandlungen wurden zwei verschiedene Sybr Green I-Kits verwendet, zum einen das SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix Kit für die Behandlungen mit Paraquat (P) sowie Natriumnitroprussid (SNP) und zum anderen das SensiMix Sybr Kit für die Natriumselenit (Se)- bzw. Methylenblau (MB)-Behandlungen.

Für die qRT-PCR wurde die cDNA zuvor 1:5 in sterilem *A. bidest* verdünnt. Die verdünnte cDNA wurde bis zu einer weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Pro Probe wurde unter Verwendung des Kit-Herstellerprotokolls ein Mastermix, ausreichend für je 3 x 10 µl (SensiMix Sybr Kit) bzw. 3 x 20 µl (SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix Kit) Reaktionsansätze, erstellt. Die Ansätze wurden jeweils in Triplikaten auf Eis pipettiert.

Für eine Kontrolle der *primer*-Effizienz wurde eine Eichreihe mit sieben unterschiedlichen Konzentrationen an cDNA erstellt. Dafür wurde ein Pool aus allen verfügbaren cDNAs der Behandlungsreihe und cDNA-Reihe erstellt. Die Verdünnungsreihe mit 1:1 verdünnten Proben in sterilem *A. dest* wurde erstellt und nach Protokoll mit dem Sybr Green-Kit und *primern* vermengt. Eine achte Probe enthielt anstatt der cDNA nur *A. bidest* (*no template control*), welche zur Analyse von *primer*-Dimeren diente.

Die qRT-PCR wurde in einem Rotor-Gene 3000 durchgeführt. Die Einstellung des Programms in der Rotor-Gene 6.0 Analyse-Software, wie Temperatur und Zeit, hingen von dem verwendeten Kit sowie der *primer annealing*-Temperatur (siehe Tab. 2.1) ab. Die *extension*-Temperatur wurde für die meisten qRT-PCRs mit 68 °C, aufgrund der AT-reichen Sequenzen, niedriger als bei üblichen PCRs gewählt [100]. Im Allgemeinen wurden 35 – 40 Zyklen durchgeführt. Nach der eigentlichen qRT-PCR wurden die Schmelztemperaturen der einzelnen PCR-Produkte ermittelt. Dies diente zur Analyse von Kontaminationen und *primer*-Dimeren.

2.2.1.1.12 Auswertung der qRT-PCR

Nach dem qRT-PCR-Lauf wurden mit Hilfe der Rotor-Gene 6.0 Software die Schmelzpunkte der einzelnen Proben analysiert. Idealerweise hatten alle Proben den gleichen Schmelzpunkt. Wicht eine Probe von diesem Wert ab, wurde von einer Kontamination ausgegangen und die Probe aus den weiteren Berechnungen entzogen.

In die Eichreihe wurde eine *threshold*-Gerade gelegt und anhand dieser Geraden die CT-Werte aller Proben ermittelt. Der *threshold* sollte in der exponentiellen Phase der PCR liegen. Der Anstieg lag bei einem logarithmischen Auftrag der Konzentration gegen die CT-Werte in den besten Fällen zwischen -3,1 und -3,6. Aus dem Anstieg konnte der Amplifikations- bzw. Reaktionseffizienzwert berechnet werden. Bei einem perfekten Lauf lagen diese Werte bei 2 bzw. 1. Wurden diese Werte ermittelt konnten die CT-Werte der einzelnen Probe beurteilt werden. Die Triplikate sollten idealerweise die gleichen CT-Werte besitzen. Bei einer zu starken Abweichung wurde nach genauem Analysieren die verfälschte Probe aus der Berechnung genommen. Wichen alle Proben voneinander ab, wurden wiederum alle Proben in die Berechnung einbezogen. Aus den CT-Werten der Triplikate wurde ein Mittelwert ermittelt. Der Mittelwert der CT-Werte der Probe wurde von dem Mittelwert der unbehandelten Kontrolle subtrahiert (ΔCT_{Ziel}). ΔCT_{Ziel} wurde für die weiteren Berechnungen nach PFAFFL *et al.* hinzugezogen [101].

Die Berechnung der relativen mRNA-Konzentration nach PFAFFL *et al.* beruht auf einer Berichtigung der Amplifikationseffizienz (E) durch das Hinzuziehen einer internen Kontrolle [101]. Es gibt kein perfektes Kontrollgen, dass konstitutiv, d. h. in jeder Behandlung zu jedem Zeitpunkt gleich, exprimiert wird [102]. Daher wurden verschiedene Referenzgene, namentlich Seryl-tRNA-Synthetase (stRNAsyn) [103], Arginyl-tRNA-Synthetase (atRNAsyn) [104], Glutaminyl-tRNA-Synthetase (gtRNAsyn), Lactat-Dehydrogenase (LDH) [105] und 18s rRNA (18s), gemessen. Deren CT-Werte wurden analysiert und mittels GeNorm [106] sowie Normfinder [102] der Normfaktor (NF) der stabilsten Kombination für eine Behandlung berechnet. Dieser NF wurde für die Normalisierung als Korrekturfaktor für die relative mRNA-Konzentration des Zielgens genutzt. Die folgende Formel wurde für alle Proben angewandt:

$$\text{relative [mRNA]} = \frac{(E_{\text{Ziel}})^{\Delta CT_{\text{Ziel}}}}{\text{NF}} \quad \text{Gl. (2)}$$

Aus den berechneten relativen mRNA-Konzentrationen der zwei verschiedenen cDNA-Pools (siehe Kapitel 2.2.1.1.10) wurden die Mittelwerte und deren Standardfehler berechnet. Für die Bewertung der mRNA-Level wurden drei Kategorien erstellt: a) erniedrigter Level, alle Werte $\leq 0,666$, b) normaler Level, alle Werte zwischen 0,666 und 1,5, c) erhöhter Level, alle Werte $\geq 1,5$. Eine Aussage eines Wertes wurde nur als wahr (*) angenommen, wenn beide ermittelten Werte eines Zielgens zu einem Behandlungszeitpunkt in die gleiche Kategorie fielen. Fielen die ermittelten Werte in jeweils eine andere Kategorie, so wurde die Aussage als nicht wahr angenommen.

2.2.1.1.13 RT-PCR

Mit der *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* kann die Genexpression verschiedener Gene qualitativ analysiert werden. Hierbei wird zuerst die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann in einer PCR vervielfältigt wird. Das amplifizierte PCR-Produkt kann dann auf einem Agarose-Gel analysiert werden. Durch die RT-PCR ist es so möglich spezifische Gene intronfrei zu vervielfältigen und gegebenenfalls zu klonieren. Daneben kann auch die analysiert werden, ob ein Gen in verschiedenen Isoformen exprimiert wird.

Hier diente die RT-PCR zur Analyse der mRNA des *PfSel3.c.del.SECIS-GFP*-Konstruktes aus der entsprechend transfizierten *P. falciparum*-Kultur. Es sollte durch die RT-PCR untersucht werden, ob eine vollständige Transkription des klonierten GFP-Fusions-Gens vorliegt.

Dazu wurde zuerst eine große Platte einer transfizierten *P. falciparum*-Kultur geerntet, die mRNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.1.8) und gereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.1.9) und diese dann in cDNA (siehe Kapitel 2.2.1.1.10) umgeschrieben. Die cDNA wurde unter Nutzen des stets gleichen *antisense primers* (GFPas1), der zu einer Region im GFP-Fragment komplementär war, und verschiedener *sense primer*, die komplementär zum 5'-Ende der cDNA waren (siehe Tab. 2.2), mittels PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.1.2.2) und in einem Gel (siehe Kapitel 2.2.1.1.5) auf erfolgreiche Amplifizierung und Größe analysiert.

2.2.1.2 *In vitro*-Modifikationen und Rekombinationen von DNA

2.2.1.2.1 Herstellung von C-terminal GFP-getaggten *PfSel*-Konstrukten

Zur Lokalisation der Selenoproteine in *Plasmodium falciparum in vivo* wurden für jedes der Gene verschiedene Konstrukte entwickelt. Hierbei wurde jeweils das entsprechende DNA-Fragment ohne Stoppcodon und SECIS-Element amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.1.2.2), in den GFP-beinhaltenen Vektor pSK mittels *Bgl*I und *Avr*II Schnittstellen kloniert (siehe Kapitel 2.2.1.2.3.1) und in den Transfektionsvektor pARL an den Restriktionsschnittstellen *Xho*I umklont (siehe Kapitel 2.2.1.2.3.2). Der Vektor wurde in *E. coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.2.4), durch einen Maxi-Präp isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.1.1) und nochmals durch eine Alkohol-Fällung steril gereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.1.2). Für die Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.3.6) wurden 100 – 200 µg DNA eingesetzt. Die transfizierten Parasiten wurden durch die Zugabe von 5 nM des Antifolats WR99120 selektiert.

2.2.1.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird zur *in vitro*-Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten genutzt. Hierbei wird ein *primer*-Paar verwendet, das dem gewünschten DNA-Teil (*template*) komplementär ist und diesen flankiert.

Um ein GFP-getaggtes Selenoprotein zu erhalten, wurde in der jeweiligen PCR ein *primer*, der dem 3'-Ende des Gens (*antisense*) komplementär ist, ohne das Stopp-Codon (TAA), verwendet.

Die für die Klonierung nötigen Schnittstellen *Bgl*II am 5'-Terminus sowie *Avr*II (entspricht *Xma*I) am 3'-Terminus und der für die GFP-Flexibilität verwendete *linker* GCAGCAGGT wurden ebenfalls über die PCR eingeführt. Die verwendeten *primer* sind unter Tab. 2.3 aufgeführt.

Als *template* wurde zur Herstellung der GFP-Konstrukte jeweils ein Expressionsvektor mit der entsprechenden cDNA benutzt.

Die PCR-Reaktionen wurden entweder mit RedTaq[®] DNA-Polymerase, *Pfu* DNA-Polymerase oder AccuPrime[™] *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Ein Standard-PCR-Ansatz für 50 µl war:

Tab. 2.4 Pipettierschema für eine PCR.

<u>Verwendete Menge</u>	<u>Komponente</u>
1 µl	<i>template</i>
5 µl	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase Puffer 10x
4 µl	dNTP's 2 mM
1 µl	<i>primer sense</i> (100 pmol)
1 µl	<i>primer antisense</i> (100 pmol)
37 µl	H ₂ O _{dd}
1 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase

Dabei war das PCR-Programm im Thermocycler im Allgemeinen auf folgendes eingestellt:

Tab. 2.5 Programmschritte einer PCR.

<u>Programmschritt</u>	<u>Zeit und Temperatur</u>
Aktivierung:	3', 95 °C
Denaturierung:	30'', 95 °C
<i>Annealing</i> :	30'', 55 °C
Extension:	2'30'', 68 °C
25 Zyklen	
Schluss-Extension	4', 68 °C
Halten (<i>hold</i>)	4 °C

Die PCR wurde auf einem Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.1.1.5) auf Erfolg getestet.

Gerichtete Mutagenese

Durch eine gerichtete Mutagenese können gezielt Veränderungen in die Nukleotidsequenz eines bestimmten Gens eingebracht werden.

Für die Lokalisation verschiedener Selenoprotein-Mutanten wurde jeweils das *in frame*-TGA-Codon gerichtet mutiert. So wurden unter anderem TGA>TGT-Mutanten für alle Selenoproteine, sowie eine TGA>TGG-Mutante für *PfSel3* erstellt. Weiterhin wurde die vermeintliche NLS-Sequenz von *PfSel3* amplifiziert und das Startcodon ATG vor der NLS-Sequenz eingeführt. Die verwendeten *primer* sind unter

Tab. 2.3 aufgeführt.

Die Mutagenesen der einzelnen DNA-Fragmente wurden direkt im Vektor pSK durchgeführt. Die einzelnen Komponenten der gerichteten Mutagenese wurden wie folgt pipettiert:

Tab. 2.6 Pipettierschema einer gerichteten Mutagenese.

<u>Verwendete Menge</u>	<u>Komponente</u>
0,5 µl	<i>template</i> (~85 ng)
1 µl	<i>primer sense</i> (100 µM)
1 µl	<i>primer antisense</i> (100 µM)
4 µl	dNTPs (2mM)
5 µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer
35 µl	H ₂ O _{dd}
2,5 µl	DMSO
1 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase

Ein mögliches Programm für die Mutagenese war:

Tab. 2.7 Programmschritte einer gerichteten Mutagenese.

<u>Programmschritt</u>	<u>Zeit und Temperatur</u>
Aktivierung:	90", 94 °C
Denaturierung:	30", 94 °C
<i>annealing</i> :	1', 60 °C
Extension:	11'30", 68 °C
18 Zyklen	
Schluss-Extension	13', 68 °C
Halten (<i>hold</i>)	4 °C

Die Länge des Extension-Schrittes hing von der Länge des zu amplifizierenden Vektors ab.

Für die anschließende Transformation (siehe Kapitel 2.2.2.4) wurden 15 µl Restriktionsansatz eingesetzt.

2.2.1.2.3 DNA-Restriktion

Die Restriktionsendonukleasen wurden einerseits für die Kontrolle erfolgreicher Ligation, andererseits für die Konstruktion von DNA-Molekülen verwendet.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit Probenpuffer versetzt und über ein Agarose-Gel analysiert (siehe Kapitel 2.2.1.1.5). Eventuell schloss sich eine Gelextraktion (siehe Kapitel 2.2.1.1.6) an.

2.2.1.2.3.1 *Bgl*II- und *Xma*I-Restriktion

Die amplifizierten DNA-Fragmente sowie der Vektor pSK wurden, wenn eine Klonierung an GFP erwünscht wurde, zunächst mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Xma*I geschnitten, dadurch

lagen komplementäre Schnittenden für die Ligation vor.

Die Restriktionsansätze wurden nach Herstellerangaben pipettiert. In diesen *double digest*-Ansätzen wurde *Xma*I in einer 2-fach höheren Konzentration eingesetzt als *Bgl*II. Der verwendete Puffer war Orange 10x (Fermentas).

Die Ansätze wurden 2,5 Stunden bei 37°C im Thermoblock inkubiert und danach gereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.2.5).

2.2.1.2.3.2 *Xho*I-Restriktion

Für das Umklonieren der *Pf*Sel-GFP-Konstrukte aus dem pSK-Vektor in den Transfektionsvektor pARL, sowie zur schnellen Kontrolle der Ligation auf einem Agarose-Gel, wurden die Konstrukte mit dem Fast Digest *Xho*I geschnitten.

Hierfür wurden ein (Kontrolle) bzw. zwei (Umklonierung) 20 µl Ansatz/Ansätze nach Herstellerangaben pipettiert.

Die beiden Ansätze wurden 10 – 15 Minuten bei 37°C auf einem Thermoblock inkubiert, mit 4 µl 6x-Auftragspuffer versetzt und zusammen in eine große Tasche eines Agarose-Gels aufgetragen. Für den linearisierten Vektor pARL schloss sich eine Dephosphorylierung an.

2.2.1.2.3.3 *Dpn*I-Restriktion

Um den alten Vektor im PCR-Ansatz, der für die gerichtete Mutagenese (siehe Kapitel 0) als *template* diente, zu zerstören, wurde das gereinigte PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *Dpn*I geschnitten.

Dazu wurden 42 µl des gereinigten PCR-Produktes (siehe Kapitel 2.2.1.2.5) mit 5 µl eines 10x Puffer B+ (inkl. BSA) und 3 µl des Restriktionsenzymes *Dpn*I vermischt. Die Restriktion wurde ein bis zwei Stunden bei 37°C im Thermoblock durchgeführt.

2.2.1.2.4 Dephosphorylierung

Um eine Religation des geschnittenen Transfektionsvektors pARL in den Ligationsansätzen zu verhindern, wurde das Plasmid dephosphoryliert. Dazu wurden sofort nach der *Xho*I-Restriktion des Plasmides direkt in den Reaktionsansatz 1 µl alkalische Phosphatase (AP) und 2 µl AP-Dephosphorylierungs-Puffer dazugegeben und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach schloss sich eine Reinigung (siehe Kapitel 2.2.1.2.5) an.

2.2.1.2.5 Reinigung des PCR-Produktes

Das durch die gerichtete Mutagenese amplifizierte DNA-Fragment, der dephosphorylierte Vektor pARL oder PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben gereinigt und in 50 µl Wasser eluiert. Dadurch wurden Enzyme, Salze, *primer* und nicht-eingebaute Nukleotide von dem gewünschten DNA-Molekül getrennt.

2.2.1.2.6 Ligation

Die geschnittenen und gereinigten DNA-Stücke wurden für die Ligation in den Vektor pSK mit dem Quick Ligase Kit in einem 20 µl Reaktionsansatz, bestehend aus 10 µl Quick Ligase 2x Puffer, 1 µl Quick T4 DNA Ligase sowie verschiedenen Mengen der zu ligierenden Partner und *A. bidest*, für 5-10 Minuten bei RT ligiert.

Für die Umklonierung von pSK in den Transfektionsvektor pARL wurde die T4 DNA-Ligase benutzt. Hier wurde ein 20 µl Ansatz mit 0,5 µl T4 DNA-Ligase, 2 µl T4 DNA-Ligase 2x Puffer sowie ebenfalls variierenden Mengen an Ligationspartnern und *A. bidest* angesetzt.

Die einzusetzende Menge des zu ligierenden DNA-Teils und des entsprechenden Vektors wurde nach folgender Formel berechne:

$$\frac{5 \times \text{gewünschte Menge Vektor (ng)} \times \text{bp DNA - Fragment}}{\text{bp Vektor}} = x \text{ ng} \quad \text{Gl. (3)}$$

Der Vektor wurde meist zu 25 oder 50 ng eingesetzt.

Nach der Ligation schloss sich eine Transformation an (siehe Kapitel 2.2.2.4), wobei bei der Quick Ligation 3 µl und bei der Transformation nach Umklonierung 10 µl eingesetzt wurden. In beiden Fällen wurden jedoch auf je drei LB-Agarplatten jeweils ca. 160 µl Ansatz ausplattiert.

2.2.1.2.7 Gensynthese

Der genetische Code ist degeneriert und Aminosäuren werden so meist durch mehr als ein Triplet codiert. Dadurch entsteht in der Nutzung der Codons eine große Vielfalt. Unterschiedliche Organismen favorisieren für ein und dieselbe Aminosäure ein unterschiedliches Codon (*codon usage*). Durch Nutzung von meist Cytosin- und Guaninhaltigen Codons entsteht ein Genom mit einem hohen GC-Gehalt. Werden überwiegend Adenin und Thymin genutzt, kommt es hingegen zu einem AT-reichen Genom. *Plasmodium falciparum* ist ein Organismus mit einem extrem hohen AT-Gehalt von rund 80,6% [107]. Auf der anderen Seite ist *E. coli* ein Vertreter der Gruppe mit hohem GC-Gehalt (ca. 50,6%) im Genom [108].

Aufgrund dieser Diskrepanz kann es zu einer erschwerten Translation während der heterologen Überexpression von plasmodialen Genen in *E. coli* kommen. Um die Biosynthese der plasmodialen Gene in *E. coli* zu erleichtern, wurde für *PfSel2* und *PfSel4* eine Gensynthese mit Optimierung der *codon usage* (Sloning, Puchheim, Deutschland) durchgeführt [109]. Diese Konstrukte wurden dann in der heterologen Überexpression eingesetzt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Flüssigkulturen von *E. coli*

Für eine *E. coli*-Flüssigkultur wurde 3 ml LB-Nährmedium mit Bakterienzellen, aus einer auf einer Agarplatte gewachsenen Zellkolonie, inokuliert und über Nacht inkubiert. Die Nährmedien

enthielten zur Selektion entsprechende Antibiotika. Diese Kulturen wurden zur Gewinnung der Plasmid-DNA oder zur heterologen Überexpression genutzt.

2.2.2.2 Plattenkulturen von *E. coli*

Plattenkulturen dienten zum Wachstum einzelner Bakterienkolonien. Dazu wurden die Bakterien mit Hilfe einer sterilen Impföse auf LB-Agarplatten, die die entsprechenden Antibiotika beinhalteten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die anschließende Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C. Unter diesen Bedingungen waren die Platten bis zu vier Wochen haltbar.

2.2.2.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Um *E. coli* Zellen auf eine Transformation vorzubereiten, müssen diese für die Aufnahme der Plasmid-DNA kompetent gemacht werden. Dazu können verschiedene Methoden genutzt werden. In dieser Arbeit wurden chemische Methoden eingesetzt.

2.2.2.3.1 Chemisch-kompetente Zellen mittels Schwermetallen

Mit dieser Methode wurden M15-Zellen, die den Hilfsvektor pRAREII trugen, für weitere Transformationen vorbereitet.

Dazu wurde eine 3 ml Kultur in ein Kanamycin und Chloramphenicol versetztes LB-Medium ÜN vorinkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde in 100 ml LB-Medium überführt, auch hier wurde das Flüssignährmedium mit entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Kultur wurde bis zu einer OD bei 600 nm von 0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Kultur 5 min auf Eis gekühlt. Die Kultur wurde in sterile 50 ml Falcon-Tubes überführt, 5 min bei 3000 rpm und zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml eiskaltem TFB-1-Puffer resuspendiert sowie 90 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 2000 rpm und 4°C sedimentiert, vom TFB-1-Puffer befreit und in eiskaltem TFB-2-Puffer resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden in je 50 µl Aliquots in Reaktionsgefäße überführt und dann in flüssigem Stickstoff schockgefren. Die kompetenten Zellen wurden bis zu einem weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.2.3.2 Chemisch-kompetente Zellen mittels Calciumchlorid

Mittels eines CaCl₂-haltigen Puffers wurden KRX-Zellen, die das Hilfsplasmid pSelABC trugen, zu weiteren Transformationen befähigt.

3 ml LB-Medium wurde mit KRX+pSelABC-Zellen inokuliert und ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde 1 ml der Vorkultur in 100 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einem Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,7 wurde die Kultur auf Eis abgekühlt. Nach 10 min wurde diese auf zwei 50 ml Falcon-Tubes überführt und bei 4000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml sterilfiltriertem und eiskaltem 0,1 M CaCl₂ / 10% Glycerin für 15

min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 4000 rpm bei 4°C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde wieder in 1 ml eiskalten sterilem 0,1 M CaCl₂ / 10% Glycerin resuspendiert und sofort in 50 ml Aliquots in Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu Verwendung aufbewahrt.

2.2.2.4 Transformation und Selektion positiver Klone

Für eine Transformation im Allgemeinen und wenn nicht anders beschrieben, werden 1 µl Plasmid auf 50 µl oder 100 µl kompetente Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Ein anschließender Hitzeschock von 42°C für 90 min (bei eigenen kompetent gemachten Zellen) bzw. 20 min (bei den direkt kompetent bezogenen KRX-Zellen) verstärkte die Aufnahme der Plasmide. Nach der Inkubation auf dem Thermoblock wurden die Zellen auf Eis für ein bis zwei Minuten gekühlt. 400 µl frisches LB-Medium wurde zum Ansatz dazugegeben und die Zellen bei 37°C eine Stunde auf einem Thermoblock inkubiert.

Danach wurden ca. 60 – 160 µl des Transformationsansatzes auf eine LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

Die Selektion positiver Klone erfolgte in jedem Fall über die, auf den verwendeten Plasmiden kodierte, Antibiotikaresistenz (siehe Kapitel 2.1.10).

2.2.2.5 Heterologe Überexpression

Das Nutzen eines fremden Organismus zur Überexpression eines Zielproteins aus einem anderen Organismus wird heterologe Überexpression genannt.

In dieser Arbeit wurden die verschiedenen plasmidialen Selenoproteine jeweils in *E. coli* überexprimiert und ein optimaler Ablauf gesucht. Dabei wurden jeweils verschiedene *E. coli*-Stämme, Medien, Vektoren und Hilfsvektoren, sowie Expressionsbedingungen (Temperatur, Induktorkonzentration, Expressionsdauer etc.) bis zu einer Optimierung der jeweiligen Überexpression getestet. Die Gensynthese spielt hierbei ebenfalls eine wichtige Rolle.

In dieser vorliegenden Arbeit wird nur auf die optimalen Bedingungen der heterologen Überexpression der Selenoproteine eingegangen. Für weitere Daten aller bisherigen Überexpressionsprogramme wird auf die Masterarbeiten von RAPHAEL EBERLE [110] und insbesondere von NICOLE RONZHEIMER [111] verwiesen.

Für die Überexpression wurde eine erste Vorkultur mit einer frischen Zellkolonie in 3 ml LB mit entsprechendem Antibiotikazusatz inokuliert, diese einige Stunden bei 37°C geschüttelt und in eine zweite Vorkultur mit 50 – 200 ml LB oder anderen entsprechendem Medium mit Antibiotika überführt. Die zweite Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Hauptkultur (meist 1 l) wurde mit der zweiten Vorkultur versetzt und ebenfalls bei 37°C inkubiert. Weitere Schritte sind weiter unten (siehe Kapitel 2.2.2.5.1 – 2.2.2.5.5) beschrieben.

Alle Kulturen wurden nach der heterologen Überexpression durch Zentrifugation bei 8000 rpm für

20 Minuten geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Pro 1 mg *E. coli*-Pellet wurden 4 ml +TG1-Puffer zu einer Resuspension der Zellen genutzt. Die resuspendierten Zellen wurden mit den Proteininhibitoren PMSF (10 µl/10 ml), Cystatin (10 µl/10 ml) und Pepstatin (5 µl/10 ml) versetzt und bis zur Proteinreinigung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.5.1 Heterologe Überexpression der *PfSel1* Cysteinmutante

Die heterologe Überexpression von *PfSel1*:p.110u>c wurde im M15 *E. coli*-Stamm durchgeführt. Zur besseren Expression diente der ebenfalls in die M15-Zellen eingebrachte Hilfsvektor pRAREII, der die Informationen für, in *E. coli* selten vorkommende, tRNAs beinhaltet. Das *PfSel1*-Gen wurde zuvor in den Expressionsvektor pQE30 kloniert. Daher wurde ein His-Tag N-terminal an das überexprimierte *PfSel1c* gehangen. Die Überexpression wurde bei 37°C in modifiziertem LB durchgeführt. Nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,8 wurde mit 50 µM IPTG die Expression eingeleitet. Die Kultur wurde 4 Stunden bei 37°C inkubiert und danach geerntet.

2.2.2.5.2 Heterologe Überexpression der *PfSel2* Cysteinmutante

Das Gen für *PfSel2c* wurde zuvor in den Expressionsvektor pET28a kloniert, wobei der His-Tag am C-Term lag. Das gesamte Konstrukt wurde dann in KRX-Zellen, die zuvor schon mit dem Hilfsvektor pRAREII transformiert wurden, eingebracht. Die beste Überexpression konnte durch folgendes Programm erreicht werden:

Nach einer Wachstumsphase bei 37°C bis zu einem Erreichen einer OD600 von ca. 0,8 in TB-Medium wurde die Kultur auf 21°C gehalten. Die Induktion der Expression wurde bei einer OD600 von ca. 1 mit 0,1% einer 20%igen Rhamnose-Lösung durchgeführt. Die Expression fand ÜN bei 21°C statt.

2.2.2.5.3 Heterologe Überexpression des *PfSel2* Wildtyps

Das *PfSel2* WT-Gens mit einer optimalen SECIS-Variante auf der mRNA wurde zuvor in pET28a kloniert. Die Überexpression wurde in KRX-Zellen mit dem Hilfsvektor pSELABC durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zuerst bei 37°C in TB-Medium inkubiert. Bei Erreichen einer OD600 von 1 wurde die Kultur auf 27°C gestellt und für ca. eine halbe Stunde an die kältere Umgebungstemperatur gewöhnt. Danach wurden zu der Kultur 5 µM Natriumselenit und L-Cystein gegeben. Nach einer weiteren halben Stunde wurde die Expression mit 0,1% einer 20%igen Rhamnose gestartet. Die höchste Proteinausbeute konnte erhalten werden, wenn die Kultur nach 5 Stunden geerntet wurde.

2.2.2.5.4 Heterologe Überexpression der *PfSel3* Cysteinmutante

Das Gen für *PfSel3c* lag in dem Vektor pET28a kloniert vor, wobei die His-Tag-Sequenz hinter dem *PfSel3c*-Gen lag. Für die heterologe Überexpression wurde dieser Vektor in kompetente KRX-Zellen mit dem Hilfsvektor pRAREII transformiert (siehe Kapitel 2.2.2.4). Die beste

Überexpression konnte erhalten werden, wenn die Zellen bis zu einer OD600 von 1 bei 37°C in TB-Medium wuchsen und dann auf Raumtemperatur gebracht wurden. Danach wurde die Kultur mittels 0,1% einer 20%igen Rhamnose-Lösung induziert und nach nicht mehr als 3 Stunden bei RT geerntet. Durch Nutzen von Schüttelkolben ohne Schikanen konnte die Anzahl der Abbruchstücke von *PfSel3c* auf einem niedrigen Level gehalten werden.

2.2.2.5.5 Heterologe Überexpression der *PfSel4* Cysteinmutante

Die beste Überexpression für *PfSel4c* konnte in dem Expressionsvektor pQE30 erreicht werden. Die Überexpression wurde in, mit dem Chaperon pGRO7-beinhaltenen M15-Zellen in modifiziertem LB in einem Schüttelkolben ohne Schikane durchgeführt. Nach einer Wachstumsphase bei 37°C bis zu einer OD600 von 1 wurde die Kultur auf RT gestellt und mit 100 µM IPTG und Tetrazyklin induziert. Nach nicht mehr als vier Stunden Expression wurde die Kultur geerntet.

2.2.3 Methodik *Plasmodium falciparum*

2.2.3.1 Mikroskopische Darstellung von *P. falciparum* mittels Giemsa-Färbung

Für die Bestimmung der Parasitämie (siehe Kapitel 2.2.3.2) und zur Unterscheidung des Parasitenstadiums wurde ein Blutausrich der betreffenden Kultur gemacht und dieser mit Giemsa angefärbt. Dabei bilden die beinhaltenen Farbstoffe des Giemsa mit der DNA der Parasiten einen Komplex, wodurch diese dann bläulich-rot erscheinen.

Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen ein Blutausrich der Kultur auf einem Objektträger gemacht, dieser luftgetrocknet, in Methanol fixiert und anschließend in einer frischangesezten Giemsa-Lösung (ca. 1:10 mit *A. dest* verdünnt) für 15 Minuten gefärbt. Das überschüssige Giemsa wurde dann unter fließenden *A. dest* von dem Objektträger gut abgespült. Die Parasiten konnten nach dem Trocknen des Objektträgers unter einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung durch Nutzung des Öl-Immersionsobjektives analysiert werden.

2.2.3.2 Bestimmung der Parasitämie und Zellzahl

2.2.3.2.1 Mittels Giemsa-gefärbten Ausstrichen

Die Parasitämie gibt den prozentualen Anteil der parasitierten Erythrozyten an. Um diese zu bestimmen, wurden von einem Giemsa-gefärbten Blutausrich (siehe Kapitel 2.2.3.1) einlagige Schichten an Erythrozyten ausgesucht. Mit Hilfe eines Zählgitters wurden dort in 10 x 10 Quadraten die Gesamtanzahl an Erythrozyten und die Anzahl an befallenen Erythrozyten ermittelt. Die Parasitämie ergab sich dann aus folgender Berechnung:

$$\frac{\text{Anzahl parasitärer Erythrozyten}}{\text{Gesamtanzahl Erythrozyten}} \times 100 = \text{Parasitämie in \%} \quad \text{Gl. (4)}$$

2.2.3.2.2 Mittels einer Neubauer-*improved* Zählkammer

Um die genaue Zellzahl an parasitierten bzw. nicht-parasitierten Erythrozyten zu bestimmen, wurden 1:10 bzw. 1:100 Verdünnungen der Kulturen erstellt. Auf beiden Seiten einer Neubauer-*improved* Zählkammer wurden je 10 µl der Verdünnung aufgetragen. Die zwei Großquadrate wurden vollständig bei einer Vergrößerung von 40 an einem Licht-Mikroskop ausgezählt. Der Mittelwert beider Großquadrate wurde berechnet und die Zellzahl nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Mittelwert}}{0,1\mu\text{l}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000 \quad \text{Gl. (5)}$$

2.2.3.3 Morphologische Untersuchungen

Die Parasiten wurden nach einer Behandlung mit SNP, P und Se und MB morphologisch beobachtet. Hierfür wurden vor der Zugabe der Substanzen, sowie 9 und 15 Stunden danach, Blutausrichthe der einzelnen Kulturen gemacht, diese Giemsa-gefärbt (siehe Kapitel 2.2.3.1) und die Parasiten unter einem Lichtmikroskop morphologisch, nach Lebenszyklus und Vitalität (z. B. pyknotisch) analysiert.

2.2.3.4 *Plasmodium falciparum* 3D7-Zellkultur

P. falciparum-Parasiten wurden im intraerythrozytären Stadium nach TRAGER und JENSEN [112] kultiviert. Die Parasiten wurden in einem mit 9 mM (0,16%) Glucose, 0,2 mM Hypoxanthin, 2,1 mM L-Glutamin, and 22 µg/ml Gentamycin versetzten RPMI 1640-Medium, gehalten. Weiterhin wurden Leukozyten-freie Erythrozyten der Blutgruppe A⁺, mit einem Hämatokrit im Endvolumen von 3,3% und 0,2% Albumax[®] dazugegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C und einer Begasung von 3% Sauerstoff, 3% Kohlendioxid und 94% Stickstoff in einem Inkubator und in fortlaufender Kultur gehalten. Bei optimalen Bedingungen teilten sich die Parasiten alle 48 Stunden bis zu 7-fach. Die Parasitämie wurde, wenn nicht anders angegeben, auf 1 – 2% für den Erhalt bzw 5 – 8% für die Ernte gebracht. Die Parasitämie wurde dazu nach einer Giemsa-Färbung ermittelt (siehe Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2.1). In dieser Arbeit wurde der Chloroquin-sensitive Stamm 3D7 benutzt.

2.2.3.5 Synchronisation mittels Sorbitol

In frisch angesetzten *P. falciparum*-Kulturen befinden sich die Parasiten in verschiedenen Stadien. Für einige Experimente ist es jedoch erforderlich, eine relativ synchrone Kultur zu benutzen. Daher ist es unabdingbar, hier die Parasiten mittels Sorbitol nach der Methode von LAMBROS [113] zu synchronisieren. Hierbei werden Parasiten im Trophozoiten- bzw. Schizonten-Stadium eliminiert. Für die Synchronisation der *P. falciparum*-Kulturen wurden die Erythrozyten von der Petrischale ab gespült und bei 2500 rpm ohne Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu einem 0,5 ml Pellet wurden 5 ml einer, auf 37°C vorgewärmten, 5%igen (w/v), sterilen Sorbitol-Lösung dazugegeben. Die Erythrozyten wurden dann bei 37°C 5 Minuten inkubiert, bei 2500 rpm abzentrifugiert, das überschüssige Sorbitol abgenommen und das Pellet im frischen Medium

gewaschen. Danach konnten die Erythrozyten wieder in neues Medium gesetzt und inkubiert werden.

Dieser Prozess konnte eventuell noch 2 – 3 wiederholt werden, falls eine weitere Verbesserung der Synchronisation der Kultur erwünscht war.

2.2.3.6 Transfektion von *P. falciparum* mittels Elektroporation und Selektion

Die präparierten pARL-Vektoren mit dem entsprechenden *PfSel*-GFP-Konstrukt (siehe Kapitel 2.2.1.2.1) wurden mittels Elektroporation in *Plasmodium falciparum* transfiziert.

Dazu wurde jeweils eine 15 ml *P. falciparum*-Kultur mit je 5 – 8% Parasitämie im jungen Ringstadium (ca. 6 Stunden alt) angezogen. 100 – 200 µg wurden mit Cytomix-Puffer auf ein Endvolumen von 400 µl gemischt.

5 ml der Kultur wurde bei 2500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und 200 µl der parasitierten Erythrozyten wurden mit DNA-Cytomix-Lösung vermischt. Die Suspension wurde in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette steril überführt.

Die Elektroporation wurde bei 310 V, 950 F, einem unendlichen Widerstand und einer Zeitkonstante von ca. 13 ms in einem Elektroporator BioRad X-Cell durchgeführt.

Die transfizierten Parasiten wurden sofort in 15 ml frisches, vorgewärmtes Medium mit 3,5% Hämatokrit überführt.

Sechs Stunden nach der Transfektion wurden jeweils 5 nM WR99210 dazugegeben. Das Medium wurde täglich gewechselt und wöchentlich 100 µl frische Erythrozyten zugesetzt. Nachdem erste Ringe/Trophozoiten wuchsen, wurde der Mediumwechsel auf jeden zweiten Tag verringert.

2.2.3.7 GFP-Lokalisationsstudien und Immunfluoreszenz

Die Lokalisation der GFP-Konstrukte wurde in Zusammenarbeit mit der AG LINGELBACH, Marburg von DR. PRZYBORSKI durchgeführt.

Die Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd/0.0075% Glutaraldehyd in PBS pH 7,4 nach TONKIN *et al.* [114] 30 min bei 37°C fixiert und das Quenching erfolgte mittels 100 mM Glycin/PBS.

Zur Markierung des Nukleus wurde der DNA-bindende Farbstoff Hoechst (50 ng/ml), zu einer Lokalisation des Endoplasmatischen Retikulums der primäre Antikörper anti-BiP (1:2200) sowie zu einer Lokalisation des Apicoplasten der primäre Antikörper anti-ACP (1:500) genutzt. Cy2 und Cy3-konjugierte sekundäre Antikörper wurden 1:2000 eingesetzt. Die Aufnahmen wurden mittels eines Zeiss Axio Observer *inverse epifluorescence* Mikroskopsystems und entsprechenden Filtern aufgenommen sowie durch die Software Axiovision 4 verarbeitet.

2.2.3.8 Methylenblau-, SNP-, Paraquat- und Natrium-Selenit-Behandlung

Zur Analyse des Effektes von oxidativem bzw. nitrosativem Stress auf die Selenoproteine, deren Biosynthesemaschinerie sowie einiger redoxaktiver Proteine wurden die Parasiten mit MB, P bzw. SNP behandelt. Weiterhin wurden *P. falciparum*-Kulturen mit verschiedenen Konzentrationen an

Se behandelt, um die Auswirkung eines Anstieges des verfügbaren Selens auf die Selenoproteine und deren Translationsmaschinerie zu studieren.

Es wurde stets eine unbehandelte Kontrolle parallel zu den behandelten Proben mitgeföhren.

Für die einzelnen Behandlungen wurden die synchronen Parasiten in großen (45 ml) Petrischalen auf eine Parasitämie von ca. 13% gezogen. 15 Stunden alte Parasiten wurden entweder mit einer Endkonzentration an 15 nM MB, 10 µM SNP, 20 µM P, 0,1 µM Se, 1,5 µM Se bzw. 7 µM Se inkubiert. 3, 6, 9, 12 und 15 Stunden nach Zugabe der einzelnen Substanzen wurden die Parasiten geerntet (siehe Kapitel 2.2.3.9) und die RNA für Transkriptionsprofiling (siehe Kapitel 2.2.1.1.11) genutzt. Hierfür wurden vorab Stammlösungen der Substanzen in *A. bidest* hergestellt.

Für jeden Zeitpunkt der Ernte wurden eigene Parasiten gezogen, sodass für die 3 Stunden und 6 Stunden jeweils 8 Schalen, für 9 Stunden 6, für 12 Stunden 4 und für 15 Stunden 2 Schalen geerntet werden konnten. Die hohe Menge an Parasiten nach den ersten beiden Zeitpunkten war notwendig, da sich hier die Parasiten im Ringstadium befanden und dort die Protein- bzw. mRNA-Ausbeute noch gering ist.

2.2.3.9 Ernte von *P. falciparum*

Zur Gewinnung freier Parasiten wurde zuerst ca. die Hälfte des Mediums vorsichtig abpipettiert und mit dem verbliebenen Medium die Erythrozyten vom Boden der Petrischale abgespült und in ein 15 ml bzw. 50 ml Falcon überführt. Die Erythrozyten wurden bei 1900 rpm 5 Minuten ohne Bremse bei RT pelletiert. Das überstehende Medium wurde vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde in 25 ml Saponin-Lösung resuspendiert und die Mischung auf 45 ml mit Saponin-Lösung aufgefüllt. Die Erythrozyten-Saponin-Mischung wurde 3 – 5 mal invertiert und bei 37°C 10 Minuten in einem Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wurde die Mischung ab und zu vorsichtig invertiert. Das Saponin bewirkte hierbei eine Lyse der Erythrozyten. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2700 rpm und RT konnte mit dem Überstand das freiliegende Hämoglobin und Erythrozyten-Bestandteile verworfen werden. Im Pellet befanden sich nun die Parasiten. Diese wurden 3 Mal ca. 1:20 mit Saponin-Lösung resuspendiert und wieder bei 2700 rpm und 28°C 10 Minuten mit Bremse abzentrifugiert. War der Überstand nach dem dritten Waschen klar, konnte das Pellet nun mit 350 µl 1x-PBS resuspendiert werden und in ein 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Das PBS wurde so gut wie möglich in mehreren Schritten durch Zentrifugation (2500 rpm, 7 Minuten, 28°C) und Abpipettieren verworfen, so dass die Parasiten relativ rein vorlagen.

Die Parasiten wurden dann bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

2.2.3.10 Calcium-Assay

Um einen möglichen Effekt von *PfSel2* auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung von *P. falciparum* *in vivo* zu analysieren, wurden *PfSel2C*-GFP transfizierte Parasiten mit 5 µM des Ca^{2+} -Indikators Indo-1/Acetoxy-methylester (Indo-1/AM) behandelt. Dieser Indikator ist durch die Estervariante

zellmembranpermeabel und bindet an freies Calcium [115, 116]. Intrazelluläre Esterasen spalten den Ester ab und der Indikator ist dadurch nicht mehr membranpermeabel und somit in der Zelle gefangen. An Calcium-Ionen gebundener Indikator emittiert bei einer Anregung mit 355 nm eine Wellenlänge von 405 nm, hingegen sendet er in ungebundener Form eine Wellenlänge von 480 nm aus. Dadurch kann durch die Ermittlung des Verhältnisses 405/480 eine Veränderung in der Ca^{2+} -Konzentration in den unterschiedlichen Parasiten detektiert werden.

Die Parasiten wurden mit den *Pf*Sel2TGT-GFP-Konstrukten, die in dem Transfektionsvektor pARL vorlagen, transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.6). Als GFP-Leerkontrolle diente pARL2, der GFP beinhaltete. Nicht-parasitierte Erythrozyten wurden als weitere Negativ-Kontrolle benutzt.

Es wurde der Versuch sowohl an parasitierten Erythrozyten als auch an frei-vorliegenden Parasiten durchgeführt.

Pro Kultur wurde eine 15 ml Schale mit einer Parasitämie von 6 – 8% und einem Hämatokrit von 5% angezogen. Die Parasiten-Kulturen wurden über Quadro MACS[®] magnetische Affinitätssäulen zu 90 – 98% angereichert.

Für jede Kultur wurde in einer 1:10 Verdünnung in einer Neubauer-*improved* Zählkammer 2 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl / ml nach der Formel (5) unter 2.2.3.2.2 bestimmt.

Die Zellzahl wurde für alle Kulturen auf $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml für „freie“ Parasiten bzw. auf $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml für parasitierte Erythrozyten und eine zweite Reihe „freier“ Parasiten mit Ringer-Puffer eingestellt.

Um frei-vorliegende Parasiten zu erhalten, wurde eine Saponin-Lyse (siehe Kapitel 2.2.3.9) durchgeführt, wobei die Parasiten in Ringer-Puffer anstatt in PBS aufgenommen wurden.

Die Proben wurden jeweils zweimal in Ringer-Puffer gewaschen. Die Zentrifugationsschritte wurden dafür jeweils für 2 min bei 2700 rpm in einer kleinen Tischzentrifuge durchgeführt.

Je 90 μl der Proben wurden jeweils in 6-fachen Replikaten in eine schwarze flache 96-*well* Mikroplatte aufgetragen. Dies entsprach $6,75 \times 10^5$ bzw. $6,75 \times 10^4$ Zellen/*well*. In jeweils drei *wells* pro Kultur wurden je 10 μl des Ca^{2+} -Indikators Indo-1/AM (in 50 μM Stammlösung) dazugegeben. Daraus resultierte eine Konzentration des Indikators von 5 μM pro *well*. Die restlichen drei Replikate pro Kulturen dienten als Leerwerte.

Die Kulturen wurden anschließend bei 37°C unter Begasung für 15 min bzw. 55 min im Brutschrank inkubiert. Hinterher wurden die Zellen zweimal mit 100 μl Ringer-Puffer gewaschen. Hierfür konnten die Mikroplatten in einer Heraeus Megafuge für zwei Minuten bei 1500 g zentrifugiert werden. Zum Abnehmen des Überstandes wurde ein Vaccusafe comfort genutzt. Im Nachhinein wurden die Zellen wieder in 100 μl Ringer-Puffer aufgenommen und nochmals für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dadurch konnten intrazelluläre Esterasen den Ester des Indo1/AM abspalten, wodurch anschließend das Fluoreszenzsignal bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emission von 405 nm und 480 nm mit Hilfe des Infinite M200 gemessen werden konnte. Danach wurde die Differenz zwischen behandelter und

unbehandelter Kontrolle und danach das Verhältnis 405/480 berechnet.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Reinigung von Proteinen

2.2.4.1.1 Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus *P. falciparum*

Um die Proteine aus *P. falciparum* nutzen zu können, wurden eine 6 – 8 große Schalen (45 ml Kulturen) mit rund 7% Parasitämie angezogen (siehe Kapitel 2.2.3.4) und geerntet. Damit die Parasitenmembran und Organellen zerstört wurden, musste das Parasitenpellet mit vier Zyklen Frieren (flüssiger Stickstoff) und Tauen (Wasserbad, bei RT) sowie anschließend 3 x 10 Sekunden Ultraschall behandelt werden. Membranbestandteile wurden bei 50000 rpm für 20 min abzentrifugiert. In dem Überstand befanden sich die Proteine. Dieser wurde vorsichtig abpipettiert und für weitere Versuche eingesetzt.

2.2.4.1.2 Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus *E. coli*

Bevor die Proteine aus einer heterologen Überexpression (siehe Kapitel 2.2.2.5) gereinigt werden konnten, mussten die *E. coli*-Zellen aufgeschlossen werden. Dabei wurde das resuspendierte Zellpellet mit 20 mg Lysozym/l Expression und etwas DNase versetzt. Das Lysozym spaltet dabei die Peptidoglycane der *E. coli* Zellwände.

Während einer Inkubationszeit von 60 – 90 min auf Eis wurde die Probe ständig gerührt.

Die Probe wurde danach bei 8 x 10 sec bzw. 3 x 30 sec Ultraschall behandelt und sofort bei 18000 rpm und 4°C für 30 min abzentrifugiert.

In dem Überstand befanden sich nun die Proteine (Proteinrohextrakt). Um zu analysieren inwieweit sich das gewünschte Protein aus den Zellen gelöst hat, wurde ein wenig von dem Pellet aufgehoben und mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.4.2.2) bzw. Western Blot (siehe Kapitel 2.2.4.2.3) kontrolliert.

2.2.4.1.3 Proteinreinigung

Heterolog überexprimierte Proteine müssen für weitere Analysen von anderen Proteinen getrennt und somit gereinigt werden. Dazu können verschiedene Techniken angewandt werden. In dieser Arbeit wurden vor allem die Affinitätschromatographie mittels Poly-His-Tag, aber auch die Gelfiltration genutzt. Daneben wurden auch die Phenylarsenoxid-Sepharose (PAO-Sepharose) für eine Reinigung der nativen Selenoproteine aus *P. falciparum* verwendet.

2.2.4.1.3.1 Affinitätschromatographie

2.2.4.1.3.1.1 Affinitätschromatographie mittels PolyHis-Tag

Zur Reinigung eines Proteins kann ein Poly-His-Tag an dem überexprimierten Protein dienen.

Dazu wurde das entsprechende Gen zuvor in einem geeigneten Vektor mit entsprechenden Restriktionsenzymen vor oder hinter einer Poly-His-Sequenz kloniert.

Das überexprimierte Protein besitzt dann am N- oder C-Term eine PolyHis-Einheit, die mit hoher Affinität an Ni^{2+} - oder Co^{2+} -Ionen binden und mittels Imidazol kompetitiv von der Matrix verdrängt und eluiert werden kann.

In dieser vorliegenden Arbeit wird für jedes Selenoprotein nur die jeweilig beste Methode beschrieben. Für weitere Daten wird auf die Masterarbeiten von RAPHAEL EBERLE [110] und NICOLE RONZHEIMER [111] verwiesen.

Bei allen verwendeten Materialien wurden 500 μl des jeweiligen Säulenmaterials in einer Glassäule mit Glasfritte sedimentiert und mit mindestens 5 – 10 Säulenvolumen (SV) desjenigen Puffers äquilibriert, in dem sich der aufzutragende Proteinrohextrakt befand.

Letzterer wurde auf die Matrix gegeben und bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen/6 sec durch die Säulenmatrix laufen gelassen.

Danach schlossen sich ein oder zwei Waschschriffe von je 5 SV an, bei denen ungebundenes Protein aus der Säule ausgewaschen wird und gegebenenfalls ein Pufferwechsel vorgenommen wurde. Mit je 2 SV an Puffer, mit steigender Imidazolkonzentration, wurden zuerst unspezifisch bzw. schwach gebundene Proteine und anschließend, bei höheren Konzentrationen, das Zielprotein von der Säulenmatrix eluiert.

Die einzelnen Elutionsschritte, der Durchlauf sowie der Proteinrohextrakt und das Pellet des Zellaufschlusses wurden auf einem SDS-Gel analysiert (siehe Kapitel 2.2.4.2.2).

Die entsprechenden Proben, mit guter *PfSel*-Menge und dem bestem Reinheitsgrad wurden gepoolt, aufkonzentriert (siehe Kapitel 2.2.4.1.4) und zur weiteren Analyse verwendet.

2.2.4.1.3.1.1.1 Reinigung von *PfSel1*

Die überexprimierten Varianten von *PfSel1* banden mit höchster Affinität an die Protino[®]-Ni-TED. Daneben konnte durch die Verwendung dieses Säulenmaterials auch der größte Reinheitsgrad erreicht werden.

Zur Reinigung wurden die *E. coli*-Proteinrohextrakte aus ca. 2 – 4 Liter Expression verwendet. Diese Säule wurde zuvor mit 5 – 10 SV +TG-Puffer äquilibriert. Nachdem der Proteinrohextrakt das Säulenmaterial passierte, wurde die Matrix mit 5 SV von +TG1 und anschließend mit 5 SV von +TG2 gewaschen. Steigende Imidazolkonzentration (10, 30, 50, 100, 200 und 500 mM) in dem +TG2-Puffer wurden zur Elution der gebundenen Proteine genutzt. Die Menge der einzelnen Elutionsschritte betraf dabei jeweils zwei SV.

2.2.4.1.3.1.1.2 Reinigung von *PfSel2*

Die besten Ergebnisse zur Reinigung der *PfSel2*-Mutanten konnten mittels Ni-NTA Agarose erzielt werden. Der Proteinrohextrakt lag in –TG-Puffer vor. Die Imidazolkonzentrationen in den Elutionsschritten entsprach 10 mM, 20 mM, 45 mM, 75 mM, 125 mM und 200 mM.

2.2.4.1.3.1.1.3 Reinigung von PfSel3

Die beste Reinigungseffekte konnte für PfSel3 erreicht werden, wenn das *E. coli*-Pellet in +TG mit 5 mM Imidazol vorlag und über eine Protino[®]-Ni-TED gegeben wurde. Dabei wurde mit 10, 20, 50, 100, 250 sowie 500 mM Imidazol in dem Probenpuffer eluiert.

2.2.4.1.3.1.1.4 Reinigung von PfSel4

PfSel4 hatte die größte Affinität zu einer Cobalthaltigen Matrix. Hierfür wurde das Talon[®] *metal affinity resin* verwendet. Der Proteinrohextrakt lag in +TG1 vor. Nachdem der gesamte Proteinextrakt die Säule durchlaufen hat, wurde diese mit 5 SV von +TG1 und danach mit 5 SV an +TG2 gewaschen. Die Proteine wurden mit 10, 20, 50, 100, 200 und 500 mM Imidazol im +TG2-Puffer eluiert.

2.2.4.1.3.1.2 Affinitätschromatographie mittels PAO-Sepharose

Für die Reinigung nativer Selenoproteine aus *Plasmodium falciparum* wurde die 4-Phenylarsenoxid-Sepharose (PAO-Sepharose) genutzt. Diese dient zu der Reinigung von Proteinen, die benachbarte Dithiole besitzen [117, 118]. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Selenothiols stärker als die des Dithiols ist.

Dazu wurde die PAO-Sepharose mittels des 4-Aminoarsenoxid und der ECH 4B-Sepharose nach dem Protokoll von JOHANSSON *et al.* [117] hergestellt. Plasmodialer Zellextrakt wurde wie unter Kapitel 2.2.4.1.1 beschrieben hergestellt und die Affinitätsreinigung nach Protokoll von JOHANSSON *et al.* durchgeführt.

Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (siehe Kapitel 2.2.4.2.1) und die Proteine unter sterilen Bedingungen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blue-Färbung (siehe Kapitel 2.2.4.2.2) analysiert. Entsprechende Proteinbanden wurden unter sterilen Bedingungen aus dem Gel geschnitten und die Proteine durch MALDI-TOF-MS identifiziert (siehe Kapitel 2.2.4.2.7).

2.2.4.1.3.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Eine weitere Möglichkeit Proteine voneinander zu trennen ist die Gelfiltrations-Chromatographie. Dabei werden Proteine ihrer Größe nach getrennt. Die stationäre Phase hierbei ist ein poröses Polymer. Kleine Moleküle verweilen länger zwischen den Poren der Säulenmatrix. Daher eluieren große Proteine vor kleineren von der Säule.

In dieser Arbeit wurde die 16/60 Superdex 200 an einem ÄKTA/ Unicorn- FPLC System genutzt. Das Säulenmaterial wurde mit Hilfe eines Gelfiltrationsstandards aus Ferritin, Aldolase, Albumin, Ovalalbumin and Chymotrypsinogen kalibriert.

Das Säulenmaterial wurde vor dem Auftragen der Probe mit dem entsprechenden Puffer (entsprach dem Puffer, in dem die Probe vorlag) äquilibriert.

Die Probe wurde aufgetragen und pro Minute 1 ml Durchlauf aufgefangen. Die

Proteinkonzentration wurde spektralphotometrisch bei 280 nm gemessen und die Fraktionen/ Peaks mittels der Software Unicorn 4.11 analysiert. Die gewünschten Fraktionen wurden weiterhin entsprechend des zu untersuchenden Peaks gepoolt, aufkonzentriert (siehe Kapitel 2.2.4.1.4) und auf einer SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.4.2.2) bzw. anschließenden Western Blot (siehe Kapitel 2.2.4.2.3) analysiert.

2.2.4.1.4 Aufkonzentrierung

Eine Probe mit geringer Proteinkonzentration und großem Volumen kann unter Verwendung von Zentrifugalkonzentratoren (z. B. Vivaspin) auf ein kleineres Volumen mit gleichzeitig größerer Proteinkonzentration gebracht werden. Zu beachten ist hierbei der *molecular weight cut off*.

Für PfSel1 und PfSel4 Proben wurden Vivaspins mit einem *molecular weight cut off* von 10 kDa bzw. für PfSel2 zusätzlich auch von 20 kDa genutzt. Die Proben wurden in die Zentrifugalkonzentratoren überführt und bei 3700 rpm (Vivaspin 6 bzw. 20) bzw. 10000 rpm (Vivaspin 500) so lang bei 4 °C zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht wurde.

2.2.4.1.5 Dialyse

Um einen Pufferwechsel der vorliegenden Proben durchzuführen, wird die Dialyse angewandt. Dabei wird nach dem Prinzip des Konzentrationsausgleichs zweier Puffer durch eine semipermeable Dialysemembran verfahren.

Die zu dialysierenden Proben wurden zuvor meist auf ca. 100 – 1000 µl aufkonzentriert (siehe Kapitel 2.2.4.1.4) und in einen Dialyseknopf überführt. Eine zuvor in *A. dest* eingeweichte Dialysemembran wurde über den Dialyseknopf gespannt, fixiert und kopfüber in einem Behälter mit dem gewünschten Puffer gehangen. Das Volumen des Puffers im Behälter betrug dabei das 100-fache des Volumens der zu dialysierenden Probe. Die Dialyse wurde optimal 3x 30 Minuten bei RT durchgeführt. Alternativ konnte auch ÜN bei 4 °C ohne dreimaligen Pufferwechsel dialysiert werden. Dafür betrug das Puffervolumen aber mindestens das 300-fache des Probevolumens.

Nach der Dialyse konnte die Probe für weitere Versuche eingesetzt werden.

2.2.4.2 Proteinanalysen

2.2.4.2.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Die Proteinbestimmung nach BRADFORD beruht auf einer Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 mit aromatischen und basischen Aminosäuren. Liegt der Farbstoff ungebunden vor, absorbiert er Licht bei einem Maximum von 470 nm. Hingegen verschiebt sich das Absorptionsspektrum bei der komplexierten Form zu einer Wellenlänge von 595 nm.

Um für eine Probe eine Proteinbestimmung durchzuführen, wurde eine geeignete Verdünnung hergestellt. Daneben wurde ebenfalls ein Leerwert mit *A. bidest* vorbereitet. 500 µl der Proben wurden mit 125 µl BioRad Protein-Assay-Lösung versetzt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Von

jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Es wurde der Mittelwert der Doppelbestimmungen ermittelt, diese Werte in eine zuvor mit Rinderserumalbumin erstellte Eichgerade gelegt und die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

2.2.4.2.2 SDS-PAGE

Durch die *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) werden Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch getrennt. Da die Faltung, der quartäre Proteinzustand sowie die Ladung die Laufeigenschaften beeinflussen, wird unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen gearbeitet.

Die SDS-Gele können in unterschiedlicher Konzentration an Acrylamid gegossen werden und somit verschiedene Vernetzungsstärken aufweisen. Im Allgemeinen gilt: Je kleiner ein Protein ist, desto höher wird die Konzentration des Acrylamids im SDS-Gel gewählt.

In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich 12%ige bzw. 15%ige Gele genutzt. Ein Ansatz für vier Gele setzte sich wie folgend zusammen:

Zuerst wurde in der Gelgießvorrichtung das Trenngel gegossen, mit Ethanol überschichtet und ca. 45 min bei RT auspolymerisiert. Das überschüssige Ethanol wurde entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In ca. 20 min polymerisierte diese Schicht aus.

Die SDS-Gele konnten bis zu 14 Tage bei 4°C gelagert werden.

Die Proben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit 1x-Probenpuffer + DTT versetzt, gemischt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Übertraf die aufzutragende Probe ein Volumen von mehr als 20 µl, wurde diese 1:4 mit 4x-Probenpuffer und DTT versetzt. Jede Probe wurde je in eine Geltasche aufgetragen. Ein Proteinmarker wurde zu einer späteren Abschätzung der Proteingröße ebenfalls in eine Geltasche geladen.

Die Proben wurden bei einer Spannung von 190 V ca. 45 min getrennt. Erreichte die blaue Lauffront den unteren Gelbereich, wurde die Spannung entfernt, das Gel aus der Vorrichtung genommen und mit Coomassie-Färbelösung für 20 min gefärbt. An den Färbeschritt schloss sich ein Entfärbeschritt von 3 x 20 min an. Die Proteingröße konnte nun unter Verwendung des Proteinmarkers direkt auf dem Gel abgeschätzt werden. Das Gel wurde an einem Geldokumentation-Gerät fotografiert.

2.2.4.2.3 Western Blot

Der Nachweis schwach exprimierter Proteine oder spezifischer Zielproteine in einem Zelllysate können mittels Western Blot, auch Immunblot genannt, erfolgen. Der Western Blot kann bis zu 100x sensitiver als eine Coomassie-Färbung sein.

In dieser Arbeit wurde die *semidry*-Methode auf einer Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran angewandt. Dafür wurden direkt vor dem Blot fünf Filterpapiere in Kathodenpuffer, drei

Filterpapiere in Anodenpuffer I und zwei Filterpapiere in Anodenpuffer II ca. 15 Minuten getränkt. Die Aktivierung der PVDF-Membran erfolgte durch eine Inkubation mit 100% Methanol für ca. 1 Minute. Die Membran wurde danach kurz unter *A. dest* gewaschen und ebenfalls in Anodenpuffer II inkubiert. Das Polyacrylamid-Gel wurde in Kathodenpuffer für einige Minuten getränkt und die Graphitplatten des Blot-Gerätes mit *A. dest* gesättigt.

Der Aufbau der Blotvorrichtung erfolgte nach folgendem Schema:

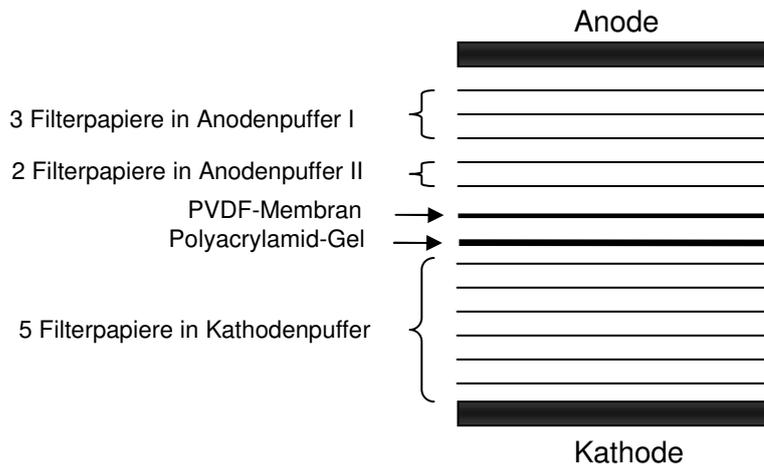


Abb. 2.1 Aufbau eines *semidry*-Western Blots.

Der Blot-Vorgang eines Gels wurde unter 180 V und 41 mA in 55 Minuten durchgeführt.

Sofort nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S angefärbt. Dadurch war eine Überprüfung, ob die Proteine von dem Polyacrylamid-Gel auf die Membran übertragen wurden, möglich. Die intensive Rotfärbung des Ponceau S wurde mittels 1%iger Essigsäure aufgehoben und die Membran entweder 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 5%iger Magermilch in TBST inkubiert. Danach schloss sich ein dreimaliger Waschgang von 10 Minuten mit TBST an. Hiernach konnte die Membran in Puffer mit 1:500 bis 1:2000 verdünnten primären Antikörper gegen das gewünschte Protein eine Stunde bei RT inkubiert werden. Der Puffer bestand hierbei bei einem His-Tag-Antikörper aus 0,3 g BSA in 20 ml TBST bzw. bei anderen Antikörpern aus 0,3 g BSA und 0,5 g Magermilchpulver in 20 ml TBST. Nach der einen Stunde Inkubation wurde die Membran wieder dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend wurde eine 5%ige Magermilchlösung in TBST mit dem sekundären Antikörper (1:10000 oder 1:20000) versetzt und auf der Membran 1 Stunde bei RT inkubiert und hinterher wie schon beschrieben gewaschen. Der sekundäre Antikörper richtet sich hierbei nach der Herkunft des primären Antikörpers, z. B. nach der Verwendung eines His-tag-Antikörper aus der Maus wird der sekundäre Antikörper anti-Maus IgG HRP gewählt. An dem sekundären Antikörper ist weiterhin eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die im weiteren Verlauf zum Visualisieren des Proteins genutzt werden konnte. Die Membran wurde mit einem Gemisch aus 1 ml ECL Kit und 10 µl Cumarinsäure für 1 Minute inkubiert. Das ECL Kit enthält das chemiluminente Luminol, das durch die Peroxidase oxidiert. Das oxidierte Produkt kann unter Ausschluss von Licht auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Sollte die Membran noch zu weiteren Proteinnachweisen dienen, wurde diese 2 – 3 mal in TBST gewaschen und danach getrocknet. Die Membran ist so noch nach mehreren Monaten nutzbar.

2.2.4.2.4 Funktionelle Assays

Die gereinigten rekombinanten plasmodialen Selenoproteine wurden in ersten funktionellen Assays auf mögliche Aktivitäten analysiert. Dabei diente als Kontrolle, zu den relativ unsauberen Proteinen, ein Proteinextrakt aus einer Expression von *E. coli* mit dem Leervektor pQE30. Die Proteine wurden auf reduzierende Wirkung in dem Insulin-Assay nach HOLMGREN *et al.* [119] untersucht. *PfSel1* und *PfSel4* konnten weiterhin auf eine antioxidative Wirkung im *protection*-Assay nach KIM *et al.* [120] analysiert werden.

2.2.4.2.4.1 Insulin-Assay

Bei dem Insulin-Assay wird die reduzierende Wirkung der Zielproteine auf die Disulfid-Bindungen des Insulin ermittelt. Durch eine Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den beiden Peptidketten des Insulins fällt das Insulin aus, was unter photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 600 nm beobachtet werden kann.

Der Gesamtansatz dieses Assays betrug 500 μ l. Dabei wurden jeweils 10 μ M bzw. 20 μ M der rekombinanten Proteine in TE-Puffer verdünnt. 5 μ l Insulin (17 mM) sowie 5 μ l DTT (100 mM) wurden zu den 490 μ l des Zielproteins in TE-Puffer pipettiert. Die Probe wurde sofort zu mehreren Zeitpunkten innerhalb von 30 min bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch gemessen.

Als Kontrollen dienten a) ein Proteinextrakt aus einer Expression von *E. coli* mit dem Leervektor pQE30, b) 5 μ M Endkonzentration an rekombinanten *PfTrx1* als Positivkontrolle sowie c) als Pufferkontrolle ein Ansatz ohne rekombinantes Zielprotein.

2.2.4.2.4.2 Protection-Assay

Um eine mögliche antioxidative Wirkung von *PfSel1* und *PfSel4* zu determinieren, wurden diese Proteine in dem *protection*-Assay analysiert. In diesem Assay wird die Glutamin-Synthetase (GS) durch FeCl_3 und DTT unter oxidativen Stress gesetzt, wodurch deren Aktivität verloren geht. Durch Schutzproteine mit antioxidativen Wirkmechanismen, wie z. B. *PfTPx1*, wird der oxidative Stress in der Umgebung aufgehoben und die Aktivität der GS steigt wieder an.

Zu einem Probenansatz einer 30 μ l Lösung, welche aus 0,5 μ g GS und verschiedenen Konzentrationen an dem Zielprotein (20 – 70 μ M) bestand, wurden 20 μ l des Stress-Mixes gegeben. Nach einer Inkubation bei 30°C für 15 min wurden 250 μ l des Glutaryltransferase-Mixes dazugeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 250 μ l des Stopp-Mixes inhibiert. Die Aktivität der GS wurde sofort durch die Produktion von Glutamyhydroxamsäure- Fe^{3+} -Komplex, welches Licht bei 540 nm absorbiert, gemessen.

Als Positivkontrollen dienten hier Ansätze mit a) 10 – 90 μ M *PfTPx1*, b) 1 mM EDTA bzw. c) ohne Stress-Mix. In der Negativkontrolle wurde kein Schutz für die GS eingesetzt.

2.2.4.2.5 PolyHis-Tag-pull-down-Assay

Der *pull-down*-Assay wird verwendet, um den/die Interaktionspartner von einem bekannten Fängerprotein zu identifizieren oder die Wechselwirkungen dieser Interaktion zu analysieren. Hierfür wird das Fängerprotein an eine Matrix gebunden und mit dem zu untersuchenden Interaktionspartner bzw. Proteinrohextrakt inkubiert. Ungebundene Proteine werden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Danach wird das gefangene Protein eluiert, auf SDS-PAGE und Western Blot analysiert und gegebenenfalls mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Der PolyHis-Tag-*pull-down*-Assay nutzt für die Bindung des Fängerproteins an die Matrix den PolyHis-Tag. In dieser Variante wird der gefangene Interaktionspartner zusammen mit dem Fängerprotein durch Imidazol von der Matrix eluiert.

Bei dem PolyHis-Tag-*pull-down*-Assay in dieser Arbeit wurde die jeweilige gereinigte rekombinante Mutante mittels His-Tag an ca. 20 µl Säulenmaterial gebunden, wobei für Mutanten von *PfSel1* Protino[®]-Ni-TED bzw. für *PfSel4p.133u>c* Talon[®]-Material genutzt wurden. Die *PfSel1*-Mutanten lagen nach dem Reinigungsschritt in einem Puffer mit einer hohen Konzentration an Imidazol vor, daher musste das Protein gegen reinen +TG-Puffer dialysiert werden (siehe Kapitel 2.2.4.1.5).

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge für eine Minute bei 13000 rpm durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, unter ständigem Mischen der Proben. Hierfür wurde ein Hybridisierungsofen genutzt.

Das Säulenmaterial wurde vor dem Auftrag des Proteins zweimal mit dem 10-fachen SV an +TG2 äquilibriert. Die jeweilige Probe wurde aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert.

Danach wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Säulenmaterial zweimal mit 200 µl an +TG2-Puffer gewaschen. Ein Parasitenlysate aus *P. falciparum* wurde aufgetragen und ebenfalls für eine Stunde bei RT inkubiert.

Im Nachhinein wurde in einem *pull-down*-Assay mit *PfSel4c* das Säulenmaterial dreimal mit 5 SV an +TG2 gewaschen und weitere x-mal mit 5 SV an +TG2-Puffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Wobei x die Anzahl der Waschschriffe entsprach, die benötigt waren damit die ausgewaschene Proteinmenge bei einer photometrischen Messung bei 280 nm unter 0,03 sank. Für einen *pull-down*-Assay mit *PfSel1c* wurde nach der Inkubation mit dem Plasmodiumlysate in den gesamten 6 – 9 Waschschriffen nur +TG2-Puffer verwendet.

Eluiert wurde in einem ersten Schritt mit 22 µl und einem zweiten mit 12 µl an +TG2 mit 500 mM Imidazol (*PfSel1c*) bzw. +TG2 mit 200 mM Imidazol (*PfSel4c*). Die Elutionsschritte wurden bei RT für 10 Minuten inkubiert und im Nachhinein gepoolt.

Das Plasmodiumlysate und das verwendete rekombinante Protein sowie einige Waschlösungen und der Elutionspool wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mittels anschließender Coomassie-Färbung oder Western-Blot-Methode analysiert (siehe Kapitel 2.2.4.2.2 und 2.2.4.2.3). Eventuell schloss sich dem noch eine MALDI-TOF-MS (siehe Kapitel 2.2.4.2.7) an.

2.2.4.2.6 Quervernetzung mittels Dimethyladipimidatdihydrochlorid

Um Aufschluss über den Oligomerisierungszustand der Selenoproteine zu gewinnen, wurden Quervernetzungsexperimente mittels des Bisimidats Dimethyladipimidatdihydrochlorid (DMA) durchgeführt. Bisimidate sind wasserlösliche, membranpermeable, homobifunktionale Imidoester. Sie reagieren mit primären Aminen, indem sie Amidinverbindungen bilden. Die primären Aminogruppen liegen im Allgemeinen, aufgrund der positiven Nettoladung der Proteine bei physiologischem pH-Wert, an der Oberfläche und sind somit zugänglich für die Bisimidate. Die unterschiedlichen Bisimidate unterscheiden sich in dem Abstand, mit dem sie die Proteine vernetzen und darin ob diese Quervernetzung im Nachhinein wieder spaltbar ist. DMA ist ein nicht-spaltbarer Vernetzer, der die primären Amine mit 8,6 Å kovalent verbindet.

Die zu untersuchenden Proteine wurden wie beschrieben exprimiert, die Zellen geerntet (siehe Kapitel 2.2.2.5) und ein Proteinrohextrakt erstellt (siehe Kapitel 2.2.4.1.2). Für die Vernetzung im Proteinrohextrakt verwendet. Dazu wurden 500 µl Zellysate mit 0,1, 1, 10 und 100 mM DMA versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit TRIS-Puffer pH 8,0 und einer Endkonzentration von 50 mM gestoppt.

Die Proben wurden sofort mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.4.2.2) und Western Blot (siehe Kapitel 2.2.4.2.3) analysiert.

2.2.4.2.7 Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS

Um Proteine nach Coomassie-Färbung zu identifizieren, wurde die zu untersuchende Protein-Bande aus dem Coomassie-gefärbten Gel unter der Steril-Bank ausgeschnitten, eventuell mit Trypsin behandelt, die Peptide aus dem Gel eluiert und zur Analyse mittels *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) gegeben (SAŠA KONCAREVIC, Proteome Sciences R&D GmbH & Co. KG, Altenhöferallee 3, D-60438 Frankfurt am Main bzw. GÜNTER LOCHNIT, Institut für Biochemie, Friedrichstrasse 24, D-35392 Giessen).

2.2.4.3 Herstellung von Antikörpern

Damit die plasmodialen Selenoproteine spezifisch nachgewiesen werden können, sollten Antikörper hergestellt werden. Für *PfSel1*, *PfSel2* und *PfSel4* sollte ein Antikörper gegen das gesamte Protein produziert werden. Für *PfSel3* wurde ein Peptid-Antikörper hergestellt.

2.2.4.3.1 Antikörper gegen das gesamte Protein

Für weitere Versuche, wie z. B. spezifische Western Blots oder Immunfluoreszenz, werden spezifische Antikörper direkt gegen das Zielprotein benötigt.

Daher wurden die Cysteinmutanten von *PfSel1*, *PfSel2* und *PfSel4* überexprimiert, gereinigt und stark eingeeengt (auf unter 100 µl). Für die kleinen Proteine, *PfSel1* und *PfSel4*, wurden ca. 1 mg Gesamtprotein benötigt. Für das etwas größere *PfSel2* wurden rund 750 µg Gesamtprotein gebraucht.

Die Proben wurden mit 4x Probenpuffer auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen und langsam bei max. 80 V ins Gel einlaufen lassen. Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurde die jeweilige *PfSel*-Bande ausgeschnitten und jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei der Firma BioScience (Göttingen, Deutschland) zur Antikörperproduktion im Kaninchen in Auftrag gegeben.

Die produzierten Seren wurden im Western Blot mit plasmodialen Proteinrohextrakt sowie rekombinanten *PfSel*'s getestet.

2.2.4.3.2 Peptid-Antikörper für *PfSel3*

Für Immunfluoreszenz und Nachweis des *PfSel3*'s im *Plasmodium*-Extrakt, wurden zwei Peptid-Antikörper (Kaninchen) bei Eurogentec (Belgien) bestellt. Die Peptide wurden zuvor mit folgender Aminosäure (AS)-Sequenz ebenfalls durch die Firma synthetisiert:

Peptid 1: AS 21-35 + C: TVDSGSKQLHIKLPDC

Peptid 2: C + AS 336-350: CTLPSFKSLPFFKFKRT

Beide Sequenzen wurden auf Spezifität durch BLAST gegen das plasmodiale und humane Genom untersucht.

Der jeweilige *final bleed*-Schritt und das dazugehörige Präimmunserum wurden im Western Blot (siehe Kapitel 2.2.4.2.3) an plasmodialen Proteinrohextrakt, Erythrozyten und Kulturmedium sowie rekombinanten *PfSel3c* getestet.

Da es für eine Immunfluoreszenz keine Signale gegen Erythrozyten geben durfte, wurden 5 ml des *final bleed*-Serums durch Eurogentec mittels Affinitätsreinigung gereinigt. Die Spezifität wurde wieder in einem Western Blot wie oben beschrieben getestet.

2.2.5 Bioinformatische Analysen

Um Rückschlüsse auf homologe Strukturen der *PfSel*-Gene und -Proteine in anderen Organismen bzw. auf deren Funktion, Eigenschaften und Strukturen zu ziehen, wurden verschiedene bioinformatische Programme genutzt.

2.2.5.1 BLAST-Suche

Das Basic Local Alignment Tool (BLAST) findet lokale Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Sequenzen.

Die Gen- sowie Proteinsequenzen der plasmodialen Selenoproteine wurden regelmäßig in der Datenbank des National Center for Bio**te**chnology Information (NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf homologe Sequenzen geblastet.

Die Funktion der BLAST-Suche wurde desweiteren für die Kontrolle der Spezifität der *primer* (siehe Kapitel 2.1.14) genutzt.

2.2.5.2 Alignment

Die plasmodialen Selenoprotein-Sequenzen wurden gegen humane Selenoproteine unter Nutzung des multiplen Alignment-Programms MAFFT Version 6 (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>) sowie ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) aligned [99, 121]. Zu der Berechnung der prozentualen Ähnlichkeiten wurde die Summe aller identischen, konservierten und semi-konservierten AS auf die Gesamt-AS der plasmodialen Sel-Sequenz bezogen. Die multiplen Alignments wurden zur weiteren Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes (siehe Kapitel 2.2.5.3) verwendet.

2.2.5.3 Phylogenetische Stammbäume

Rückschlüsse der evolutionsbedingten Verwandtschaft der Selenoproteine mit anderen Selenocystein-haltigen Proteinen konnten mittels phylogenetischer Stammbäume aufgezeigt werden. Zu unterscheiden sind generell Kladogramme und Phylogramme. Erstere stellen das relative Verwandtschaftsverhältnis dar und zeigen die Aufspaltungen (Kladogenese) in der relativen Abfolge besonders deutlich. Dabei fehlt aber die absolute Abfolge. Phylogramme zeigen zusätzlich zur Kladogenese noch das Ausmaß der Divergenz, wobei aber die Veranschaulichung der Kladogenese unübersichtlich wird. In dieser Arbeit sollte vor allem die Kladogenese hervorgehoben werden und es wurden somit Kladogramme erstellt.

Dazu wurden nach dem Erstellen eines multiplen Alignments die Programme ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) und insbesondere MAFFT Version 6 (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>) nach der *Neighbor-Joining*-Methode mit dem JONES-TAYLOR-THORNTON (JTT)-Ergänzungsmodell genutzt [99, 121, 122]. Die Vertrauenswürdigkeit der Bäume wurde durch jeweils 1000 *resamplings* erhöht.

Ein Kladogramm aller PfSel-Sequenzen plus einigen SelS-, SelT- und SelK-Sequenzen wurden mittels MAFFT *rough clustering of unaligned sequences (accurate, average linkage method)* durchgeführt.

Alle Bäume wurden in TreeView dargestellt [123].

2.2.5.4 Meta-Analyse

Die Software GeneSilico Metaserver (<https://genesilico.pl/meta2/>) durchsucht andere Datenbanken auf Homologien in der primären, sekundären und tertiären Struktur einer gewünschten AS-Sequenz [124]. Diese Analyse wurde für alle plasmodialen Selenoprotein-AS-Sequenzen sowie für die Komponenten der Biosynthesemaschinerie der plasmodialen Selenoproteine durchgeführt.

2.2.5.5 Identifizierung von Motiven und Signalsequenzen

Die AS-Sequenzen eines Proteins können Aufschluss über Lokalisation und Funktion des Proteins geben.

Da das Phylum der Apicomplexa ein einzigartiges Organell, den Apicoplasten, besitzt, war es

notwendig für eine möglichst korrekte Vorhersage der Lokalisation der Selenoproteine, Programme zu nutzen, die eine Erkennung dieses Organells haben. So wurde für die Identifizierung der Lokalisation der Selenoproteine neben dem Programm PSORTII (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) auch das Tool *Prediction of Apicoplast Targeted Sequences* (PATS) (<http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/pats/pats-index.php>) und SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) genutzt [125-127]. Für eine genauere Identifizierung von coiled-coil-Strukturen wurden die Programme COILS [128] und Paircoil2 [129] verwendet.

Durch die Datenbanken MyHits (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan), *Eukaryotic Linear Motif* (ELM) (<http://elm.eu.org/>) und PSORTII konnten weiterhin andere funktionelle Motive und Domänen aufgefunden werden [130, 131].

2.2.5.6 Hydrophobizitäts-Plot

Hydrophobe Regionen in der Aminosäuresequenz von *PfSel2* wurden mittels ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) mit der Definition nach KYTE und DOOLITTLE gekennzeichnet [132].

2.2.5.7 Mutanten-Nomenklatur

Die Bezeichnung der Mutationen innerhalb der Selenoprotein-Sequenzen wurde nach dem Schema der Nomenklatur von DEN DUNNEN *et al.* beschrieben [133, 134].

3 Ergebnisse

Um die vier plasmodialen Selenoproteine genauer zu charakterisieren und deren Funktion im Parasiten zu illuminieren, wurden verschiedenste Techniken herangezogen.

Bioinformatische Analysen führten zu Hinweisen auf Ähnlichkeiten, homologe Sequenzen und Motive vergleichbar zu anderen Selenoproteinen oder Selenoprotein-ähnlichen Proteinen.

Ein Ziel war es die plasmodialen Selenoproteine in *E. coli* zu überexprimieren. Die rekombinanten Proteine konnten für Redoxassays, *pull-down*-Assays sowie Oligomerisierungsstudien und Antikörperherstellung genutzt werden.

Weiterhin sollte die Expression der Selenoproteine unter verschiedensten Stressbedingungen im Zusammenhang mit redoxaktiven Proteinen analysiert werden. Dazu wurden die Parasiten oxidativem und nitrosativem Stress sowie verschiedenster Selenkonzentrationen ausgesetzt und die Menge an mRNA der zu untersuchenden Zielgene mittels qRT-PCR bestimmt.

Die Lokalisation der Selenoproteine in *Plasmodium falciparum* war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Dies konnte durch GFP-Konstrukte und Immunfluoreszenz realisiert werden.

3.1 Alignments

Durch Nutzung von BLAST konnten bis dato keine homologen Sequenzen zu den plasmodialen Selenoproteinen entdeckt werden. Jedoch zeigten einige manuelle Alignments zu humanen Selenoproteinen starke Ähnlichkeiten untereinander auf.

So konnten Alignments der Aminosäuresequenz von *PfSel1* eine 50,9%ige Ähnlichkeit (identisch: „*“, konserviert: „:“ oder semi-konserviert: „.“) zu hSelK aufweisen (siehe Abb. 3.1 und Tab. 3.1). Dabei sind 21% der Aminosäuren von *PfSel1* identisch mit denen von hSelK. Auffällig ist die Position von Sec an dem C-Terminus. Hier ist Gly der unmittelbar Nachbar von Sec. In *PfSel1* wurde zu dem eine Insertion von 30 Aminosäuren an der Position 18 – 47 gegenüber hSelK erkennbar. Wurde diese Sequenz aus *PfSel1* eliminiert und die verbliebene *PfSel1*-Sequenz in BLAST eingegeben, wurde mit einem e-Wert von 7,6, 50% positiven und 27% identischen Aminosäuren das humane SelK gefunden. Auch Alignments mit SelK-Sequenzen einiger Kinetoplastida, wie *Leishmania* und *Trypanosoma*, sowie mit dem Apicomplexa *Toxoplasma gondii* (siehe Abb. 3.2) deckten gute Übereinstimmungen mit *PfSel1* auf (siehe Tab. 3.1). Bei allen Sequenzen ist das Sec in einem CxxxxUG-Motiv organisiert.

Für *PfSel2* konnte durch manuelle Alignments eine gute Homologie zu hSelT gefunden werden (siehe Abb. 3.3). Hier zeigte sich, dass 18,5% der Aminosäuren von *PfSel2* identisch mit denen von hSelT liegen. Hinzukommen 23,6% konservierter AS, d. h. sie kommen aus der gleichen Gruppe wie die des *templates*, und 13,1% semi-konservierter AS, die ähnliche Formen besitzen. Insgesamt ergibt das 52,8% Ähnlichkeit des plasmodialen *PfSel2* zu hSelT (siehe Tab. 3.2). Aus dem Alignment ist zu erkennen, dass sich auch das Redoxmotiv CxxU stark ähnelt. Wobei ein

Tab. 3.1 Ähnlichkeit von PfSel1 zu verschiedenen SelK-Sequenzen.

<u>Organismus</u>	<u>Gesamt-Ähnlichkeit (%)</u>
<i>T. gondii</i>	60,3
<i>D. discoideum</i>	54,3
<i>D. melanogaster</i>	52,6
<i>H. sapiens</i>	50,9
<i>G. gallus</i>	50,9
<i>T. vivax</i>	48,3
<i>C. reinhardtii</i>	47,4
<i>L. major</i>	44,0

Tab. 3.2 Ähnlichkeit von PfSel2 zu verschiedenen SelT-Sequenzen.

<u>Organismus</u>	<u>Gesamt-Ähnlichkeit (%)</u>
<i>T. thermophila</i>	60,3
<i>L. major</i>	59,8
<i>T. vivax</i>	59,0
<i>T. gondii</i>	58,1
<i>N. caninum</i>	56,8
<i>C. muris</i>	53,2
<i>H. sapiens</i>	52,8
<i>C. elegans</i>	52,4
<i>D. melanogaster</i>	51,1
<i>A. thaliana</i>	50,2
<i>C. reinhardtii</i>	49,8
<i>Z. mays</i>	49,3
<i>M. pusilla</i>	45,4

Tab. 3.3 Ähnlichkeit von PfSel4 zu verschiedenen SelS-Sequenzen.

<u>Organismus</u>	<u>Gesamt-Ähnlichkeit (%)</u>
<i>G. gallus</i>	69,4
<i>D. rerio</i>	67,9
<i>T. gondii</i>	66,4
<i>P. humanus</i>	65,7
<i>H. sapiens</i>	65,7
<i>N. caninum</i>	64,9
<i>C. intestinalis</i>	64,2

Hingegen deckten Alignments von PfSel4 mit humanen Selenoproteinen eine 65,7%ige Ähnlichkeit dieses plasmodialen Proteins zu hSelS auf (siehe Abb. 3.4 und Tab. 3.3). Darauf folgende Alignments mit kürzlich entdeckten Kinetoplastida SelS [135] zeigten ebenfalls sehr gute Übereinstimmungen. Bei allen Sequenzen liegt Sec am C-Terminus. Im Allgemeinen lagen alle Übereinstimmung der untersuchten Sequenzen über 64% zu PfSel4 (siehe Tab. 3.3).

<i>PfSel2</i>	MKAYYVVIILKVVLLFFSYDFIFLKNEDNIIKGGSSFLKSSY <u>ELLFVQKDVLLPHIKK</u>
<i>hSelT</i>	M-----RLLLLLVAASAMVRSEASANLGGVPSKRLKMQY-----AT
	* :::* **::: . :. . : * * . ** .*
<i>PfSel2</i>	NNQISIFL <u>CRSU</u> QSQYIINKIKNYFDILNKGRETEIYFENNNYIVDNDQKYILFLMSIQP
<i>hSelT</i>	GPLLKFQI <u>CVSU</u> GYRRV---FEEYMRVISQ-RYPDRIEGENY-----LPQ
	. ::: * ** : : :::* : : : * .:* :*.:**
<i>PfSel2</i>	PLFFTLICYFILFIFILIALNIYLPKHCEFFIPSFLLNNTKFIETF EKMRKKKIIVSSIM
<i>hSelT</i>	PIYRHIAFSLSVFKLVLIIGLIIVGKDPFAFF-----GMQAPSIWQWQENKVYACMMV
	*:: : : : * : ** . * . ** . : . : : : * : . :
<i>PfSel2</i>	FLAYNIIYSILCNTNEIHVYQNKNIYKDYFNEYF-----FIQTLRTNLK-NIH-----
<i>hSelT</i>	FFLSNMIENQCMSTGAFEITLNDVPVWSKLESGHLPMSQQLVQILDNEMKLVHMDSIPH
	*: *:* . .*. : : * . : : . . : : ::* * . : * * : *
<i>PfSel2</i>	--K
<i>hSelT</i>	HRS
	.

Abb. 3.3 Alignment von *PfSel2* mit *hSelT*. Sec wurde rot hervorgehoben, das CxSU-Motiv ist fett und unterstrichen. In kursiver Schrift sind AS-Insertionen in *PfSel2* dargestellt. Humanes SelT (*hSelT*) Acc. No.: P62341.2.

<i>hSelS</i>	MERQEESLSARPALETEGLRFLHTTVG-SLLATYGWYIVF <u>SCILLYVVFQKLSARLR</u> LR
<i>PfSel4</i>	MDTNEINMKNVKDMSF TTKNI <u>IYIFIGISLL</u> ----- <u>IFIYKILKK</u> -----
	*: *: . : : . : : : : * ** * : * : : *
<i>hSelS</i>	QRQLDRAAAAVEPDVVVKRQEALA----AARLKMQEELNAQVEKHKEKLEKLEEEKRRQK
<i>PfSel4</i>	-----NKKDAEVKRNNEISIKMKLSREKQLQELDKEMMINKEKMK-----
	: * . ***: : : : * * : ** : : : : * * : *
<i>hSelS</i>	IEMWDSMQEGKSYKGNAKKPQEEDSPGPSTSSVLKRKSDRKPLRGGGYNPLSGEGGACS
<i>PfSel4</i>	-----QNIKKNEEKKKDADQAKPKLGS--KDNS-----SFNHLNDYSN---Y
	: . * * : * : : * . . * . * * : * : * * . .
<i>hSelS</i>	WRPG--RRGPSSGG <u>UG</u>
<i>PfSel4</i>	YRPSLKNRYNNRKS <u>UR</u>
	: ** . .* . .*

Abb. 3.4 Alignment von *PfSel4* mit *hSelS*. Sec ist rot hervorgehoben. Unterstrichen sind die coiled-coil-Strukturen, die Transmembran-Domänen sind in blauer Schrift inklusive den fett-gedruckten Di-Leucin-Motiven. Humanes SelS (*hSelS*) Acc. No.: Q9BQE4.3.

3.2 Phylogenetische Bäume

Zehn verschiedene SelK-Sequenzen von unterschiedlichen Organismen, u. a. einiger Säugetiere, *Drosophila melanogaster*, Trypanosomen, *Leishmania*, *Dictyostelium discoideum*, wurden mit den homologen Sel1-Sequenzen der Plasmodien-Arten in einem multiplen Alignment analysiert und die Verwandtschaft in einem Stammbaum dargestellt (siehe Abb. 3.5). Hierbei zeigt sich ein Cluster der plasmodialen Sequenzen mit dem von *Toxoplasma*. Diese Apicomplexa-Familie ist wiederum verwandt mit den Kinetoplastida-Sequenzen. Zusammen bilden sie eine SelK-Gruppe der Protisten. Aus einem Kladogramm aller *PfSel*-Sequenzen mit anderen ähnlichen mutmaßlichen Homologen zeigt sich eine Gruppierung der SelKs mit *PfSel1* (siehe Abb. 3.5).

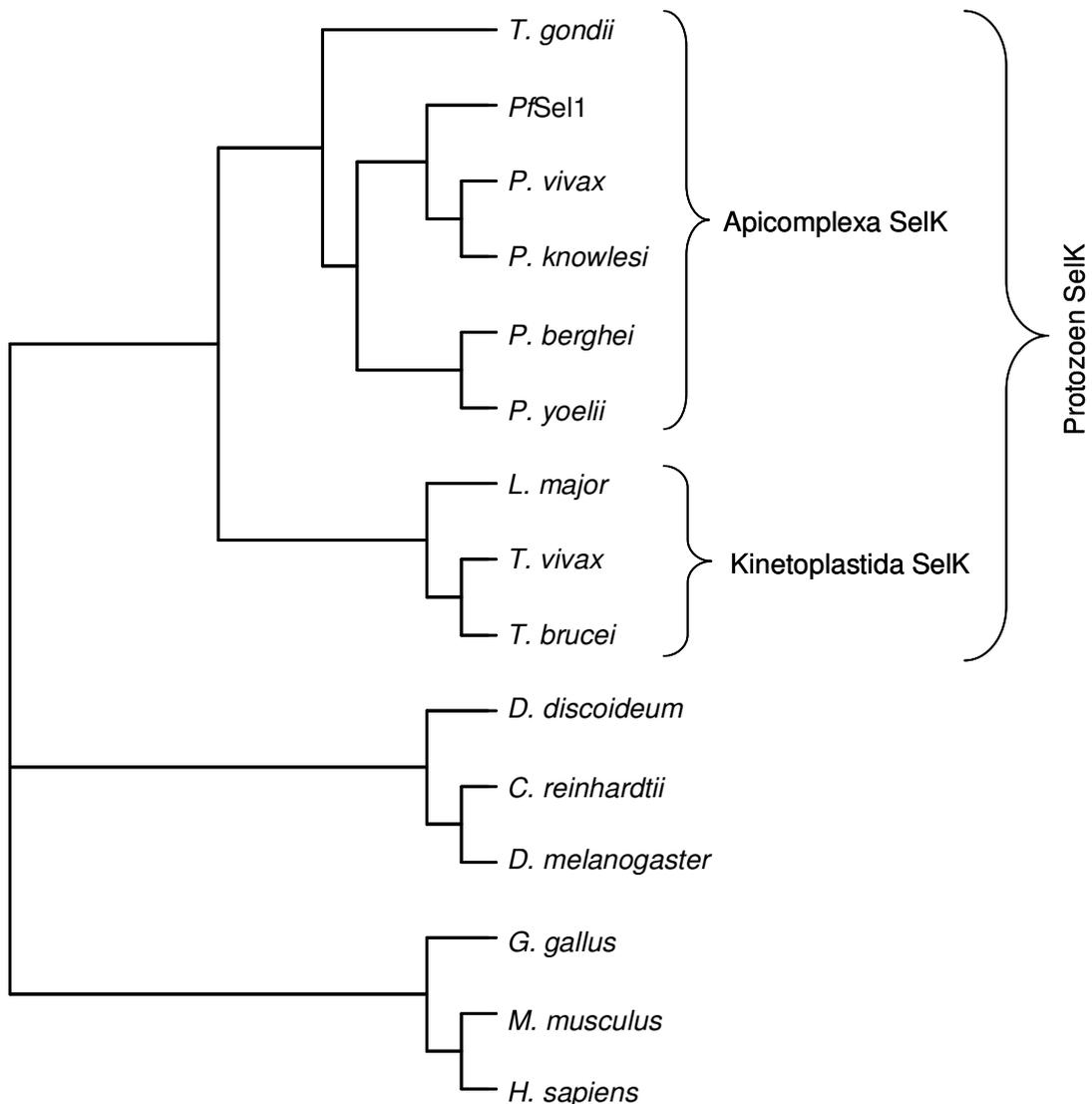


Abb. 3.5 Kladogramm von *PfSel1* und SelK-Sequenzen. Multiple Alignments und der phylogenetische Baum wurden mittels MAFFT erstellt. Der Baum wurde durch TreeView visualisiert. Sequenzen, die für die Alignments genutzt wurden, sind folgende: *PfSel1* – XP_001348206.2 (*P. falciparum*), XP_001616914.1 (*P. vivax*), XP_677373.1 (*P. berghei*), XP_727357.1 (*P. yoelii*), XP_002260956.1 (*P. knowlesi*), XP_646897.2 (*D. discoideum*), Q8H6T3_CHLRE (*C. reinhardtii*), NP_572763 (*D. melanogaster*), NP_001020612.1 (*G. gallus*), NP_064363.2 (*M. musculus*), Q9Y6D0.3 (*H. sapiens*), die Sequenzen von *L. major*, *T. vivax* und *T. brucei* wurden aus LOBANOV *et al.* [136], die *T. gondii* Sequenz aus NOVOSELOV *et al.* [135] entnommen. Es stellt sich eine Gruppierung der Sel1-Homologen der Plasmodien mit *T. gondii* heraus. Diese Apicomplexa-Gruppe ist am nächsten mit den Kinetoplastida-SelK verwandt.

Weiterhin wurden 18 bekannte SelT-Sequenzen verschiedenster Organismen sowie *PfSel2* ebenfalls in einem multiplen Alignment analysiert und mit Hilfe eines Kladogramms in ein Verwandtschaftsverhältnis gesetzt (siehe Abb. 3.6). Dabei zeigt sich eine Beziehung von *PfSel2* zu dem *T. thermophila* Protein mit der SelT/SelW/SelH Selenoprotein-Domäne sowie eine übergeordnete Verwandtschaft zu anderen SelT's in Organismen aus dem Stamm Alveolata. Aus einem Stammbaum mit den vier *PfSel*-Sequenzen und einigen Sequenzen ähnlicher Proteine zeigt sich deutlich die Gruppierung von *PfSel2* mit den bekannten SelT-Proteinen (siehe Abb. 3.8).

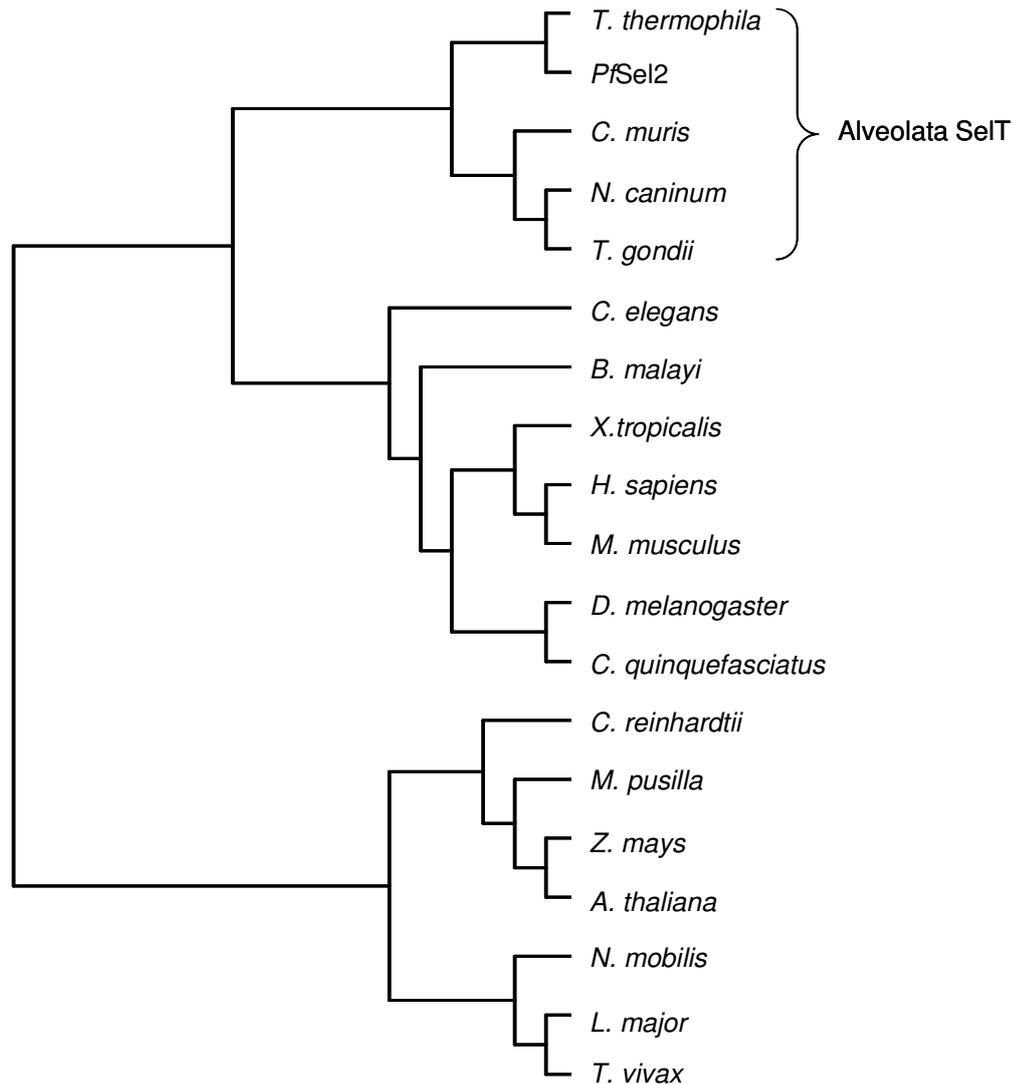


Abb. 3.6 Kladogramm von *PfSel2* und *SelT*-Sequenzen. Multiple Alignments und der phylogenetische Baum wurden mittels MAFFT erstellt. Der Baum wurde durch TreeView visualisiert. Sequenzen, die für die Alignments genutzt wurden, sind folgende: XP_001031334.1 (*T. thermophila*), CAX64256.2 (*P. falciparum*), XP_002142393 (*C. muris*), CAB01692 (*C. elegans*), XP_001898122.1 (*B. malayi*), Q6PBD1.3 (*X. tropicalis*), P62341.2 (*H. sapiens*), P62342.2 (*M. musculus*), NP_608897.1 (*D. melanogaster*), XP_001846674.1 (*C. quinquefasciatus*), XP_001689814.1 (*C. reinhardtii*), EEH60129.1 (*M. pusilla*), NP_001151493.1 (*Z. mays*), NP_190314.2 (*A. thaliana*), A4BRV4_9GAMM (*N. mobilis*), die Sequenzen von *L. major* und *T. vivax* wurden aus LOBANOV *et al.* [136], die *T. gondii*- und *N. caninum*-Sequenz aus NOVOSELOV *et al.* [135] entnommen. Es stellt sich eine Gruppierung von *PfSel2* mit den *SelT*-Sequenzen anderer Alveolata.

Ein phylogenetischer Baum bestehend aus 14 bekannten *SelS*-Sequenzen unterschiedlichster Organismen und drei plasmodialen *Sel4*-Sequenzen zeigt einen Cluster der *Plasmodium*- mit den Kinetoplastida-Sequenzen (siehe Abb. 3.7). Interessanterweise gruppiert sich hier auch die Sequenz der Kleiderlaus *Pediculus humanus corporis* ein. Damit bilden diese Sequenzen zusammen eine *SelS*-Parasiten-Familie. Aus dem großen Stammbaum aller *PfSel*-Sequenzen zeigt sich Anordnung der *SelS*-Sequenzen der Kleiderlaus und des Menschen mit *PfSel4* (siehe Abb. 3.8). Hingegen lagern die beiden Kinetoplastida *SelS*'s außerhalb dieser Gruppe, jedoch als nächster Nachbar. Die *SelS*-Sequenzen sind sehr ähnlich zu denen von *SelK* und bilden einen großen Cluster.

In dem Stammbaum aller plasmodialer Selenoproteine zeigt sich auch eine Einordnung von *PfSel3* außerhalb aller anderen Selenoproteine, am ehesten jedoch eine Gruppierung mit *SelT/PfSel2* (siehe Abb. 3.8).

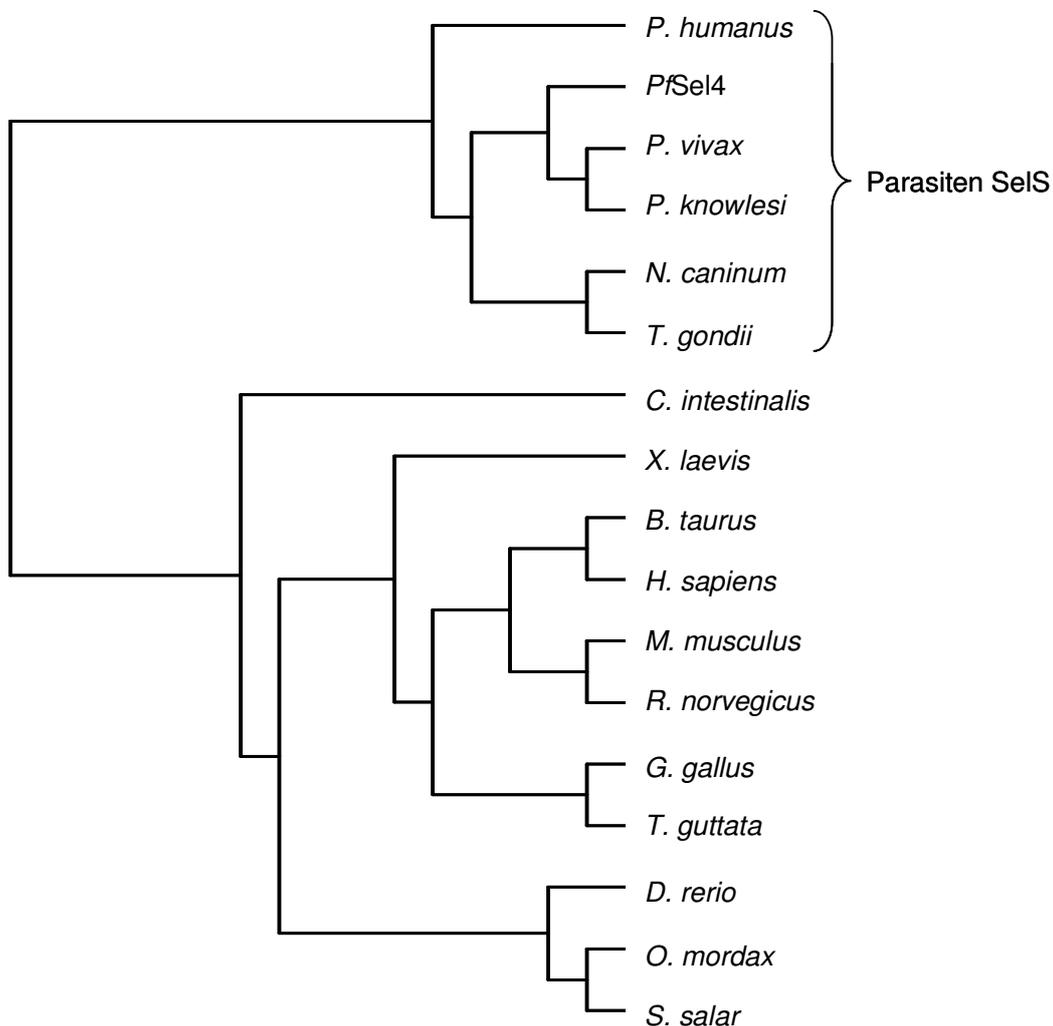


Abb. 3.7 Kladogramm von *PfSel4* und *SelS*-Sequenzen. Multiple Alignments und der phylogenetische Baum wurden mittels MAFFT erstellt. Der Baum wurde durch TreeView visualisiert. Sequenzen, die für die Alignments genutzt wurden, sind folgende: XP_002423570.1 (*P. humanus corporis*), XP_001348425.2 (*P. falciparum*), XP_002260752.1 (*P. knowlesi*), XP_001616701.1 (*P. vivax*), XP_002131398.1 (*C. intestinalis*), NP_001087125.1 (*X. laevis*), AA112741.1 (*B. taurus*), Q9BQE4.3 (*H. sapiens*), NP_077759.3 (*M. musculus*), NP_775143.2 (*R. norvegicus*), NP_001019905.1 (*G. gallus*), ACH44461.1 (*T. guttata*), NP_001038799.2 (*D. rerio*), ACO09985.1 (*O. mordax*), ACI67388.1 (*S. salar*), die *T. gondii*- und *N. caninum*-Sequenz wurden aus NOVOSELOV *et al.* [135] entnommen. Es stellt sich eine Gruppierung der *Sel4*-Homologen der Plasmodien mit den Kokzidien *T. gondii* und *N. caninum* heraus. Außerhalb dieser Apicomplexa-Gruppe ist *SelS* der Kleiderlaus *P. humanus corporis* den Sequenzen am ähnlichsten.

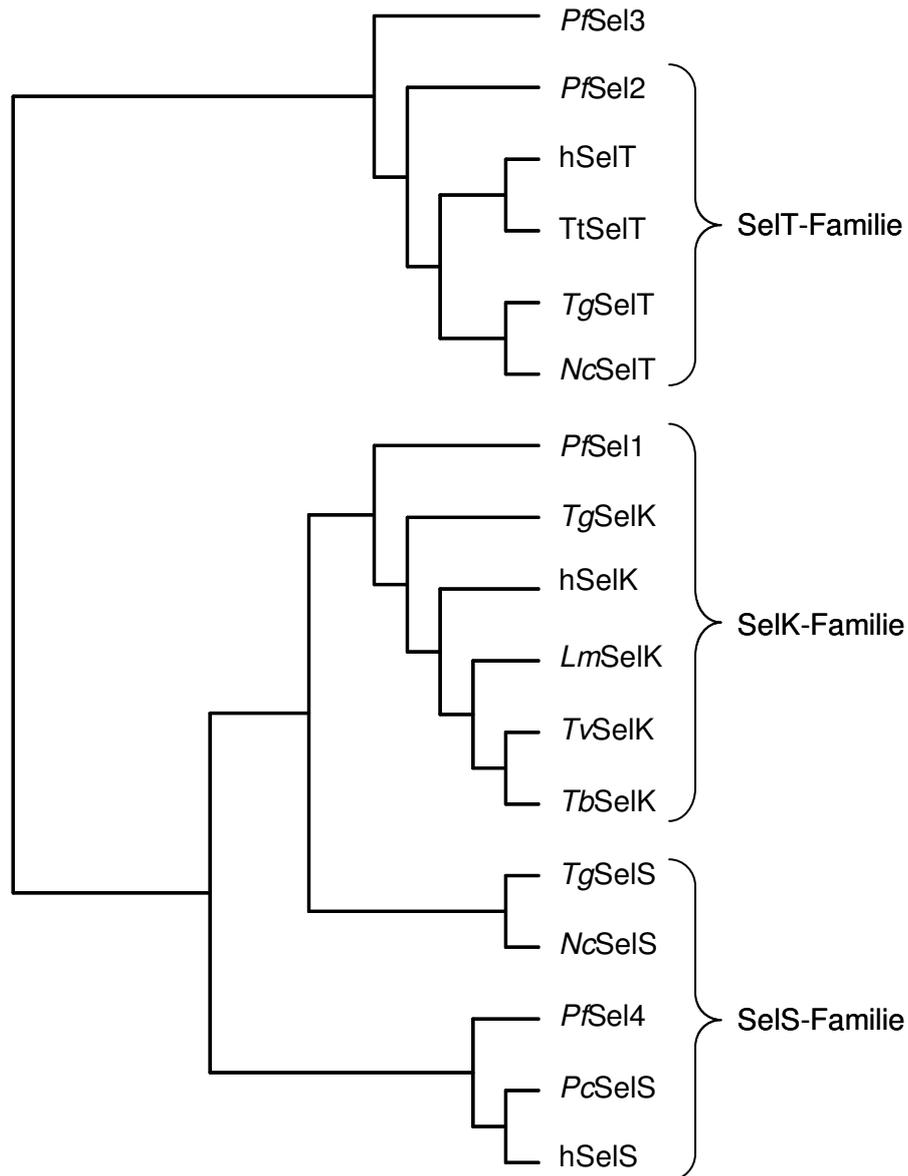


Abb. 3.8 Kladogramm aller plasmodialen Selenoproteine und verschiedenen Sel-Sequenzen unterschiedlicher Organismen. Multiple Alignments und der phylogenetische Baum wurden mittels MAFFT erstellt. Der Baum wurde durch TreeView visualisiert. Die verwendeten Sequenzen sind aus den Abb. 3.5 – Abb. 3.7 zu entnehmen. Die Acc. No. Für *PfSel3* ist CAX64123.2. Die *PfSel2* und *SelT*-Sequenzen gruppieren sich zusammen. *PfSel3* ist dieser Gruppe am ähnlichsten. *PfSel1* und *SelK* sowie *PfSel4* und *SelS* sind jeweils in einem Cluster und sind untereinander stark verwandt.

3.3 Motiv Scan

Durch die Analyse der Aminosäuresequenz der *PfSel*'s sollten mögliche Motive entdeckt werden. Für die Untersuchung wurden verschiedene Tools herangezogen, u.a. PSORTII, MyHits und ELM. *PfSel1* hat laut PSORTII eine Transmembran-Domäne (TD) zwischen Aminosäuren 41 – 63. Nach der Methode von HARTMANN ordnet sich *PfSel1* in die Membran-Kategorie Typ 2, mit den Aminosäuren 1 – 47 auf der cytoplasmatischen Seite, ein [137].

PSORTII und MyHits fanden ein zweiteiliges Kernimportsignal (NLS) an der Aminosäureposition 8 – 25 (MDDRKENKKNADYEIFLRDRKLYE). Mit einer 39,1%igen Wahrscheinlichkeit bei der *k*-NN

Vorhersage in PSORTII sollte *PfSel1* im Nukleus lokalisiert sein. Auch nach der REINHARDT-Methode sprach ein hoher Vertrauensfaktor von 89 für eine Nukleuslokalisierung [138]. SignalP und PSORTII identifizierte keine möglichen abspaltbaren Signalpeptide (SP). *PfSel1* hat laut PSORTII ein mögliches ER-Membran-Retentionsmotiv DDRK am N-Term. Unter Nutzung von PSORTII, MyHits und ELM wurden zwei Tyrosine an der Position 12 (YEIF) und 23 (YEKI) aufgefunden (siehe Abb. 3.1), die eine mögliche Rolle im *sorting signal* und Interaktion mit der μ -Untereinheit eines Adapterproteinkomplexes spielen. Daneben fand PSORTII an der Position 38 (ILPI) ein mögliches *vacuolar targeting* Motiv und ebenso wie MyHits eine mögliche Glycosylierungsstelle zwischen den Aminosäuren 70 – 75. MyHits und GeneSilicoServer fanden keine bekannten Domänen oder Strukturen. Im Vergleich zu *hSelK* sind die aufgefundenen Motive in *PfSel1* ähnlich. So kommt auch in *hSelK* ein Tyr am N-Term vor (siehe Abb. 3.1). Weiterhin hat *hSelK* auch eine vorhergesagte TD in einer ähnlichen Region wie *PfSel1*.

Ein mögliches SP an der Position 1 – 25 wurde für *PfSel2* von ELM und SignalP (Value 0,981) gefunden. In einer weiterführenden Untersuchung befand das Hilfsprogramm PATS mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von 0,982 *PfSel2* als ein mögliches Apicoplast-lokalisiertes Protein. PSORTII sagte für dieses plasmodiale Selenoprotein mit einem Vertrauensfaktor von 94,1 nach der REINHARDT-Methode jedoch eine cytoplasmatische Lokalisation voraus. Hingegen wurde nach der *k*-NN-Vorhersage eine Lokalisation mit 44,4%iger Wahrscheinlichkeit im Endoplasmatischen Retikulum gestellt. *PfSel2* wurde nach Analyse der TD in die Membran-Topologie nach HARTMANN *et al.* in die Kategorie 3a eingeteilt. *PfSel2* hat demnach drei mögliche TDs an den AS-Positionen a) 3 – 19, b) 122 – 138 und c) 174 – 190. Der N-Terminus reicht dabei in die cytosolische Seite. Eine Darstellung der hydrophoben Aminosäuren in *PfSel2* zeigte eine mögliche Signalsequenz an Position 1 – 21 und eine weitere hydrophobe Region an Position 114 – 141. Im Vergleich zu einer Hydrophobizitätsdarstellung von Ratten-*SelT* konnte eine Ähnlichkeit zu *PfSel2* gezeigt werden (siehe Abb. 3.9). Daneben konnte PSORTII ein ER-Membran-Retentionsmotiv (KNIH) im C-Terminus der *PfSel2*-Aminosäuresequenz finden.

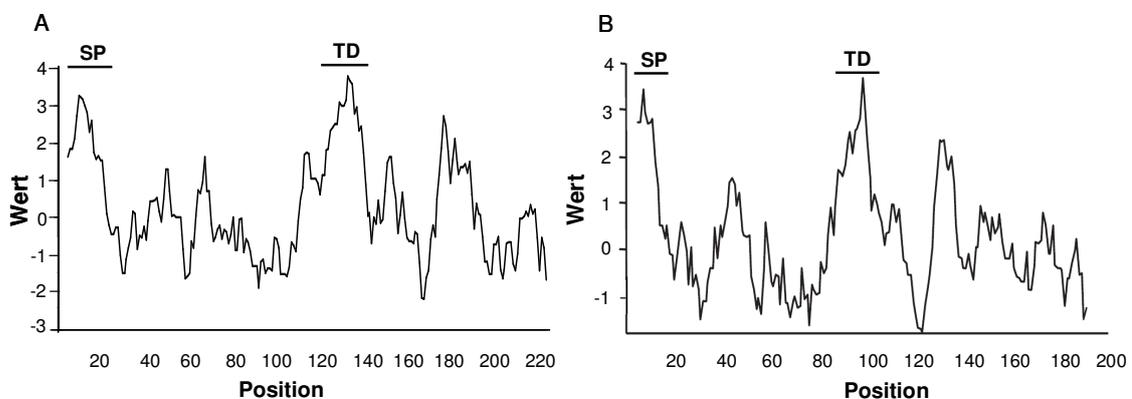


Abb. 3.9 Diagramm zur Hydrophobizität in *PfSel2* und der Ratten-*SelT*. Hydrophobizitäts-Graph zu A) *PfSel2* wurde durch ProtScale dargestellt und B) zu *SelT* nach GRUMOLATO *et al.* [139] modifiziert. Die hydrophoben Domänen in *PfSel2* und der Ratten-*SelT* liegen in ähnlichen Regionen. Die erste stark hydrophobe Region entspricht wahrscheinlich einem Signalpeptid (SP), die zweite hingegen einer Transmembran-Domäne (TD).

Untersuchungen auf mögliche Glycosylierungsstellen durch MyHits sowie durch ELM identifizierten die Aminosäureposition 157 – 162. Es konnten keine weiteren bekannten Domänen und Strukturen durch MyHits und GeneSilicoServer ausgemacht werden.

Die Untersuchungen der *PfSel3*-Sequenz auf mögliche SP's identifizierte die an der Position 1 – 21 nach PSORTII und die Position 1 – 24 nach den Tools ELM und MyHits. Eine weiterführende Analyse mit Hilfe des Programms PATS stellte *PfSel3* als einen Apicoplast-Kandidaten mit der Wahrscheinlichkeit von 93,6% vor. Hingegen sah PSORTII *PfSel3* nach der REINHARDT-Methode *PfSel3* im Nukleus lokalisiert (89%) bzw. nach der *k*-NN-Methode mit 39,1%iger Wahrscheinlichkeit im Mitochondrium und 30,4% im Nukleus lokalisiert. Hierbei wurden drei mögliche NLS festgestellt: a) AS-Position 332 – 335 (KKKK), b) AS-Position 159 – 165 (PYKLLKE) und c) ein zweiteiliges NLS an der Position 334 – 350 (KKFTLPSFKSLPDKFKR). Nach der KLEIN-Methode wurden keine TDs gefunden [140]. PSORTII fand daneben noch eine mögliche Spaltstelle für eine mitochondriale Signalsequenz an Position 23 – 24 (SRT|VD). Das Online Programm ELM fand unter Einbeziehung einer möglichen Nukleuslokalisierung eine Reihe von Sequenzmotiven, die verschiedene Aktivitäten im Kern ausüben. Die Sequenzen der verschiedenen *PfSel3*-Mutanten aus der Lokalisationsstudie sollten auf durch Aminosäureaustausch entstandene neue Schnittstellen für Enzyme untersucht werden. Mittels PeptidCutter wurde in *PfSel3*:p.26u>w an der Position 25|26 bzw. 26|27 neue Angriffstellen für mehrere Enzyme gefunden. Aus dem Aminosäureaustausch von Selenocystein zu Tryptophan resultierten an diesen Positionen Erkennungsstellen für die Proteinkinase K, Pepsin und Chymotrypsin. Unter anderem wurden aber auch am Tryptophan 26 die Erkennungsstelle für die Chemikalien Iodosobenzoessäure sowie BNPS-Skatole registriert. Hingegen entstand durch den Austausch der Aminosäure Selenocystein zu Cystein nur eine Schnittstelle an der Position 25|26 für die Chemikalie 2-Nitro-5-Thiocyanobenzoessäure.

In *PfSel4* konnten durch PSORTII und PATS keine SP's gefunden werden. Hingegen fand SignalP mittels der S-Methode mit einem e-Wert von 0,914 ein SP an Position 1 – 26, beurteilte jedoch die Position 31 – 32 (SLL|IF) als wahrscheinlichste *cleavage site*. PSORTII untersuchte die Sequenz weiterhin auf TD's und fand eine mögliche Region in der AS-Sequenz 21 – 37 (siehe Abb. 3.4). Demnach wurde *PfSel4* in die Membran-Topologie Kategorie 1b aufgenommen. Die Aminosäuresequenz 21 – 133 wäre hierbei im Cytoplasma lokalisiert. An der Position 34 – 97 wurde eine mögliche coiled-coil-Region entdeckt. Auch weitere Analysen mittels den Programmen COILS und Paircoil2 deuten mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 bzw. einer p-Wert von <0,02 auf eine coiled-coil-Struktur innerhalb dieser Aminosäuresequenz hin. Überschneidend mit dieser Position wies MyHits auf eine stark Lysin-reiche Region zwischen den Aminosäuren 36 – 104 hin. PSORTII fand ferner noch ein Di-Leucin-Motiv an der Position 30/31. Im einem Vergleich zu hSelS sind auch hier diese Motive anzutreffen und meist in der gleichen Region positioniert (siehe Abb. 3.4). Auch wenn keine NLS gefunden wurde, sagte PSORTII *PfSel4* eine nukleare Lokalisation

nach der REINHARDT- (94,1) und der *k*-NN-Methode (65,2%) vorher.

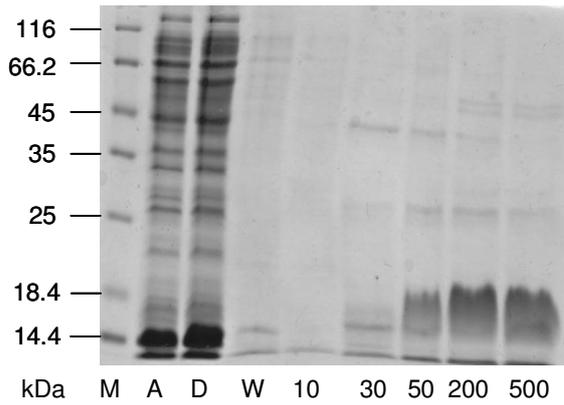
3.4 Heterologe Überexpression

Es sollte durch Nutzen verschiedenster Nährmedien, Hilfsvektoren, *E. coli*-Zellen, Induktorkonzentrationen, Expressionstemperaturen und Expressionsdauer eine optimale Überexpression der plasmodialen Selenoproteine als Cystein- oder Serin-Mutanten erzielt werden. Nach der Expression wurden unterschiedliche Puffer zum Lösen der Proteine aus dem Zellpellet sowie zur Aufreinigung mittels Metall-Affinitäts- oder Gelfiltrationschromatographie genutzt. In dieser vorliegenden Arbeit wird nur auf die beste Methode eingegangen. Die Optimierung der Überexpression von *PfSel1* und *PfSel2* wurde im Rahmen dieser Arbeit in zwei Masterarbeiten der Studenten RAPHAEL EBERLE [110] und NICOLE RONZHEIMER [111] durchgeführt. Es ist im Allgemeinen möglich, alle plasmodialen Selenoproteine in *E. coli* zu überexprimieren. Die Ausbeuten und Reinheitsgrade sind dabei verschieden, jedoch bei allen Proteinen relativ gering.

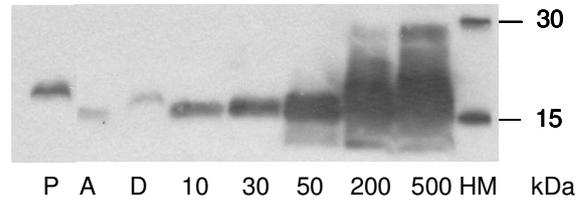
Die beste Methode zum Überexprimieren und Lösen der *PfSel1*-Mutanten aus dem *E. coli* Zellpellet wurde unter den Kapiteln 2.2.2.5 und 2.2.4.1.3 beschrieben. Wie in Abb. 3.10-A1 zu sehen, konnte *PfSel1*:p.115u>c relativ sauber erhalten werden. In den Eluaten 50 – 500 mM Imidazol wurde das meiste und bestgereinigte Protein erhalten. Auch schwache Konzentrationen an Imidazol (10 – 30) verdrängten *PfSel1* bereits von dem Protino-Material (siehe Abb. 3.10-A2). Auch war immer noch Protein im Pellet vorhanden. Die Ausbeute von *PfSel1* ist trotz gleicher Expressionsbedingungen sehr unterschiedlich und betrug in den einzelnen Versuchen zwischen 0,1 – 1 mg/l Expression. Weitere Versuche das Protein in Vivaspin-Gefäßen einzuengen waren stets mit einem hohen Proteinverlust verbunden. Hierbei war das Protein weder im Durchlauf noch im Überstand aufzufinden. Auch eine Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie, wie unter Kapitel 2.2.4.1.3.2 beschrieben, resultierte in über 50% Proteinverlust und wurde deswegen als Reinigungsschritt vermieden.

Für die Mutanten von *PfSel2* konnten keine ausreichenden Überexpressionen in *E. coli* erzielt werden. Die Proteine wurden erst durch Western Blot-Analysen erkennbar. Zum einen konnte keine optimale Ausbeute für *PfSel2* und zum anderen keine hinreichende Sauberkeit erlangt werden (siehe Abb. 3.10-B1). Durch genaue Analysen und Vergleiche der Western Blot-Banden und Coomassie-gefärbte Gele war zu erkennen, dass das Western Blot-Signal nicht mit den gefärbten Proteinbanden im SDS-Gel übereinstimmen. Demnach war die Identifikation des Proteins nach Coomassie Blue-Färbung des SDS-Gels nicht möglich. Weiterhin ist aus den Western Blots zu erkennen, dass *PfSel2* bei Imidazol-Konzentrationen von 10 – 200 mM von der Matrix eluiert und keinen spezifischen Elutionspunkt besitzt (siehe Abb. 3.10-B2). Der Hauptteil des exprimierten *PfSel2* konnte nicht aus dem Pellet gelöst werden. Die Ausbeute an rekombinanten *PfSel2* war nicht bestimmbar. Versuche, das Protein durch Kationen-Austauscher zu reinigen, scheiterten an den hohen Salzkonzentrationen im Puffer, die das Protein stabilisieren [110]. Durch

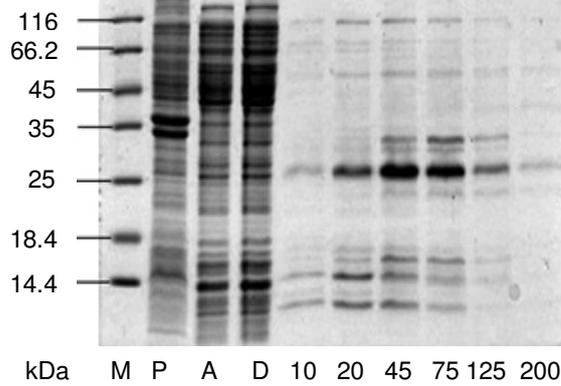
A1



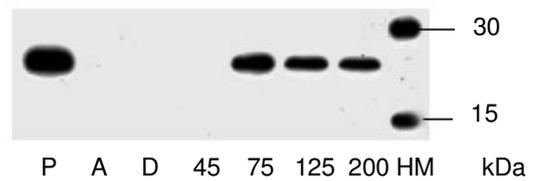
A2



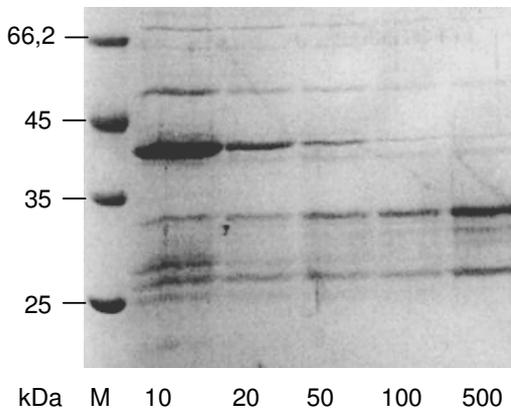
B1



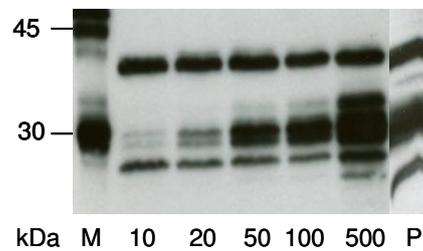
B2



C1



C2



D1

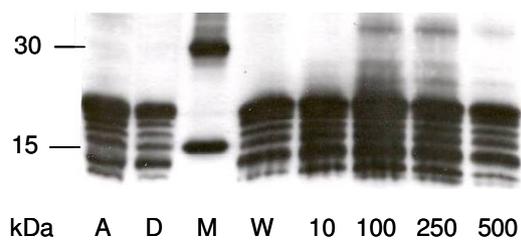


Abb. 3.10 Rekombinante plasmodiale Selenoproteine nach Überexpression in *E. coli* und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. Die Proteine wurden in M15- bzw. KRX-Zellen wie unter 2.2.2.5 beschrieben überexprimiert. Die geernteten Zellen wurden in +TG-Puffer aufgenommen, lysiert und die rekombinanten Proteine mittels His-Tag-Affinitätschromatographie, wie unter 2.2.4.1.3.1 beschrieben, gereinigt. A1) und A2) zeigen ein Coomassie Blue gefärbtes Gel bzw. ein Western Blot nach Aufreinigung

von *PfSel1*:p.115u>c. In B1) und B2) sind ein Coomassie Blue gefärbtes Gel bzw. Western Blot nach Aufreinigung von *PfSel2*:p.72u>c zu sehen. C1) und C2) präsentieren ein Coomassie Blue gefärbtes Gel und Western Blot nach Aufreinigung von *PfSel3*:p.26u>c. Ein Western Blot nach Überexpression und Aufreinigung von *PfSel4*:p.133u>c ist in D1) zu sehen. P = Pellet; A = Zelllysate; D = Durchlauf; W = Waschschrift, 10 – 500 mM Imidazol; HM = His-Proteinmarker, M = Proteinmarker. Die Bilder A1) – B2) wurden nach RONZHEIMER [111] modifiziert.

Gelfiltrationschromatographie konnte die stärkste Verunreinigung, ein 25 kDa *E. coli*-Protein, das auch in Abb. 3.10-B1 deutlich zu erkennen ist, von *PfSel2* abgetrennt werden. Jedoch waren immer noch viele andere *E. coli*-Proteine in den Fraktionen mit *PfSel2* vorhanden. Durch Gensynthese mit Anpassung der *codon usage* für *E. coli* konnten Abbrüche während der Biosynthese vermieden werden, führte jedoch auch zu keiner Verbesserung der Ausbeute. Überexpressionen von *PfSel2* als Sec-haltiges Protein mit einer optimalen SECIS-Variante führten zu einem rund 27 kDa großen Protein, welches aber, wie die Cystein- und Serin-Analoga, nur über Western Blot erkennbar war.

PfSel3 konnte als Cystein-Analogon in *E. coli* heterolog überexprimiert werden. Das Protein lag dabei nach dem Reinigungsprozess unsauber vor (siehe Abb. 3.10-C1). Die Ausbeute für *PfSel3* war nicht bestimmbar. Jedoch waren viele Abbruchprodukte vorhanden (siehe Abb. 3.10-C2). *PfSel3* eluierte im gesamten Reinigungsprozess durch 10 – 500 mM Imidazol von der Matrix. Ein Teil des rekombinanten Proteins konnte nicht aus dem Pellet gelöst werden.

Ähnlich zu *PfSel1* konnte die heterologe Überexpression von *PfSel4* mit ≤ 1 mg/l Expression erzielt werden. Jedoch lag das Protein stets unsauber vor. Der Reinheitsgrad konnte durch verschiedene Matrizen nicht verbessert werden. Durch eine Gensynthese von *PfSel4* mit Anpassung der *codon usage* an *E. coli* konnten die Abbruchprodukte nicht verhindert, jedoch die Ausbeute erhöht werden. *PfSel4* eluierte von der Matrix während des gesamte Reinigungsprozesses durch 10 – 500 mM Imidazol (siehe Abb. 3.10-D1).

3.5 Oligomerisierung von *PfSel1* und *PfSel2*

Mittels der rekombinanten plasmidialen Selenoproteine wurden Studien zu den Oligomerisierungszuständen von *PfSel1* und *PfSel2* durchgeführt [111].

Hierbei wurde neben der Technik der Gelfiltrationschromatographie auch die Technik der Quervernetzung mittels Bisimidaten genutzt.

In der Gelfiltrationschromatographie eluierte *PfSel1*:p.115u>c in den Fraktionen mit Proteinen der Molekulargewichte von ca. 229 und 86 kDa. Durch eine Vorbehandlung der Probe mit 4 μ M DTT eluierte die Probe jedoch erst bei berechneten 1,6 kDa. Es stellten sich keine Unterschiede in diesem Verhalten durch unterschiedliche Mutationen des Redox-Motives heraus. Jedoch erschien das Protein mittels des Bisimidats DMA als Monomer bei rund 16 kDa im SDS-Gel.

Auch die verschiedenen heterolog überexprimierten *PfSel2*-Varianten eluierten nach der Gelfiltrationschromatographie in Fraktionen mit Proteinen von hohen Molekulargewichten. So wurde *PfSel2* den Fraktionen bei 266 kDa und 105 kDa detektiert. Durch Vorbehandlung der

Probe mit 10 mM DTT für 30 min eluierte *PfSel2* bei einem Molekulargewicht von über 1000 kDa sowie 604 kDa und 265 kDa. Hingegen wurde *PfSel2* nach Behandlung mit DMA als Monomer bei rund 27 kDa mittels eines Western Blots detektiert.

3.6 Redoxaktive Assays

Keine der getesteten plasmodialen Selenoproteine reduzierte die Disulfidbrücken des Insulins in dem Assay nach Holmgren [119]. Jedoch waren *PfSel1* und *PfSel4* in der Lage, die GS vor oxidativem Stress zu schützen. Hier zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine Erhöhung der Aktivität der GS unter Fe_2Cl - und DTT-Zugabe mit steigender Konzentration an *PfSel1* bzw. *PfSel4*.

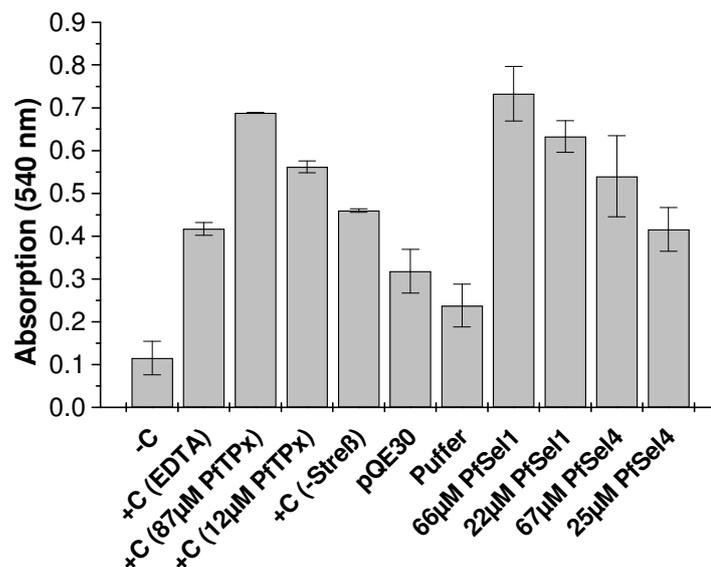


Abb. 3.11 Protection-Assay mit *PfSel1* und *PfSel4*. Die gereinigten rekombinanten plasmodialen Selenoproteine *PfSel1* und *PfSel4* wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen zu einer Lösung bestehend aus *EcGS* in HEPES-Puffer sowie den Stressoren Fe_2Cl und DTT gegeben und inkubiert. Nach Zugabe einer weiteren Lösung, die Glutamin und ADP enthielt, und einer anschließenden Inkubation wurde die Aktivität der *EcGS* durch Messung der Absorption von 540 nm durch das entstandene Produkt Glutamyhydroxamsäure-Fe-Komplex gemessen. Als Positivkontrollen (+C) dienen EDTA und *PFTPx1*, sowie ein Ansatz ohne Fe_2Cl und DTT (-Stress). In der Negativkontrolle (-C) wurde die *EcGS* dem Stress ohne weiteren „Schutz“ ausgesetzt.

3.7 Interaktomanalysen *PfSel1* und *PfSel4*

Durch PolyHis-Tag-*pull-down*-Assays für *PfSel1* [111] und *PfSel4* konnten Interaktionspartner gefangen werden. Jedoch konnten die in diesem Zuge gefangenen „Beute-Proteine“ mittels MALDI-TOF-MS nicht identifiziert werden.

PfSel1 fing in mehreren Experimenten vor allem ein stark auftretendes Protein kleiner als 14,4 kDa (siehe Abb. 3.12-A). Daneben traten im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen stets mehrere Proteine in den Eluaten waren, zwei Proteine in der Größe von rund 40 kDa auf.

PfSel4 fing in mehreren durchgeführten PolyHis-Tag-*pull-down*-Assays im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen keine Proteine in den Eluaten auftraten, stets ein rund 14 kDa großes Protein (siehe Abb. 3.12-B). Durch eine MALDI-TOF-MS-Analysen konnte dieses gefangene

Protein als *PfTrx1* identifiziert werden. Jedoch ließ sich diese MS-Analyse nicht reproduzieren.

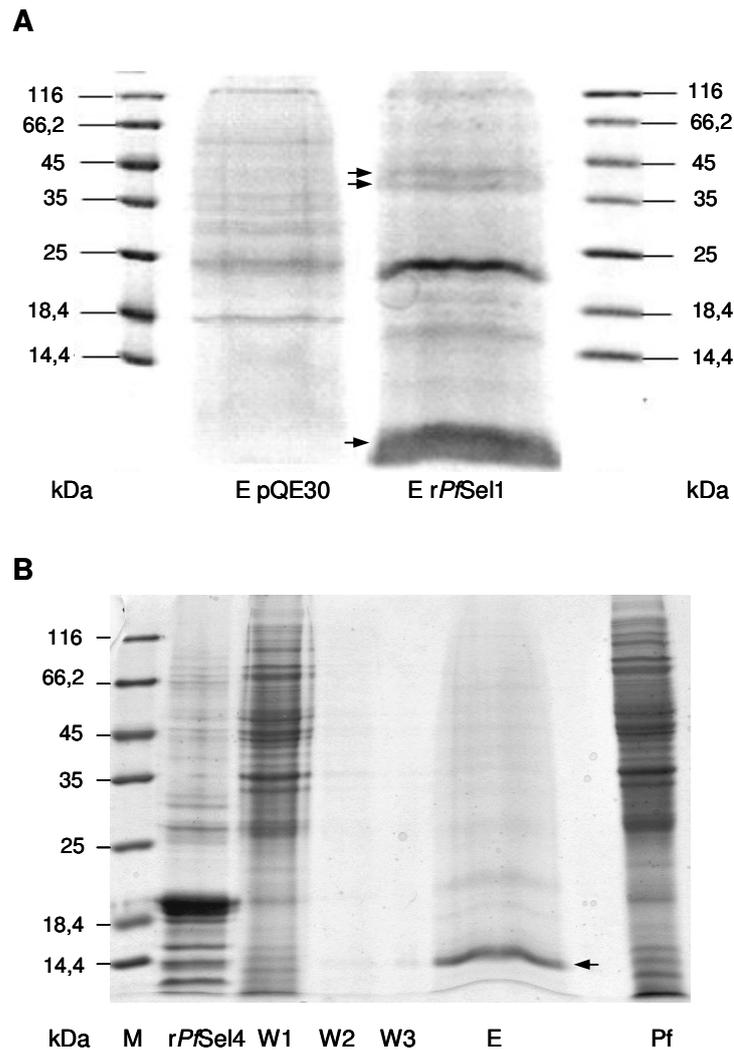


Abb. 3.12 Pull-down-Assays mit *PfSel1*:p.115u>c und *PfSel4*:p.133u>c. Die gereinigten rekombinanten plasmodialen Proteine wurden auf einer Protino-Säule (*PfSel1*, A) bzw. Talon-Säule (*PfSel4*, B) inkubiert. Das Material wurde nach dem Waschen mit plasmodialem Proteinrohextrakt inkubiert, ungebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt. Das Fängerprotein und die gebundenen Beuteproteine wurden mit Imidazol eluiert und in einer SDS-PAGE analysiert. M = Marker, W = Waschschrte, E = Eluat, Pf = plasmodialer Proteinrohextrakt.

3.8 Lokalisationsstudien

Durch das Anbringen einer Sequenz des Grün-fluoreszierenden-Proteins aus *A. victoria* an dem C-Term von verschiedensten Konstrukten zu den *PfSel*'s konnten die Lokalisationen des plasmodialen Proteins *in vivo* analysiert werden. Für die Untersuchungen wurden jeweils zwei verschiedene Konstrukte verwendet. Zum einen wurde eine Sec>Cys-Mutante und zum anderen ein Konstrukt mit dem Codon TGA für Sec, jedoch waren die SECIS-Elemente, für eine korrekte Insertion von Sec, nicht auf der Sequenz vorhanden.

Es zeigte sich, dass *PfSel1*:c.345A>T im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (siehe Abb. 3.13-A). Für die Variante *PfSel1*:c.del.SECIS wurde kein GFP-Signal aufgefangen, somit wurde in den Parasiten das Protein nicht synthetisiert.

Von der *PfSel2:c.216A>T*-Mutante resultierte ein starkes GFP-Signal im ER (siehe Abb. 3.13-C). Hingegen konnte für *PfSel2:del.SECIS* nur vereinzelt und sehr schwach ein Signal im ER über dem Hintergrundrauschen aufgefangen werden (siehe Abb. 3.13-B). Dieses Signal konnte aber nicht mit dem ER-Farbstoff BiP im Endoplasmatischen Retikulum co-lokalisiert werden, da das Ausbleichen der GFP-Fluoreszenz zu stark war. So konnte nur unter dem Gesichtspunkt des optischen Fluoreszenzverlaufs eine ER-Lokalisation für *PfSel2:c.del.SECIS* durch DR. PRZYBORSKI, Universität Marburg registriert werden.

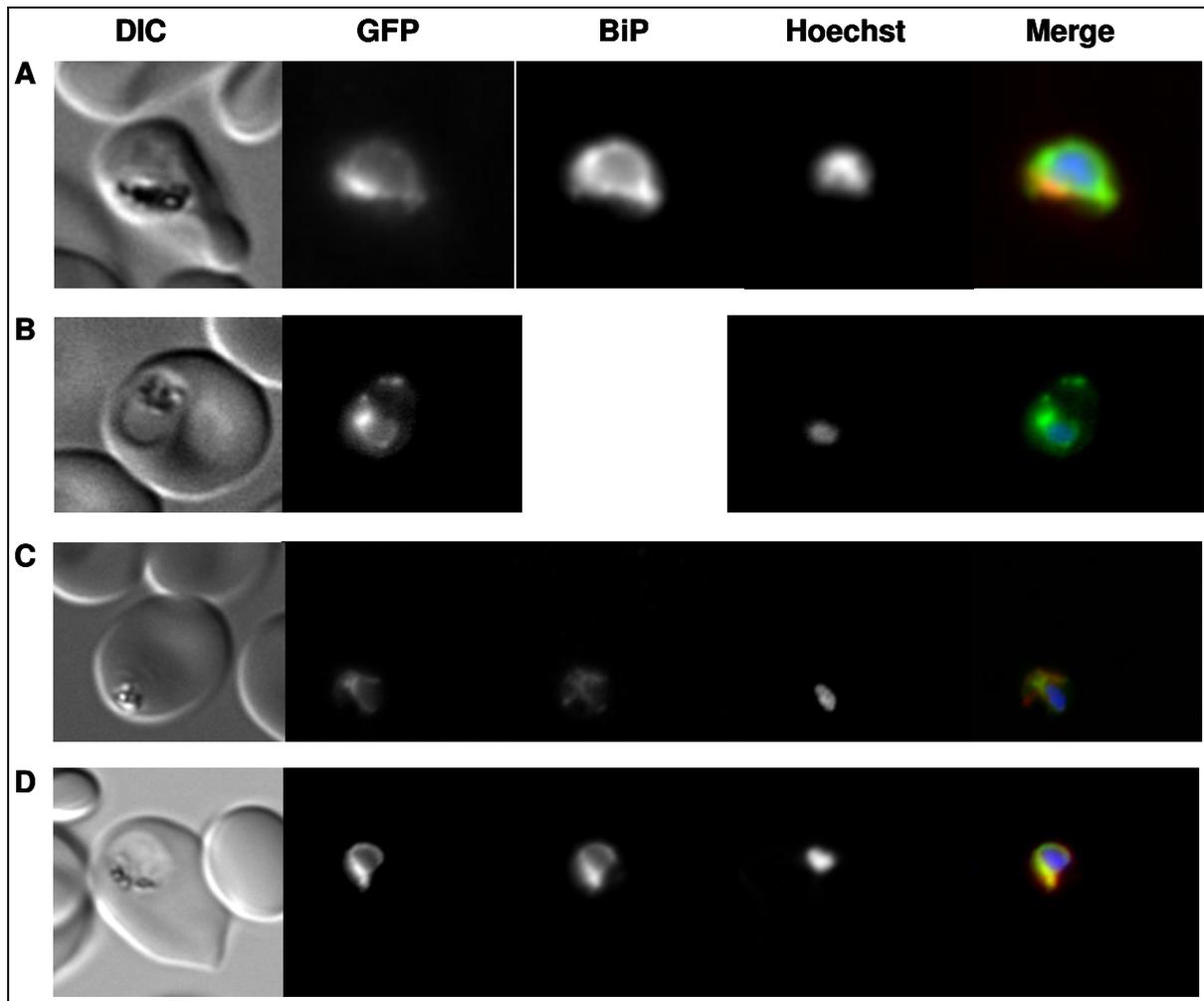


Abb. 3.13 Lokalisationsstudie zu *PfSel1*, *PfSel2* und *PfSel4*. C-terminal GFP-getaggte Sequenzen der Zielgene wurden in pARL kloniert. Dabei besitzt keines der Konstrukte ein SECIS-Element. *P. falciparum*-Parasiten wurden mittels Elektroporation jeweils mit einem Konstrukt transfiziert. Durch Zugabe von WR99120 wurde Selektionsdruck ausgeübt. Anti-GFP, anti-BiP und Hoechst 33258 wurden zur Co-Lokalisation in der Immunofluoreszenz genutzt. Alle Varianten der plasmodialen Selenoproteine A) *PfSel1:c.345A>T*, B) *PfSel2:c.del.SECIS*, C) *PfSel2:c.216A>T* und D) *PfSel4:c.399A>T* sind im ER lokalisiert. DIC = Durchlichtaufnahme

Die Lokalisationsstudien zeigten, dass das GFP-Fusionsprotein *PfSel3:c.del.SECIS* synthetisiert wurde und im Nukleus aufzufinden war (siehe Abb. 3.14-A). Auch für *PfSel3:c.78A>T* wurden GFP-Signale aufgezeichnet. Hier konnten aber keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Neben einer Apicoplasten-Lokalisation (siehe Abb. 3.14-C) konnte auch Protein in der parasitären Vakuole (PV) entdeckt werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden noch uneindeutige

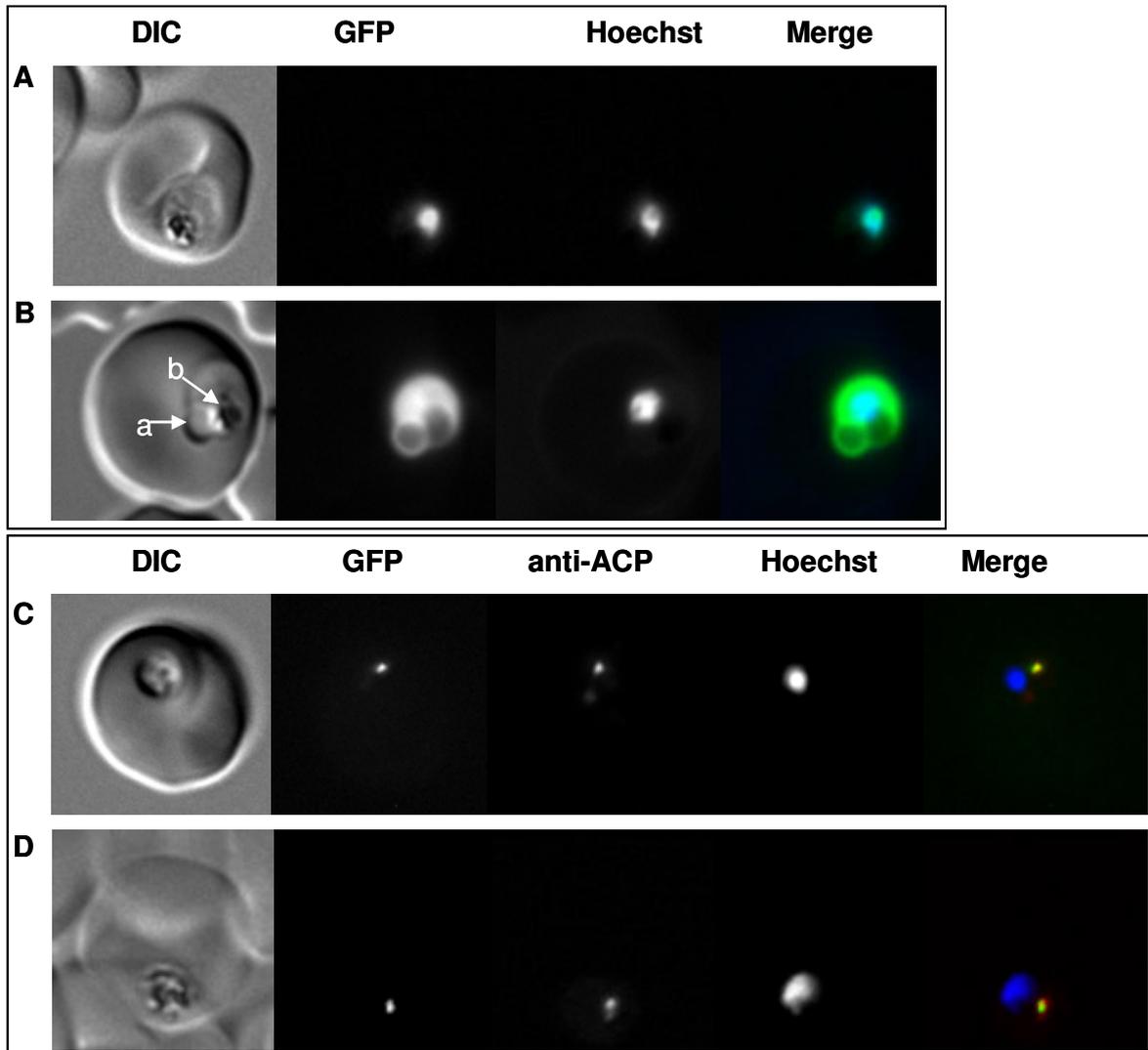


Abb. 3.14 Lokalisationsstudien zu *PfSel3*. C-terminal GFP-getaggte Sequenzen der verschiedenen mutierten *PfSel3*-cDNA-Varianten wurden in pARL kloniert. Dabei besitzt keines der Konstrukte ein SECIS-Element. *P. falciparum*-Parasiten wurden mittels Elektroporation jeweils mit einem Konstrukt transfiziert. Durch Zugabe von WR99120 wurde Selektionsdruck ausgeübt. Anti-GFP, anti-BiP und Hoechst 33258 wurden zur Co-Lokalisation in der Immunofluoreszenz genutzt. A) *PfSel3*:c.del.SECIS ist im Nukleus, B) der C-Term der *PfSel3* Sequenz *PfSel3*:p.331-351 ist im Cytosol, die Varianten C) *PfSel3*:c.78A>T und D) *PfSel3*:c.78A>G sind im Apicoplasten lokalisiert. In B) sind in der Durchlicht (DIC)-Aufnahme a) die Nahrungsvakuole und b) das Hämozoïn mit Pfeilen markiert.

„Punkte“ im Parasiten entdeckt, die keinem Kompartiment zugeschrieben werden konnten. Eine weitere Variante sollte aufklären, ob für UGA ohne SECIS Trp eingebaut wird. Die Mutante *PfSel3*:c.78A>G wurde aber mit einem eindeutigen Signal im Apicoplasten registriert (siehe Abb. 3.14-D). In einer vierten Mutante wurde das durch PSORTII und MyHits vorhergesagte zweiteilige NLS N-Terminal an das GFP kloniert. Diese *PfSel3*:p.331-351-GFP-Variante sollte Aufschluss über das Nucleussignal bringen. *PfSel3*:p.331-351 wurde jedoch im Cytosol lokalisiert (siehe Abb. 3.14-B). Hierbei war eine stark vergrößerte Nahrungsvakuole, in der kein Hämozoïn vorlag, zu beobachten. Das Hämozoïn lag dagegen im Cytosol der Parasiten.

PfSel4:c.400A>T ist wie *PfSel1*:c.345A>T und *PfSel2*:c.216A>T im ER lokalisiert (siehe Abb. 3.13-D). Hingegen konnte für die andere Mutante *PfSel4*:c.del.SECIS kein GFP-Signal aufgezeichnet werden.

3.9 Calcium-Assay

Es sollte untersucht werden, ob in *Plasmodium falciparum* der intrazelluläre Calcium-Haushalt durch eine Überexpression von *PfSel2* erhöht wird.

Dafür wurde das GFP-Fusionsprotein der Mutante *PfSel2:c.216A>T* genutzt. Die transfizierten Parasiten wurden im mittleren Trophoziten-Stadium mit 5 μ M Indo-1/AM versetzt, die Fluoreszenz des gebundenen und ungebundenen Calcium-Indikators bei 405 nm bzw. 480 nm gemessen und die relative intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration mittels des Quotienten 405/480 ermittelt. In den Versuchen wurden neben den erythrozytären Parasiten auch „freie“ Parasiten genutzt. Aus sechs verschiedenen Versuchen zeigte sich jeweils eine leichte Erhöhung des intrazellulären Calciums in *Plasmodium falciparum*. Es konnte nicht in allen Experimenten dieses Ergebnis 100%ig verifiziert werden, aber ähnliche Tendenzen waren zu erkennen. Die höchste Calcium-Konzentration wurde nach einer 45 min Inkubationszeit mit dem Indikator in den „freien“ Parasiten gemessen. Hier wurde eine Erhöhung gegenüber den Parasiten mit dem pARL-Leervektor um 0,1 registriert. In einem weiteren Versuch, in dem die parasitierten Erythrozyten 15 min mit dem Indikator inkubiert wurden, konnte eine Erhöhung des Ratios um 0,2 – 0,3 im Vergleich zu nicht-infizierten Erythrozyten bzw. pARL-Leervektor tragenden Parasiten erzielt werden.

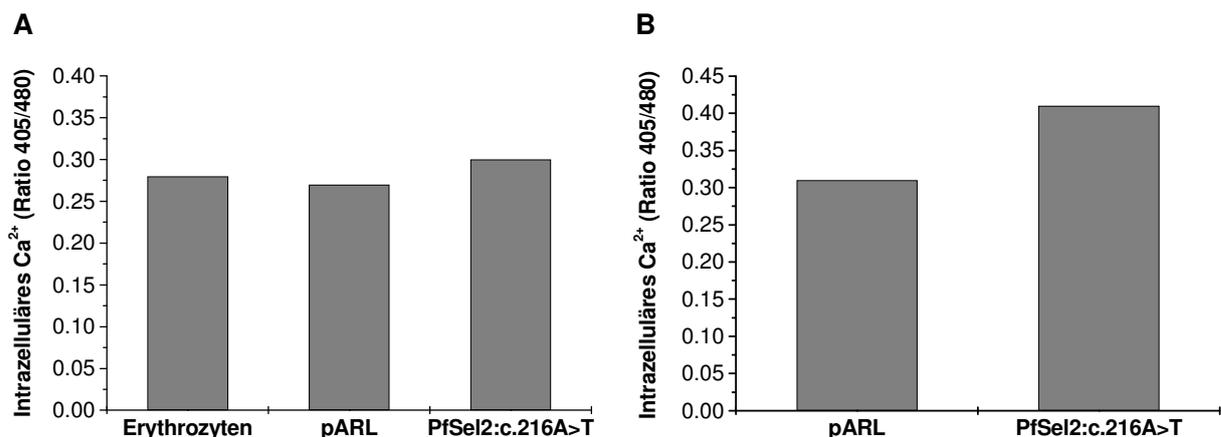


Abb. 3.15 Messung der freien intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in *P. falciparum* nach *PfSel2* Überexpression. Transfizierte Parasiten mit pARL, der die Sequenz des am C-Terminus mit GFP-getaggen *PfSel2:c.216A>T* bzw. mit dem pARL-Vektor, der nur die GFP-Sequenz enthielt, wurden angereichert. Die A) parasitierten Erythrozyten bzw. B) freien Parasiten wurden mit Indo-1/AM inkubiert, der gebundene bzw. ungebundene Indikator bei 405 bzw. 480 nm gemessen und das Verhältnis berechnet.

3.10 RT-PCR

Um die vollständige Transkription des mit GFP C-terminal getaggen *PfSel3:c.del.SECIS* Konstruktes zu kontrollieren, wurde mit verschiedenen *sense primern* und gleichbleibenden *antisense primer* PCRs durchgeführt.

Dabei konnten mit allen *sense primern*, außer mit dem *primer PfSel3s3*, der zu dem 5'-Ende der cDNA komplementär ist, PCR-Produkte in der berechneten Größe erhalten werden. Mittels des *primers PfSel3s3* konnte auch bei Veränderung der PCR-Bedingungen, wie Temperatur oder

Zyklen, keine erfolgreiche PCR durchgeführt werden.

3.11 Transkriptionsprofiling

Neben den Einfluss des Selen-Status auf die Transkription der Gene codierend für die plasmodialen Selenoproteine und einiger Proteine, die in der Sel-Biosynthese beteiligt sind, sollte auch die Transkription dieser Gene sowie einiger redox-aktiver Proteine unter oxidativem oder nitrosativem Stress analysiert werden. In verschiedenen Experimenten wurden dazu mehrere *Pf*-Kulturen mit verschiedenen Konzentrationen an Natriumselenit, 10 μ M des NO-Donors SNP, 20 μ M des oxidativen Stressors Paraquat oder 20 nM des GR-Inhibitors MB für 3 – 15 Stunden inkubiert. Die behandelten Parasiten wurden in zwei Linien geerntet, die RNA isoliert und die mRNA-Level der zu untersuchenden Gene in zwei *two step* qRT-PCRs untersucht. Die Berechnungen der relativen mRNA erfolgten für jede Behandlung unter Verwendung eines Normfaktors der besten Kontrollgene. In dieser Arbeit wird nur auf die wahr (*) angenommenen Werte eingegangen. Für alle weiteren Daten wird auf die Abbildungen Abb. 3.16 – Abb. 3.18 verwiesen.

3.11.1 Nach Natrium-Selenit-Zugabe

Nach Analyse der verschiedenen Kontrollgene mittels Normfinder und GeneNorm konnten die Arginyl- und die GlutaminyI-tRNA-Synthetase als beste Kombination an internen Standards identifiziert werden und zur weiteren Berechnung der relativen mRNA der Zielgene ein NF dieser beiden verwendet.

3.11.1.1 Selenoproteine

PfSel1:

PfSel1 war nach Zugabe der verschiedenen Selenitkonzentrationen zu keiner Zeit drastisch erhöht und schwankte um den „Normalwert“ 1 (siehe Abb. 3.16-A). Allein 15 Stunden nach Behandlung mit 1,5 μ M Natriumselenit stieg der Level der *PfSel1*-mRNA auf ein 2-faches des Normalwertes an.

PfSel2:

Durch Zugabe von 0,1 μ M Natriumselenit zu der Plasmodiumkultur konnte nach drei Stunden eine 2,5-fache Erhöhung des Transkriptionslevels gegenüber der unbehandelten Probe ermittelt werden (siehe Abb. 3.16-B). Auch nach neun Stunden stieg der Level an und erreichte 1,9. Auffällig sind die niedrigen Level, mit Werten von 0,3 – 0,5, nach einer hohen Zugabe von Natriumselenit (7 μ M) zu allen Zeitpunkten. Alle anderen Werte zeigten keine relevanten Veränderungen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

PfSel3:

Es zeigte sich eine 3-fache Erhöhung des mRNA-Levels von *PfSel3* drei Stunden nach einer Behandlung mit 0,1 μM sowie 1,5 μM Natriumselenit gegenüber den unbehandelten Proben (siehe Abb. 3.16-C). Fielen die Werte in den darauffolgenden Stunden bis auf ca. 1 ab, stiegen sie nach 15 Stunden wieder leicht an. So erhöhte sich der mRNA-Level durch 1,5 μM Se auf 1,8. Auffällig ist daneben der niedrige Wert von 0,5 durch 7 μM Se nach neun Stunden. In den weiteren Proben der Natriumselenit-Behandlungsreihe waren nur Werte in dem gesetzten Normalbereich zu messen.

PfSel4:

Es war zu erkennen, dass 15 Stunden nach einer Behandlung mit 0,1 μM bzw. 1,5 μM Natriumselenit ein um 2 – 2,5-facher Anstieg des mRNA-Levels von *PfSel4* gegenüber der unbehandelten Proben vorliegt (siehe Abb. 3.16-D). Sechs Stunden nach der Zugabe der beiden Substanzkonzentrationen war ebenfalls eine Erhöhung von dem 1,8- und 2,3-fachen zu messen. Eine 7 μM hohe Natriumselenitkonzentration ergab im 3-Stunden-Wert einen um 1,8-fach erhöhten mRNA-Spiegel des *PfSel4*-Gens. Alle anderen Proben aus den Behandlungsreihen ließen nur schwache bis keine Erhöhung des mRNA-Levels erkennen.

3.11.1.2 Faktoren, die an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligt sind

PfSPS:

Nach einer Zugabe von 0,1 μM Natriumselenit zu der Plasmodienkultur konnte drei Stunden nach Behandlungsbeginn eine 3-fache Erhöhung des mRNA-Levels von *PfSPS* gemessen werden. Auch 6, 12 und 15 Stunden nach dieser Behandlung konnte ein bis zu 1,8-facher Anstieg der *PfSPS*-mRNA gefunden werden. Nur nach neun Stunden wurde ein Wert im gesetzten Normalbereich gemessen. Bei einer Konzentration von 1,5 μM an Natriumselenit wurde drei Stunden nach Behandlungsbeginn eine 2,5-fache Anhebung der mRNA-Konzentration an *PfSPS* verzeichnet.

Auffällig ist die Abnahme des relativen mRNA-Levels auf das 0,4-fache gegenüber den Kontrollen nach neun Stunden unter einer Behandlung mit 7 μM Natriumselenit ab. Die weiteren Werte dieser Behandlungsreihe befinden sich im gesetzten Normal-Bereich.

PfRNA^{ser[sec]}:

Nach 12 und 15 Stunden mit einer Behandlung von 1,5 μM Natriumselenit der Parasiten steigt der mRNA-Level von *PfRNA^{ser[sec]}* auf das 1,9 bzw. 2,6 gegenüber der Kontrolle. Zwischen 2,1 – 2,7-fache Erhöhung des mRNA-Niveaus konnte bei 7 μM Se nach 3, 6, 12 und 15 Stunden gemessen werden.

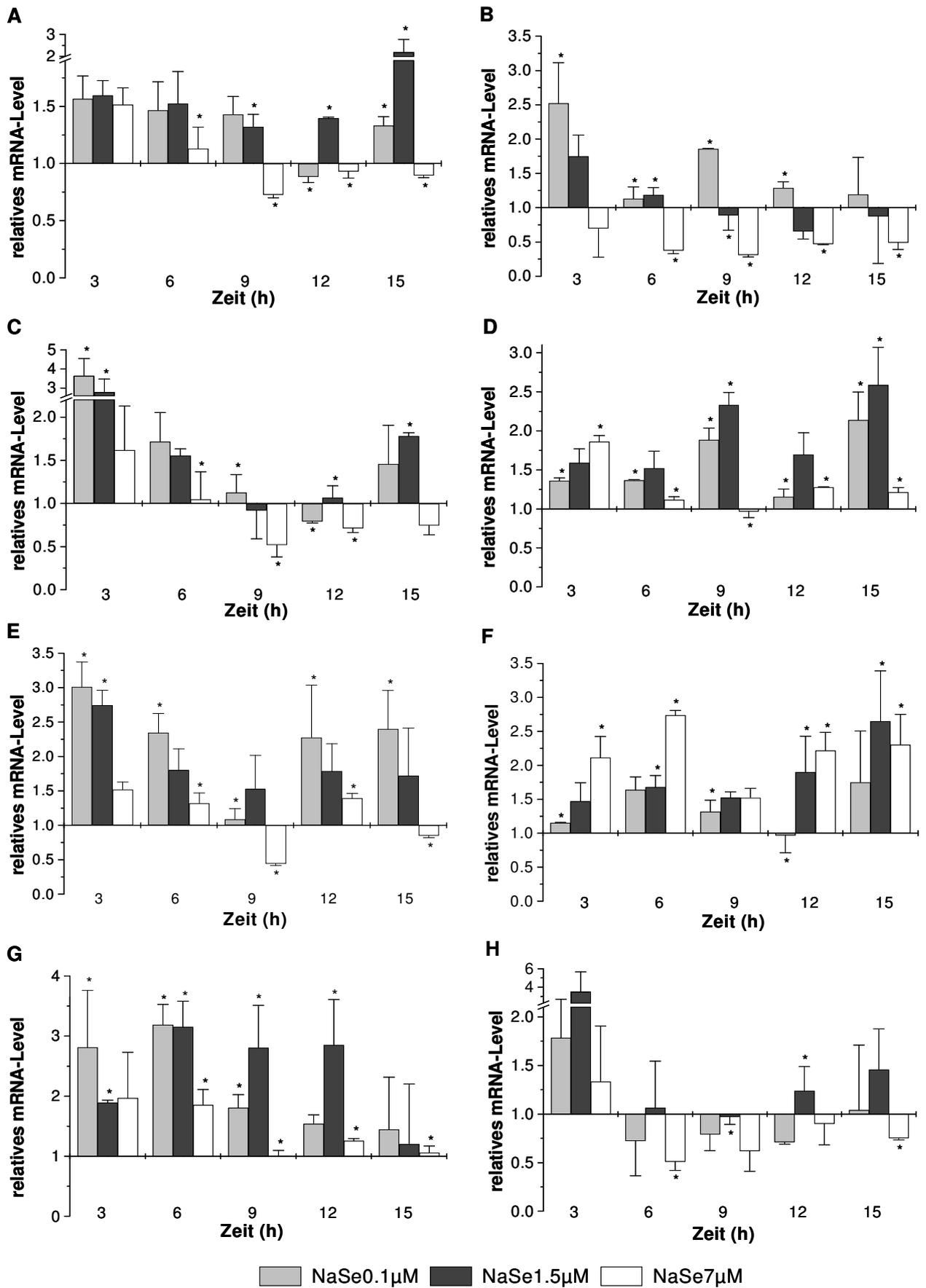


Abb. 3.16 Transkriptionsprofilung plasmodialer Selenoproteine nach Zugabe von Natriumselenit. *Pf.*-Kulturen wurden mit 0,1 μM, 1,5 μM bzw. 7 μM an Natriumselenit versetzt und 3 – 15 Stunden inkubiert. Die mRNA wurde isoliert und die spezifischen Level mittels *two step* qRT-PCR in Triplicaten in zwei

Experimenten gemessen. Die Transkriptlevel wurden nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach PFAFFL berechnet. Für die Normalisierung diente ein Normfaktor aus den Referenzgenen *gtRNAsyn* und *atRNAsyn*. Die Transkriptlevel der einzelnen Zielgene sind vom Selenstatus abhängig. A) *PfSel1*, B) *PfSel2*, C) *PfSel3*, D) *PfSel4*, E) *PfSPS*, F) *PfRNA^{ser[sec]}*, G) *PfEFSec* und H) *PfSBP2*.

PfEFSec:

Ein 2,8- und 3,2-facher Anstieg des mRNA-Ebene des *PfEFSec*-Gens konnte durch eine Behandlung der *Pf*-Kultur mit 0,1 μM Natriumselenit nach drei bzw. sechs Stunden erkannt werden. Auch nach neun Stunden ist der mRNA-Level auf 1,8 erhöht. Durch Zugabe von 1,5 μM Natriumselenit steigt das mRNA-Niveau anfangs auf 1,9 und erreicht nach drei, sechs und neun Stunden Werte von 3,2, 2,8 bzw. 2,9. In der Behandlungsreihe mit 7 μM Natriumselenit ist ein Anstieg des mRNA-Levels auf das 1,9-fache der Kontrolle sechs Stunden nach Behandlungsbeginn erkennbar. In den darauffolgenden Stunden liegen die Werte um 1.

PfSBP2:

Der Datensatz des Transkriptionsprofils des *PfSBP2*-Gens nach Natriumselenitzuschluss zur *Pf*-Kultur zeigt zwischen den beiden durchgeführten qRT-PCRs große Abweichungen. So fällt der 3-Stunden-Wert nach 1,5 μM Se in die „Nicht-wahre“-Kategorie. Auffällig ist der niedrige Wert von 0,6 durch 7 μM Se nach sechs Stunden. Alle anderen Werte schwankten um den Wert 1.

3.11.2 Nach SNP-, MB- und Paraquat-Zugabe

Als beste Kombination der Kontrollgene für die MB-behandelten Proben konnten LDH und *gtRNAsyn* identifiziert werden. Nach einer Supplementation der Plasmodien-Kultur mit Paraquat bzw. SNP konnten die 18s rRNA und *stRNAsyn* als beste Kombination für einen Normfaktor für die weiteren Analysen der Zielgene bestimmt werden.

Im Allgemeinen veränderte sich der mRNA-Level der einzelnen Zielgene nicht durch die Supplementation mit MB oder P. Wenn nicht anders beschrieben schwankten hier die Werte zwischen 0,7 und 1,5 innerhalb der gestellten Kategorie „Normal“.

3.11.2.1 Selenoproteine

PfSel1:

Auffällig sind die niedrigen Werte von 0,4 und 0,5 durch 0,1 μM und 1,5 μM Se jeweils nach neun Stunden.

PfSel2:

Die relativen mRNA-Level für *PfSel2* nach SNP- und P-Supplementation konnten in dieser Arbeit nur in einer qRT-PCR ermittelt werden und sind daher nicht mit einer zweiten Reihe verifiziert. Diese Werte besitzen demzufolge eine schwache Aussagekraft. Auffällig sind trotzdem die

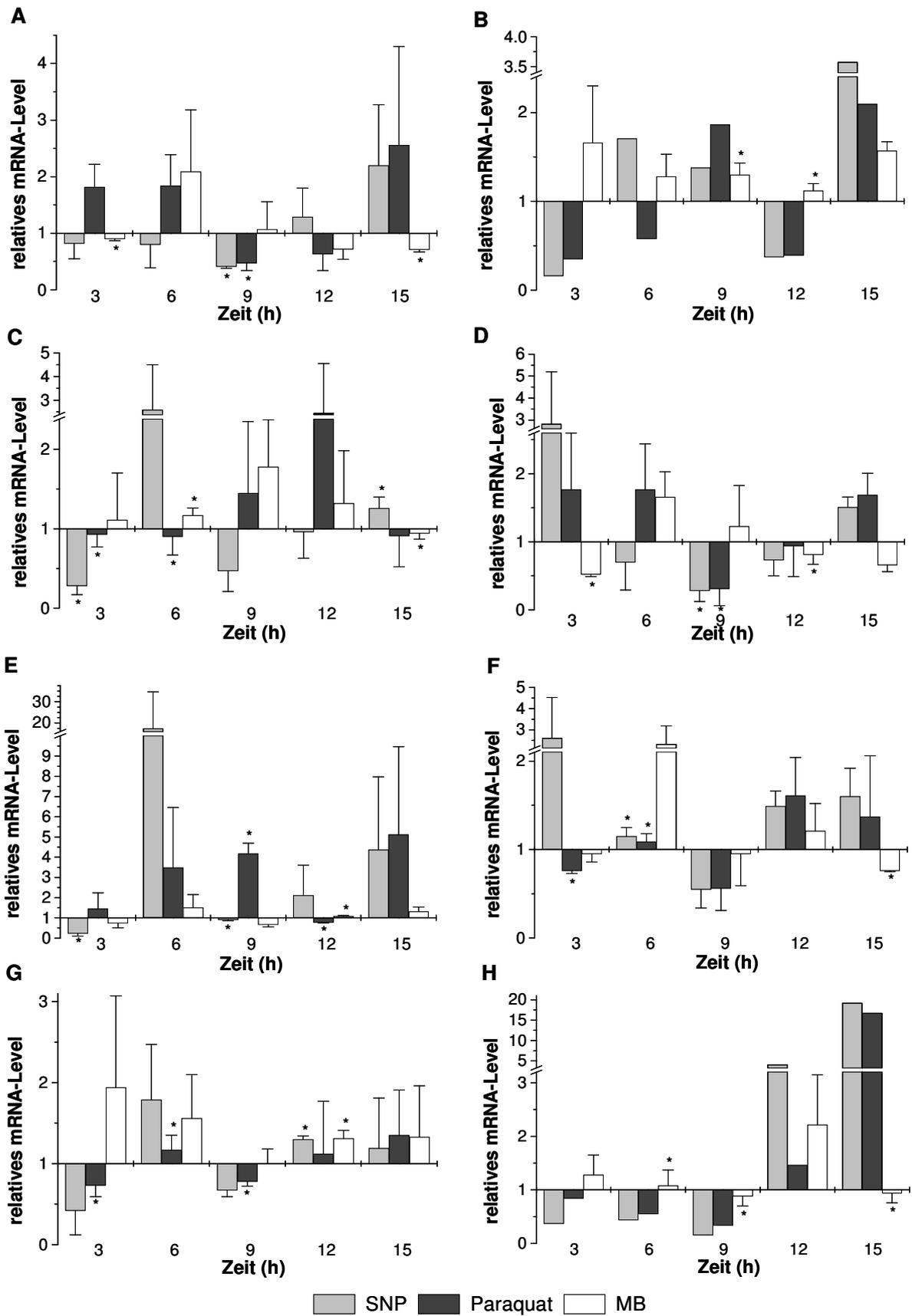


Abb. 3.17 Transkriptionsprofiling plasmodialer Selenoproteine und Faktoren, die an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligt sind, nach Zugabe von SNP, Paraquat und Methylenblau. *Pf.* Kulturen wurden mit 10 μ M SNP, 20 μ M Paraquat bzw. 10 nM Methylenblau versetzt und 3-15 Stunden inkubiert. Die mRNA wurde isoliert und die spezifischen Level mittels *two step* qRT-PCR in Triplicaten in

zwei Experimenten gemessen. Die Transkriptlevel wurden nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach PFAFFL berechnet. Für die Normalisierung diente ein Normfaktor aus den Referenzgenen 18s rRNA und stRNA_{syn}. Die Transkriptlevel der einzelnen Zielgene sind von nitrosativen Stress unterschiedlich beeinflusst. A) *PfSel1*, B) *PfSel2*, C) *PfSel3*, D) *PfSel4*, E) *PfSPS*, F) *PfRNA^{ser[sec]}*, G) *PfEFSec* und H) *PfSBP2*.

niedrigen Werte von 0,2 (SNP) und 0,4 (P) nach drei Stunden sowie die hohen Werte von 3,6 und 2,1 nach 15 Stunden.

PfSel3:

Durch SNP-Supplementation konnte nach drei Stunden das 0,3-fache der Kontrolle gemessen werden.

PfSel4:

Die qRT-PCR-Daten nach der MB-Behandlung zeigen eine Abnahme der mRNA-Konzentration von *PfSel4* nach drei Stunden durch das MB. Hier liegt der Wert auf dem 0,5-fachen der Kontrollen. Daneben sind auch niedrige Werte von jeweils 0,3 neun Stunden nach SNP- und P-Supplementation zu erkennen.

3.11.2.2 Faktoren, die an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligt sind

PfSPS:

Durch SNP-Ergänzung wurde das 0,2-fache der Kontrollen nach drei Stunden gemessen. Hingegen steigt der relative mRNA-Level neun Stunden nach P-Supplementation auf 4,2.

PfRNA^{ser[sec]}:

Nach einer Zugabe von SNP, P bzw. MB zu *Pf*-Kulturen wurden in allen genommenen Proben keine relevanten Veränderungen, bezogen auf den gesetzten „Normal“-Bereich, ermittelt werden.

PfEFSec:

Durch SNP-, P- bzw. MB-Supplementation der *Pf*-Kulturen konnten keine relevanten Veränderungen gegenüber dem „Normal“-Bereich der mRNA-Konzentration gemessen werden.

PfSBP2:

Die relativen mRNA-Level für *PfSBP2* nach SNP- und P-Supplementation konnten in dieser Arbeit nur in einer qRT-PCR ermittelt werden und sind daher nicht mit einer zweiten Reihe verifiziert. Diese Werte besitzen demzufolge eine schwache Aussagekraft. Auffällig sind trotzdem die niedrigen Werte von 0,4 – 0,1 drei bis neun Stunden nach Zugabe von SNP bzw. 0,4 und 0,3 sechs und neun Stunden nach P-Ergänzung der *Pf*-Kulturen. Die Werte erhöhen sich stark nach 15 Stunden auf 16,7 durch P und 19,2 nach SNP bzw. 12 Stunden nach SNP auf 4,1.

3.11.2.3 Redox-aktive plasmodiale Proteine

Pf1cys:

Durch SNP beträgt der mRNA-Level von *Pf1cys* nach neun Stunden 0,3, nach 15 Stunden hingegen 2,0.

PfAOP:

Nach SNP-Supplementation der *Pf*-Kulturen wurden nach drei Stunden das 0,5-fache bzw. nach 12 und 15 Stunden das 2,5- und 10,9-fache der Kontrollen gemessen. Auch durch Ergänzung der *Pf*-Kulturen mit P erhöhte sich der mRNA-Level nach sechs Stunden auf 2,3.

PfGrx:

Aus dem Datensatz der SNP-behandelten Parasiten ist ein Anstieg des normalisierten relativen mRNA-Levels von *PfGrx* auf 4,5 nach 15 Stunden zu erkennen.

PfTPx1:

Die relativen mRNA-Level für *PfTPx1* betragen nach SNP- bzw. P-Supplementation jeweils 0,5 nach neun Stunden.

PfTPxGl:

Ähnlich *PfTPx1* wurden niedrige Werte von 0,4 bzw. 0,3 neun Stunden nach SNP- bzw. P-Ergänzung der Kulturen ermittelt. Durch SNP konnte nach 15 Stunden zudem noch eine Erhöhung auf das 2,3-fache der Kontrollen gemessen werden.

PfTrx1:

Auch für die mRNA-Level von *PfTrx1* konnten niedrige Werte von 0,3 bzw. 0,6 nach neun Stunden in den Behandlungsreihen SNP und P gemessen werden. Nach 15 Stunden SNP-Behandlung steigt der Level jedoch auf 1,6.

PfTrxR:

In der SNP-Datenreihe ist zu erkennen, dass der relative mRNA-Level von *PfTrxR* nach 12 Stunden auf 0,6 sinkt und nach 15 Stunden auf 4 steigt.

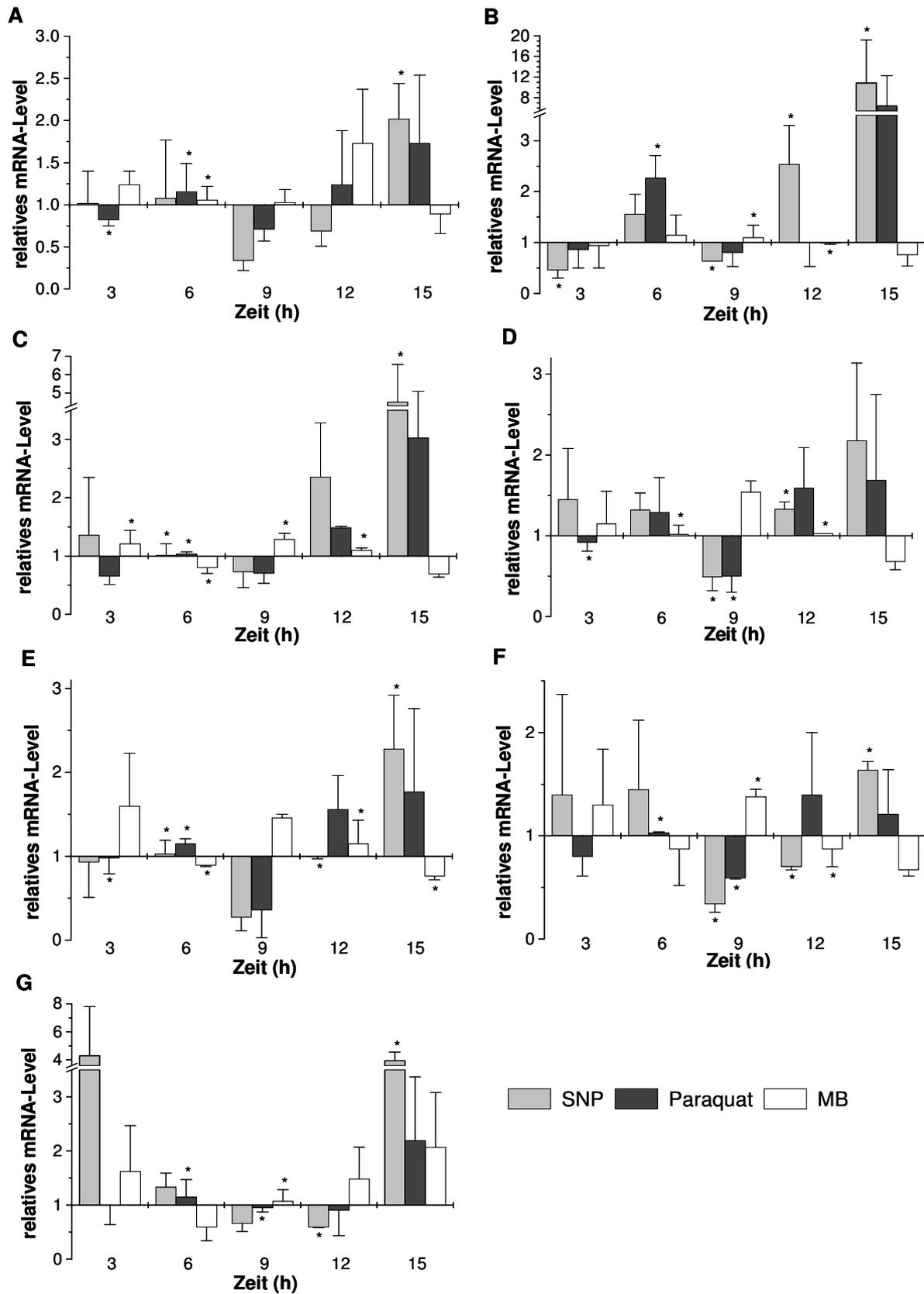


Abb. 3.18 Transkriptionsprofilung plasmodialer redox-aktiver Proteine nach Zugabe von SNP, Paraquat und Methylenblau. *Pf*-Kulturen wurden mit 10 μ M SNP, 20 μ M Paraquat bzw. 10 nM Methylenblau versetzt und 3-15 Stunden inkubiert. Die mRNA wurde isoliert und die spezifischen Level mittels *two step* qRT-PCR in Triplicaten in zwei Experimenten gemessen. Die Transkriptlevel wurden nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode nach PFAFFL berechnet. Für die Normalisierung diente ein Normfaktor aus den Referenzgenen 18s rRNA und stRNAsyn. Die Transkriptlevel der einzelnen Zielgene sind von nitrosativem

Stress unterschiedlich beeinflusst. A) *Pf1cys*, B) *PfAOP*, C) *PfGrx*, D) *PfTPx1*, E) *PfTPxGl*, F) *PfTrx1*, G) *PfTrxR*.

3.12 Morphologische Untersuchungen

Um den Effekt des Zusatzes verschiedenster Substanzen zu der *Pf*-Kultur morphologisch aufzuzeichnen, wurde zu jeder Probenentnahme auch ein Ausstrich der Kultur auf Glasobjektträger vorgenommen und die einzelnen plasmodialen Lebensstadien ausgezählt.

Es wurde aus der Behandlungsreihe mit Natriumselenit ersichtlich, dass 7 μM Se schon nach neun Stunden Inkubation 7,7% pyknotische Zellen hervorruft. Rund 7% der Parasiten gegenüber der Kontrolle verweilten länger im Ringstadium. Nach sechs weiteren Stunden war eine weitere Verschiebung des Lebenszyklus durch 7 μM Natriumselenit zu erkennen. Es gab auf 100% Parasitämie bezogen 4% mehr Parasiten im Schizontenstadium, fast 20% weniger Parasiten im Trophozitenstadium und 10% weniger Ringe in der 7 μM Natriumselenit-Reihe als in der Kontrolle. Hingegen formten 23% der Parasiten in dieser hochkonzentrierten Natriumselenitreihe pyknotische Zellen. Zwischen der Kontrollreihe und der mit 0,1 μM Se versetzten *Plasmodium*-Kultur wurde ein Unterschied in der Ring- und Trophoziten-Phase gemessen. So gab es nach 15 Stunden in der Kontrolle rund 9% mehr Ringe als in der behandelten Reihe. So befanden sich 80% der Parasiten in der behandelten Reihe zu diesem Zeitpunkt im Trophozitenstadium und 71% der Kontrolle.

In der SNP-behandelten Parasitenreihe konnten, wie schon in der 7 μM Natriumselenit-Reihe nach 15 Stunden rund 20% pyknotische Zellen ausgezählt werden. Im Vergleich gab es in den mit Paraquat und SNP behandelten *Plasmodium*-Kulturen 15% – 21% weniger Schizonten als in der Kontrolle nach Beenden des Experimentes. Hingegen zählten die Trophoziten in den beiden Behandlungen nach 15 Stunden 23% (P) bzw. 8% (SNP) mehr als in der Kontrolle.

In der Methylenblau-Behandlungsreihe entwickelten sich die Parasiten über die 15 Stunden ähnlich der Kontrolle.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bisher relativ unbekanntenen plasmodialen Selenoproteine, die potenzielle *drug targets* sind, genauer untersucht. Dabei wurden bioinformatische Analysen, Transkriptom- und Lokalisationsstudien sowie proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt. Durch diese Arbeit wurden richtungsweisende Daten auf die Funktion der vier Selenoprotein in *Plasmodium falciparum* gewonnen.

4.1 PfSel1 als ein SelK-Homologon

Durch BLAST-Analysen konnten für PfSel1 keine homologen Proteine außerhalb der Plasmodien-Spezies gefunden werden [93]. Dies deutete auf eine völlig neue Art von Selenoproteinen hin. Manuelle Sequenzalignments von PfSel1 mit humanen Selenoproteinen deckten jedoch eine gute Übereinstimmung mit 51% Ähnlichkeit zu hSelK auf. In beiden Proteinsequenzen ist Sec am C-Term in Kombination mit Glycin organisiert. Die Insertion an der AS-Position 18 – 46 von PfSel1 gegenüber hSelK verhindert ein automatisches Auffinden homologer Sequenzen durch BLAST. Durch Deletion dieser 30 Aminosäuren und eine darauffolgende BLAST-Suche konnte tatsächlich hSelK mit einem zwar schwachen e-Wert von 7,6, aber mit 50% positiven und 27% identischen Aminosäuren gefunden werden. Auch weiterführende Alignments mit SelK-Homologen verschiedener Organismen zeigten stets gute Übereinstimmungen. So besitzt PfSel1 60% Ähnlichkeit mit dem vor kurzem identifizierten SelK-Homologon aus *Toxoplasma gondii* [135]. Hier ist auch die AS-Sequenz in PfSel1 an Position 18 – 46 vorhanden. Jedoch ist wiederum am N-Term von TgSelK eine Sequenz-Verlängerung, die nicht zu PfSel1 homolog ist. Auch zu den SelK ähnlichen Proteinen aus der Klasse Kinetoplastida mit Trypanosomen und Leishmanien [136] wurden sehr gute Deckungen aufgezeigt. Bei allen untersuchten Parasiten-SelK's ist das Sec in einem CxxxxUG- bzw. CxxxUG-Motiv organisiert. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass PfSel1 ein SelK-Homologon ist.

Auch weitere Analysen deuteten auf eine Ähnlichkeit von PfSel1 zu SelK-Sequenzen hin. So besitzt PfSel1, wie hSelK oder Kinetoplastida SelK [135], eine mögliche TD, durch die das Protein in der Membran-Topologie in den Typ 2 eingordnet wird. Durch einen Vergleich dieser TDs konnte gezeigt werden, dass diese Motive an den gleichen Positionen in den Proteinen liegen.

Durch phylogenetische Untersuchungen konnte eine Zusammenlagerung von SelK von *Toxoplasma gondii* mit allen untersuchten plasmodialen Sel1-Homologen aufgefunden werden. Da *T. gondii* ebenfalls zu dem Phylum Apicomplexa zählt, formt dieses Cluster eine „Apicomplexa-SelK-Familie“. Daneben ist diese Familie den Kinetoplastida SelK-Proteinen ähnlich und beide bilden so zusammen eine „Protozoen-Familie“. Dies indiziert eine Entwicklung dieser SelK aus einem gemeinsamen Ursprung. Für die SelK der Protozoen sind zur Zeit noch keine weiteren Informationen vorhanden. Daher werden die neu gewonnenen Daten zu PfSel1 dieser vorliegenden

Arbeit im weiteren Verlauf mit den SelK der Säugetiere verglichen.

Auch die subzelluläre Lokalisationsstudie von *PfSel1* unterstützt die Annahme, *PfSel1* sei ein SelK-Homologon. Durch Fusion des GFP-Gens an das C-Terminale Ende der cDNA von *PfSel1:c.345A>T* konnte *in vivo* an *Plasmodium falciparum* eine ER-Lokalisation ermittelt werden. Auch hSelK ist im ER nachgewiesen [141], wobei daneben auch in einer anderen Studie hSelK in der Plasmamembran dokumentiert wurde [142]. Zu beachten ist, dass es sich um die Lokalisation einer Sec>Cys-Mutante handelt. Wobei Sec in *PfSel1* als vorletzte AS am C-Term organisiert ist und es somit wahrscheinlich keine Auswirkungen auf die Lokalisation haben wird, da sich SP's meistens am N-Term befinden. Das Fehlen der Expression von *PfSel1:c.del.SECIS* zeigt, dass das *in frame*-TGA in *PfSel1* nicht für eine andere AS codiert, wie es in einigen Studien für andere Selenoproteine gezeigt werden konnte [75, 77, 143]. Weitere Analysen mit N-terminal GFP-getaggten *PfSel1*-Varianten sowie mit dem SECIS-Element für eine Expression der Sec-haltigen Variante, sollten zur einer Verifizierung des Ergebnisses durchgeführt werden.

Durch die heterologe Überexpression von *PfSel1:p115u>c* in *E. coli* konnten mit den gewonnenen rekombinanten Proteinen weitere Analysen vollzogen werden. Jedoch stellte die Überexpression im Prokaryoten eine große Herausforderung dar. Durch verschiedenste Expressionsvektoren, Hilfsvektoren, *E. coli*-Stämme und Kulturbedingungen konnten die Erträge zwar verbessert werden, blieben aber immer noch weit unter einem gut nutzbaren Ergebnis. Daneben stellten der nicht optimale Reinheitsgrad, viele Abbruchprodukte und Schwankungen in der exprimierten Menge an *PfSel1* durch *E. coli* weitere Probleme dar. So schwankte, trotz stets gleicher Kulturbedingungen, die Ausbeute zwischen 0,1 mg/l Kultur bzw. 1 mg/l Kultur [111]. Weitere Aufreinigungen von *PfSel1* durch Gelchromatographie nach der Affinitätschromatographie konnten keine Verbesserungen erzielen. Hier wurde ein großer Verlust von bis zu 40% an Protein festgestellt. Diese Schwierigkeiten können mit der hydrophoben Region der TD zusammenhängen. Es ist bekannt, dass stark Membran-lokalisierte Proteine toxisch für bakterielle Zellen sind [144, 145]. So kann es zur Zellyse und Wachstumsstopp während der heterologen Überexpression kommen. Diese hydrophoben Regionen der wachsenden Peptidkette während der Translation können sich zusammenlagern und aggregierte Zustände, z. B. *inclusion bodies*, formen. Diese sind wiederum schwer zu trennen und lassen sich somit schlecht aufreinigen. Die Aufreinigung von *inclusion bodies* erfordert von den gängigen Methoden andere kosten- und zeitaufwändigere Prozesse [146].

Trotz geringer Mengen und einem Reinheitsgrad von geschätzten 70% wurden weiterführende Experimente mit dem rekombinanten *PfSel1:p.115u>c* (*rPfSel1*) durchgeführt. So zeigten Oligomerisierungsstudien mittels Gelfiltrationschromatographie eine mögliche Multimerisierung von *PfSel1*, hingegen konnten durch Quervernetzungsexperimente mit DMA nur Monomere determiniert werden [111]. Aufgrund von Unregelmäßigkeiten bei der Gelfiltration, durch die es erschwert war ein genaues Molekulargewicht von *PfSel1* zu bestimmen, wird in dieser Arbeit den

Quervernetzungsexperimenten ein größerer Stellenwert zugerechnet. Für weitere Daten und Analysen dieser Versuche wird auf die Masterarbeit von NICOLE RONZHEIMER [111] verwiesen.

Daneben wurden mit *rPfSel1 pull-down*-Analysen mittels des PolyHis-Tags durchgeführt [111]. Hier zeigten sich im Vergleich zu den Kontrollen in Coomassie-gefärbten Gelen drei mögliche Interaktionspartner. Zwei von ihnen sind mit einem ungefähren Molekulargewicht von 40 kDa die größten Bindungspartner. Viel kleiner, jedoch aber auch sehr stark auftretend ist ein gefangenes Protein mit einem MG < 14,4 kDa. Bei der Stärke dieser gefärbten Proteinbande könnte es sich aber auch um mehrere Proteine anstatt um eins handeln. Da sich die Ergebnisse in mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten wiederholten, werden sie als aussagekräftig angenommen. In dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, die Bindungspartner zu identifizieren. Somit ist in zukünftigen Experimenten die Identifizierung dieser Proteine ein Hauptaugenmerk. Für weitere *pull-down*-Analysen sollte die Expression und Reinigung des Proteins optimiert werden.

Erste Assays zur Illuminierung einer möglichen Redoxfunktion von *PfSel1* wurden durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine Aktivität im Insulin-Assay, bei dem die Reduktion der Disulfide des Insulins durch das untersuchte Protein demonstriert werden kann [119]. Es ist daher anzunehmen, dass *PfSel1* keine reduzierende Wirkung besitzt. Hingegen konnte im Vergleich zu den Kontrollen *PfSel1* in einem weiteren Assay die GS vor oxidativem Stress schützen. Dabei erhielt die GS eine Aktivität in einem Ausmaß ähnlich der durch EDTA. In Anbetracht der Sec>Cys-Mutation, bei dem ein Aktivitätsverlust von bis zu 90% in anderen Selenoproteinen festgestellt wurde [147-149], deutet dieser *Protection*-Assay auf eine mögliche Redoxfunktion des *PfSel1* hin. Im Hinblick auf die Gemeinsamkeiten von *PfSel1* zu hSelK ist auch dieses Ergebnis unterstützend. Auch eine Überexpression von hSelK in Cardiomyozyten schützte die Zellen vor den Effekten von ROS [141]. Für genauere Assays sollte jedoch die heterologe Überexpression sowie Reinigung von *PfSel1* weiterhin optimiert werden, so dass das rekombinante Protein sauber vorliegt und dadurch genauere Aussagen bezüglich der Aktivität getroffen werden können.

Weiteren Aufschluss über eine mögliche Rolle in der Abwehr von ROS, aber auch RNS und anderen Stressarten, konnte durch qRT-PCR-Experimente erhalten werden. Hierbei zeigte sich, dass weder Methylenblau noch Paraquat oder SNP Einfluss auf die Transkriptmenge von *PfSel1* haben. Dies ist nicht verwunderlich, wurden doch für *Plasmodium falciparum* nur wenige Veränderungen des Transkriptoms durch externe Stimuli beobachtet und eher die post-transkriptionalen und post-translationalen Modifikationen für wichtig erklärt [150]. Jedoch konnte, in der vorliegenden Arbeit, ein Effekt des Selenstatus auf die mRNA-Ebene von *PfSel1* ermittelt werden. Durch eine Zugabe von 1,5 µM Natriumselenit in das Zellkulturmedium stieg die mRNA-Konzentration auf das 2,2-fache gegenüber der Kontrolle im Schizontenstadium, 15 Stunden nach Beginn des Experimentes, an. In früheren Arbeiten deuteten LOBANOV *et al.* [93] auf die höchste Expression von *PfSel1* während des Schizontenstadiums. Im Allgemeinen lag der mRNA-Level, während der gesamten untersuchten Zeitpunkte, nach 0,1 µM und 1,5 µM Se-Zugabe leicht erhöht

vor. Die qRT-PCR-Reihe lassen somit vermuten, dass die *pfse1*-Genexpression bei Selenverfügbarkeit während des gesamten Lebenszyklus und im Besonderen im Schizontenstadium induziert wird. Es wäre aber auch möglich, dass die mRNA-Halbwertszeit von *PfSel1* durch Selen erhöht wird, wie es bei *hSelW* und *hTrxR* entdeckt wurde [151, 152]. Eine ähnliche Induktion der Genexpression im Schizontenstadium, durch leichte Erhöhung der Selenverfügbarkeit, ist auch bei *PfSel4* zu sehen. Im Gegensatz werden *PfSel2* und *PfSel3* während des Schizontenstadiums durch Erhöhung der Se-Konzentration nicht so stark exprimiert. Dies legt eine hierarchische Regulation der Genexpression unter Selenverfügbarkeit nahe. Für die Selenoproteine der Säugetiere wurde eine hierarchische Genexpression durch SCHOMBURG *et al.* diskutiert [73].

Die qRT-Daten zeigen einen geringen bis gar keinen Einfluss von externen Stress-Stimuli auf den *PfSel1*-mRNA-Level. Die Transkription bietet damit nur einen geringen Angriffspunkt während oxidativen oder nitrosativen Stresses sowie durch Veränderung des Selenstatus. Dies lässt auf mögliche posttranskriptionale bzw. -translationale Modifikationen schließen. Leider konnte ein Einfluss der Stimuli auf der Proteinebene nicht nachgewiesen werden, da keine spezifischen Antikörper gegen *PfSel1* verfügbar waren. Die Herstellung von einem spezifischen Peptidantikörper in früheren Arbeiten sowohl als auch die Produktion von Antikörpern gegen das *rPfSel1:p.115u>c* in dieser Arbeit verfehlten eine zufriedenstellende Spezifität.

Insgesamt konnten durch die vorliegende Arbeit viele neue Aspekte zu *PfSel1* gewonnen werden. Die einzelnen Daten weisen auf die Verwandtschaft zu dem Selenoprotein K hin. Auch über dieses Protein ist bis jetzt wenig bekannt. Somit liefert die Arbeit möglicherweise gleichzeitig neue Erkenntnisse über SelK.

4.2 *PfSel2* als ein SelT-Homologon

Für *PfSel2* konnten *via* BLAST keine homologen Proteine außerhalb der Plasmodien gefunden werden [93]. Jedoch zeigte sich, ähnlich *PfSel1*, durch manuelle Alignments mit humanen Selenoproteinen eine gute Übereinstimmung von 52,8% zu *hSelT*. In beiden Sequenzen ist das Sec in einem CxSU-Motiv am N-Term organisiert. In der *PfSel2*-Sequenz befinden sich, im Vergleich zu *hSelT*, einige extra eingefügte Aminosäuren. Interessanterweise wurde nach einem Deletieren einer dieser Insertionen und einem darauffolgenden BLAST eine homologe Sequenz zu dem SelT/W/H *domain containing protein* des Ciliaten *T. thermophila* gefunden. Das somatische Genom von *T. thermophila* ist komplett sequenziert [153]. In einer neuen Studie wurden sechs Gene, codierend für Selenoproteine, darunter zwei Varianten von GPx, drei Varianten von TrxR und eine von SPS2, für *T. thermophila* reannotiert [154]. Drei Gene wurden durch Strukturähnlichkeiten zu SelO, und jeweils eine weitere Variante zu GPx und TrxR gefunden, die aber kein Sec beinhalten. Die Ähnlichkeiten zu anderen Selenoproteinen wurden erst nach manuellen Alignments gefunden. Durch BLAST konnten COYNE *et al.* keine homologen Sequenzen

zu *Plasmodium falciparum* entdecken, sie nutzten hier unglücklicherweise aber auch nicht die manuellen Alignments. In der Sequenz des SelT/W/H domain containing protein ist kein Sec enthalten. Überdeckend mit der AS-Position von Sec in PfSel2 ist in der Sequenz von *T. thermophila* ein Histidin. Die Umgebung der Aminosäuren ist aber in beiden Sequenzen stark ähnlich mit CxSU(/H)Q. Weitere Alignments mit SelT Sequenzen unterschiedlicher Organismen, zeigten stets eine gute Übereinstimmung mit PfSel2. Dabei ist jeweils das Sec in dem CxxU-Motiv am N-Term angeordnet. In einigen Spezies, wie *A. thaliana* oder *C. elegans*, ist das Sec jedoch durch Cys ersetzt. Der Austausch von Sec mit beiden AS wurde in verschiedenen Arbeiten diskutiert [155]. Die Sequenzähnlichkeit von PfSel2 zu SelT nimmt besonders downstream des Sec's zu. Alle SelT-Proteine besitzen in dieser Region die Rdx/SelT-Domäne. Datenbanken, wie MyHits, konnten bei PfSel2 diese Domäne jedoch nicht auffinden. Eventuell behindert der starke Austausch der Aminosäuren zu semi-konservierten nicht nur die BLAST-, sondern auch die Domänen-Suche.

Auch weitere Analysen deuten auf die Ähnlichkeit von PfSel2 zu SelT hin. PfSel2 besitzt, wie die Säugetier-SelT [139], eine vorhergesagte TD. Diese liegen in den Sequenzen stets in der gleichen Region. Im Endeffekt sind 90% aller tierischen Proteine, die als Typ 3a bezeichnet wurden, Plasmamembran-Proteine [156]. Eine Analyse mittels ProtScale zeigt auch die sehr ähnliche Verteilung der Hydrophobizität in PfSel2 im Vergleich zu der Säugetier-SelT [139]. In beiden Fällen sind zwei Regionen besonders starker Hydrophobizität zu finden: 1.) am N-Term, welche wahrscheinlich als ein Signalpeptid fungiert und 2.) in der Mitte der Sequenzen, bei PfSel2 an Position 114 – 141, welches die mögliche TD widerspiegelt.

Phylogenetische Untersuchungen einiger SelT-Sequenzen mit PfSel2 wiesen einen Cluster von Alveolata-SelT's auf. In dieser Gruppe sind die Sequenzen von *T. thermophila*, *N. caninum* und *T. gondii* [135] sehr ähnlich. Innerhalb der „Alveolata-SelT-Familie“ stehen sich PfSel2 und TtSelT sowie TgSelT und NcSelT besonders nahe. Diese Untersuchung legt nahe, dass sich die Alveolata-SelT aus einem gleichen Ursprung entwickelt haben und zeigt damit auch die hohe Wahrscheinlichkeit, dass PfSel2 ein SelT-Homologon ist.

Eine weitere Gemeinsamkeit von PfSel2 und SelT ist die Lokalisation in dem ER. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels GFP-Fusionsproteinen gezeigt, dass PfSel2:p.72u>c in dem ER anzutreffen ist. Auch SelT wurde als ein ER-Protein identifiziert [139]. Ein weiteres GFP-Konstrukt mit dem *in frame*-TGA-Codon an der Position 214 – 216, bei dem aber das SECIS-Element fehlte, zeigte interessanterweise ebenfalls, wenn auch wenn sehr schwach über dem Hintergrundrauschen, ein GFP-Signal. Da diese Mutante Sec nicht einbauen kann, führt dieses Ergebnis zu der Annahme, dass hier das TGA noch als ein weiteres Signal neben Stopp oder Sec fungiert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass TGA auch für Trp oder Cys codieren kann [75, 77, 143]. So kann eine gerichtete Mutagenese an der TGA-Position von TGA>TGT oder TGA>TGG eine Aussage über die Lokalisation dieser beiden Varianten bringen.

Zu einer vollständigen Aufklärung dieser Möglichkeiten werden aber noch weitere Experimente gebraucht. So sollte in einer Variante GFP an den N-Term von *PfSel2* kloniert werden, um den Einfluss von GFP auf die Lokalisation auszuschließen. Weiterhin könnte in einem Konstrukt die gesamte cDNA von *PfSel2* einschließlich des SECIS-Elementes hinter GFP kloniert werden. Eine Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen *PfSel2* wäre eine der aussagekräftigsten Lokalisationsstudien. Jedoch ist durch die geringe Ausbeute und dem niedrigen Reinheitsgrad nach einer heterologen Überexpression in *E. coli* bisher keine Möglichkeit gegeben, spezifische Antikörper zu produzieren. Die Synthese von *PfSel2* ohne SECIS-Element, jedoch mit einem *in frame*-TGA in *P. falciparum*, *in vivo* könnte auf eine Regulation der Genexpression deuten. Vorstellbar wäre diese Regulation des Sec-Einbaus, um in Zeiten von niedrigen Selenkonzentrationen die Biosynthese von *PfSel2* und damit dessen biologische Funktion aufrechtzuerhalten. Hierbei ist zu beachten, dass durch einen AS-Austausch meist die Funktion und Aktivität beeinträchtigt wird.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit an der Optimierung der heterologen Überexpression von *PfSel2* in *E. coli* als eine Sec>Cys-Mutante gearbeitet. Obwohl eine Gensynthese mit Anpassung der *codon usage* an *E. coli* vorgenommen wurde, konnten keine ausreichenden Mengen an rekombinanten *PfSel2* erhalten werden. Die Ausbeute war so gering, dass die Konzentration an überexprimierten Protein nicht bestimmbar war. Daneben konnten durch die verschiedensten Aufreinigungsprozeduren keine Verbesserungen des Reinheitsgrades erzielt werden. Es war nur möglich, das überexprimierte Protein durch Western Blot-Analysen zu identifizieren. Auch bei einer Studie zur Überexpression von hSelK in *E. coli* und Hefen konnten keine hinreichenden Erfolge erzielt werden [157]. Hier wurde vermutet, dass SelT in hohen Mengen für die Organismen toxisch ist. Es war auch beobachtbar, dass sich eine größere Menge an *PfSel2*-Protein nicht aus den *E. coli* Zellen lösen lässt. Eine mögliche Ursache könnte in der Hydrophobizität des *PfSel2*'s liegen, die dadurch untereinander und mit anderen *E. coli*-Proteinen agieren und *inclusion bodies* formen. Solche Einschlusskörperchen kommen in der heterologen Überexpression, v. a. bei der Genexpression eukaryotischer Gene in prokaryotischen Zellen vor. In *large scale protein expression*-Studien der *Structural Genomics of Pathogenic Protozoa group* (Universität Washington, USA), *Structural Genomics Consortium* (SGC, Toronto, Kanada) und des *Malaria Program* (Naval Medical Research Center, USA) mit plasmodialen Proteinen zeigte sich, dass nur ein kleiner Bruchteil der untersuchten Proteine in *E. coli* überhaupt überexprimierbar ist [158]. TD's, ein hoher *pI* (>6), ein Fehlen an Homologien zu *E. coli*-Proteinen, Plasmodium-spezifische AS-Insertionen und Signalpeptide wirken sich meist negativ auf die Expression der plasmodialen Proteine in *E. coli* aus. Für *PfSel2* wurde zwar die Sequenz des möglichen Signalpeptides bei der Amplifizierung und dem Klonieren in die Expressionsvektoren für die heterologe Überexpression ausgelassen, jedoch stehen immer noch die mögliche TD an der Position 114 – 141, der hohe *pI* von 9,23 sowie die fehlende Homologie zu *E. coli*-Proteinen und AS-Insertionen im Vergleich zu

hSelT wahrscheinlich einer erfolgreichen Überexpression im Wege. Denn auch die Anpassung der cDNA-Sequenz an die *codon usage* von *E. coli* durch Gensynthese konnte keine Verbesserung der Ausbeute erreichen. Eine Möglichkeit die Expression von PfSel2 zu verbessern, wäre auch die Orthologen der anderen *Plasmodium*-Spezies zu nutzen. Aus der Studie des SGC's wurde ersichtlich, dass sich die Ausbeute an sauberen Protein, Kristallen und gelösten Strukturen verdoppelte, wenn auch die orthologen Proteine überexprimiert wurden [158]. Eine weitere Möglichkeit wäre, in anderen Zellen, v. a. eukaryotische, zu überexprimieren. Ein Versuch die nativen Proteine durch Affinitätsreinigung mittels PAO-Sepharose direkt aus *P. falciparum* zu isolieren, scheiterte wahrscheinlich an der geringen PfSel2-Menge in dem Parasiten [93].

Die Untersuchungen auf den Oligomerisierungszustand von PfSel2 zeigten, wie schon bei PfSel1, unterschiedliche Ergebnisse. So ist nach der Gelfiltration PfSel2 mindestens eine tetramere Struktur mit min. 250 kDa. Jedoch konnten nach den Quervernetzungsexperimenten mit DMA nur Monomere nachgewiesen werden. Wie auch schon unter PfSel1 diskutiert, wird in dieser Arbeit den Quervernetzungsexperimenten eine größere Aussagekraft zugeschrieben. Es sollten zur genaueren Analyse jedoch noch mindestens zwei weitere Quervernetzer unterschiedlicher Natur eingesetzt werden, um die Ergebnisse zu bestätigen.

GRUMOLATO *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass SelT eine Rolle in der Calcium-Homeostase spielt [139]. Eine Überexpression von SelT in PC12-Rattenzellen führte dabei zu einem Anstieg des freien Ca^{2+} in dem Cytosol. Es wird vermutet, dass SelT über das Redox-Motiv CxxU die Calcium-Kanäle, IP3R, stimuliert und es dadurch zu dem Ca^{2+} -Anstieg kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde, aufgrund der großen Ähnlichkeit von PfSel2 zu SelK, ebenfalls freies cytosolisches Ca^{2+} in Parasiten, die PfSel2:p.72u>c als GFP-Variante überexprimierten, mittels Indo-1/AM gemessen und mit Kontrollkulturen verglichen. Zwar waren die einzelnen Ergebnisse aus den verschiedenen Experimenten nicht alle 100%ig reproduzierbar, sie besitzen jedoch alle die gleichen Tendenzen: eine Überexpression an PfSel2:p.72u>c in *P. falciparum* führt zu einem Anstieg des freien Calciums in dem Cytosol. Die Ergebnisse konnten in parasitierten Erythrozyten und in „freien“ Parasiten ermittelt werden. In Anbetracht der Sec>Cys Mutation in dieser PfSel2-Variante und dem Fakt, dass durch einen derartigen Aminosäureaustausch die Aktivität von Proteinen um bis zu 90% sinken kann [147-149], ist dieses Ergebnis relativ hoch einzuschätzen und führt damit zu einem Aufdecken der Funktion des plasmodialen PfSel2's. Damit ist auch ein weiterer Schritt zur Identifikation des PfSel2 als ein SelK-Homologon gemacht.

Die Calcium-Homeostase ist in Zellen streng reguliert. Und Calcium liegt nur in nM-Bereich im Cytosol vor. Kleinste Konzentrationsänderungen haben einen großen Effekt auf die Genexpression und Proteinaktivität verschiedener Calcium-abhängiger Proteine. In *Plasmodium* konnte gezeigt werden, dass Calcium an der Differenzierung und dem circadianen Rhythmus beteiligt ist [159]. In anderen Protozoen, wie *T. gondii* und *Leishmania*, wurde die Rolle dieses *second messengers* in der Invasion der Wirtzelle aufgedeckt [159]. Veränderungen der Menge an freien verfügbaren

cytosolischen Ca^{2+} können auch durch verschiedene externe Stimuli, wie z. B. oxidativen und nitrosativen Stress [160, 161], hervorgerufen werden. Daher werden Proteine, die im Calcium-Metabolismus involviert sind, auch als potenzielle *drug targets* angesehen [162].

Um die Wirkung von oxidativem und nitrosativem Stress auf die Transkription von *PfSel2* zu analysieren und daraus eventuelle Schlüsse auf die Regulation und weitere Funktionen von *PfSel2* im Metabolismus ziehen zu können, wurde das Kulturmedium von 15 Stunden jungen *P. falciparum*-Kulturen mit verschiedenen Substanzen ergänzt. Ähnlich wie bei *PfSel1*, hat die eingesetzte Menge an Methylenblau keine Auswirkungen auf die Transkriptmenge von *PfSel2*. Die gemessenen Werte sind in der Behandlungsreihe mit Paraquat für *PfSel2* leider nicht aussagekräftig, aufgrund der fehlenden Verifizierung. Ansonsten liegen eine leichte Repression im Ringstadium und eine leichte Induktion im Schizontenstadium durch oxidativen Stress vor. Diese Ergebnisse sollten jedoch in weiteren Experimenten bestätigt werden. Die relative mRNA-Konzentration verändert sich hingegen beträchtlich unter dem Einfluss des NO-Donors SNP. Jedoch sind diese Ergebnisse vorsichtig zu betrachten, da auch hier eine zweite Messung fehlt. Die Genexpression von *PfSel2* scheint unter nitrosativem Stress im Ringstadium reprimiert zu sein. Der Level steigt aber in den darauffolgenden Stunden an und gipfelt im Schizontenstadium in ein 3,6-faches im Vergleich zu der Kontrolle. Auch an Säugerzellen konnte zuerst eine Abnahme der Selenoproteine, allerdings auf Protein-Ebene, mit darauffolgendem Anstieg durch oxidativen Stress ermittelt werden [72]. In *P. falciparum* zeigt sich eine Steigerung des *pfsel2*-Transkripts, wenn die Parasiten sich im Stadium der späten Trophozoiten/Schizonten befinden. Im Gegensatz steht die starke Repression im Ringstadium. Dies deutet daraufhin, dass nitrosativer Stress einen unterschiedlichen Effekt auf die Transkription des *pfsel2*-Gens in den einzelnen Lebensstadien ausübt. Wenig ist bis heute über die Kontrolle der Genexpression in *Plasmodium* bekannt. Es wird angenommen, dass sich diese jedoch stark von anderen eukaryotischen Organismen unterscheidet, da bis jetzt nur 1/3 der Proteine, die an der Transkription in frei-lebenden Eukaryoten beteiligt sind, auch in *Plasmodium* entdeckt wurden [150, 163, 164]. Daneben wird aber die Möglichkeit eingeräumt, dass in *Plasmodium*, durch den hohen A+T-Gehalt, homologe Strukturen eventuell noch „versteckt“ sind [165]. Folgende Überlegungen zur Regulation der Genexpression von *PfSel2* beruhen daher auf den Mechanismen bekannter eukaryotischer Systeme. A) So ist bekannt, dass NO direkt mit Glutathion (GSH) interagiert, welches wiederum die Sarcoplasmatische/Endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) aktiviert, die daraufhin Calcium aus dem Cytosol in das ER pumpt [166]. In *Plasmodium* wurde die ATPase 6 als SERCA identifiziert [167]. B) NO aktiviert daneben auch die Guanylyl-Cyclase, wodurch cGMP entsteht und wiederum die SERCA über eine Proteinkinase stimuliert. Durch diese Mechanismen sinkt die Menge an freien Ca^{2+} im Cytosol, wodurch Ca^{2+} -abhängige Proteine und Signalwege nicht aktiviert bzw. inhibiert werden. Dazu zählt auch die Adenylatcyclase, die die Produktion von cAMP katalysiert. Dieses wird durch die cAMP-Phosphodiesterase, die selbst durch cGMP stimuliert wird,

abgebaut. Alles in allem fällt damit der cAMP-Spiegel. GRUMOLATO *et al.* zeigten, dass die Transkription des Ratten *selT*-Gens durch cAMP gesteigert und damit wahrscheinlich über ein cAMP *response element* reguliert wird [139]. In einer anderen Studie konnte in allen Promotorsequenzen der humanen Selenoprotein-Genen, ausgenommen DIO2, mögliche DNA-bindende Domänen für den Transkriptionsfaktor *stimulating factor 1* (Sp1) identifiziert werden [168]. So kann weiter überlegt werden: C) Die Bindung von Sp1 an die DNA wird durch GSH stimuliert [169]. Durch die Interaktion von GSH mit der SERCA, nimmt der GSH-Spiegel und damit auch die Sp1 Aktivität ab. D) Sp1 wird durch ROS direkt inhibiert [170]. Somit entsteht, unter allen Bedingungen, eine multiple Regulation der Genexpression von NO, die möglicherweise zu einer dramatischen Repression der Transkription von *pfsel2/selt*-Gens führt.

Jedoch stieg das *PfSel2*-Transkript 15 Stunden nach SNP-Zugabe, wenn die Parasiten späte Trophozoiten/Schizonten waren, stark an. Mögliche Ursachen hierfür sind: A) NO nimmt während des Experimentes ab und die geringe Genexpression von *pfsel2* in den ersten Stunden nach SNP-Zugabe, wird nun kompensiert. Oder B) Der Parasit verändert während seiner Entwicklung vom Ring zum Schizonten die Genexpression und ändert damit auch seinen Proteinhaushalt. So wurde z. B. auch die Möglichkeit der Umkehrung der CQ-Resistenz durch die Expression eines Histamin1-Rezeptor-Antagonisten in Schizonten gezeigt [171]. Damit wäre es möglich, dass Schizonten Proteine exprimieren, die wiederum die *pfsel2*-Transkription bei NO-Stress stimulieren. C) NO inhibiert die *PfGrx1* [172], daraufhin steigt der GSH-Gehalt der Zelle und der mögliche Sp1 Transkriptionsfaktor bindet an die DNA.

Diese Mechanismen sind rein hypothetisch für *Plasmodium falciparum* und sind ein Versuch die starke Reaktion des *PfSel2*-Transkriptes auf SNP zu erklären. Für eine Aufklärung sind jedoch weitere Experimente sowie mehr Erkenntnisse in der Regulation der Transkription in *Plasmodium* notwendig.

Neben dem Einfluss von oxidativem und nitrosativem Stress wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss des Selenstatus analysiert. Hier zeigte sich, dass die *pfsel2*-Transkription durch Selenit reguliert wird und die Transkription des *pfsel2*-Gens konzentrationsabhängig ist. Dabei führten niedrige Se-Konzentrationen (0,1 μM und 1,5 μM) zu einer Erhöhung des Transkriptlevels innerhalb der ersten drei Stunden, wenn sich die Parasiten noch im Ringstadium befinden. Hingegen erniedrigte 7 μM , das nahezu dem IC50-Wert entsprach, die relative mRNA-Konzentration zu allen gemessenen Zeitpunkten dramatisch. In dieser Arbeit wurde nur bei *PfSel2* eine derartige starke Repression zu allen Zeitpunkten durch hohe Se-Konzentrationen ermittelt. Auch hier können wieder nur rein hypothetische Mechanismen vermutet werden: A) So ist bekannt, dass durch die Metabolisierung von Selenit mittels GSH in Zellen ROS, vor allem O_2^- und H_2O_2 , entsteht [173]. Dadurch erniedrigt sich der GSH-Gehalt, die ROS-Konzentration hingegen steigt. Daher herrscht wahrscheinlich im Parasiten eine ähnliche Situation, wie unter SNP-Zugabe. Niedrige Se-Konzentrationen verursachen weniger ROS, welche sofort von Antioxidantien, wie der

Trx-Familie abgefangen werden könnten. Daher hat eine hohe Se-Konzentration einen negativen Einfluss auf die Transkription gegenüber niedrigen Konzentrationen. B) In Säugetieren inhibiert Selenit beispielsweise den Transkriptionsfaktor AP-1 konzentrationsabhängig [174, 175]. Eventuell könnten auch in *Plasmodium* die notwendigen Transkriptionsfaktoren, für die Synthese der Selenoproteine, durch Se konzentrationsabhängig inhibiert werden. Und C) verlängert Selenit die Halbwertszeit der mRNA von hSelW und hTrxR [151, 152]. Auch dieser Mechanismus ist in *P. falciparum* denkbar. Für ein besseres Verständnis muss jedoch, wie schon unter *PfSel1* erwähnt, die Transkriptionregulation in dem Parasiten genauer aufgeklärt werden. Auch die Genexpression der Selenoproteine im Allgemeinen ist noch nicht vollständig entschlüsselt und lässt daher viel Raum für Spekulationen für die vorliegende Arbeit.

Die gesamte Regulation der Transkription des *pfSel2*-Gens lässt darauf schließen, dass der Parasit in Situationen mit extremen nitrosativem und oxidativem Stress die *PfSel2*-Konzentration senkt. In Hinblick auf die mögliche Rolle im Calcium-Haushalt könnte diese Hypothese weiter unterstützt werden. Durch Calcium werden viele ROS-produzierende Enzyme aktiviert, wie z. B. die NO-Synthase. Um eine weiter steigende [ROS] zu umgehen, werden diese Proteine und die, die an dem Signalweg involviert sind, in Stresszeiten eventuell reprimiert.

Alles in allem indizieren diese Daten, dass *PfSel2* ein Homologon von SelT ist. Über dieses Protein ist bis jetzt nur wenig bekannt. Aber die vorliegenden Daten unterstützen die Hypothese, dass *PfSel2*/SelT eine Rolle in der Calcium-Homeostase spielt und zeigen, dass dessen Transkription von extremen nitrosativen und oxidativen Stresssituationen sowie vom Selenstatus reguliert wird.

4.3 *PfSel3*: duale Funktion?

Ebenso wie für *PfSel1* und *PfSel2* konnten für *PfSel3* durch BLAST in einer früheren Arbeit keine homologen Sequenzen außerhalb der *Plasmodium*-Spezies gefunden werden [93]. Auch Alignments mit humanen und einigen bakteriellen Selenoproteinen führte zu keiner Übereinstimmung. So kann weiterhin angenommen werden, dass *PfSel3* ein für Plasmodium spezifisches und einzigartiges Selenoprotein ist.

Sec ist in *PfSel3* am N-Term in keinem bekannten Motiv lokalisiert [93]. Datenbank-Recherchen führten zu keinem bekannten Motiv in *PfSel3*, das auf eine Funktion schließen lassen würde. Daneben gestaltete es sich, wie für alle anderen Selenoproteine, schwierig, eine zufriedenstellende heterologe Überexpression in *E. coli* mit anschließender Reinigung zu optimieren. Daher konnten keine weiteren Analysen im proteinbiochemischen Bereich durchgeführt werden. Wie weiter unten diskutiert lokalisiert *PfSel3* im Nukleus bzw. Apicoplasten, daher müssen innerhalb der Sequenz SP's für den Transport liegen. Da vor der GFP-Analyse diese Lokalisation nicht vermutet wurde, wurde in der heterologen Überexpression die gesamte Sequenz verwendet. Die Signalsequenzen können jedoch zu *inclusion bodies* und damit zu einer erschwerten Expression in *E. coli* führen. So sollte bei weiteren Überexpressionsversuchen eine Abspaltung

dieser, jedoch noch unbekannt, Sequenz(en) in Erwägung gezogen werden. Wie schon für *PfSel2*, wird für die Expression in *E. coli* der hohe *pI* von 9,64 und die fehlende Homologie zu *E. coli*-Proteinen erschwerend sein.

Durch Anbringen des GFP-Gens an den C-Term der *PfSel3*-cDNA-Sequenz, wurden verschiedene Lokalisationen determiniert. Interessanterweise wurde die Mutante *PfSel3:c.del.SECIS*, bei der das *in frame*-TGA an der Position 76 – 78 vorhanden war, das SECIS-Element jedoch fehlte, in *P. falciparum* exprimiert und im Nukleus aufgefunden. Zum ersten Mal konnte für ein plasmodiales Protein eine nukleare Lokalisation mittels GFP nachgewiesen werden. Da GFP nicht selbst in den Nukleus eindringt, sondern sich im Cytosol befindet, muss es in *PfSel3* eine NLS geben. Dabei fungiert die durch PSORTII und MyHits vorhergesagte zweiteilige NLS an Position 334 – 350 nicht für die Nukleus-Lokalisation. Daher muss in weiteren Studien nach der NLS gesucht werden. Anstelle des *in frame*-TGA's dieses Konstruktes kann kein Sec eingebaut sein, da das dafür erforderliche SECIS-Element fehlt. Durch RT-PCR zeigte sich, dass das *in frame*-UGA dieses Konstruktes auf jeden Fall noch auf der mRNA *in vivo* vorhanden ist und somit für die Translation bereit steht. Es ist bekannt, dass in verschiedenen Organismen und in Mitochondrien TGA nicht nur für Stopp oder Sec codiert, sondern auch für Cys, Trp oder Arginin [75, 77, 143]. Kann dieses *in frame*-TGA in der *PfSel3*-Sequenz auch für eine der anderen Aminosäuren codieren? Dies sollte mit weiteren Konstrukten analysiert werden. Interessanterweise sind nun die Varianten *PfSel3:p.26u>c* und *PfSel3:p.26u>w* nicht im Nukleus lokalisiert. Letztere befand sich eindeutig im Apicoplasten und die Cystein-Variante konnte daneben noch teilweise in der PV sowie in einem unbekannt, bis jetzt nicht identifizierten, Organell entdeckt werden. Dies lässt darauf schließen, dass TGA nicht in der Mutante *PfSel3:c.del.SECIS* für Trp oder Cys codiert. Dadurch kommen aber neue Fragen auf. Welche Mechanismen führen dazu, dass *PfSel3:c.del.SECIS* zu einem voll exprimierten und nukleus-lokalisierten Protein wird? Vermuten lässt sich, dass post-transkriptionale oder post-translationale Prozesse eine Rolle spielen. So entsteht z. B. durch die Mutationen Sec>Cys und Sec>Trp an den Positionen 25|26 und 26|27 neue *cleavage sites* für die Proteasen Chymotrypsin und Trypsin. In *Plasmodium* wurden 92 verschiedene Proteasen durch Computeranalyse gefunden. Von ihnen werden 83 während des erythrozytären Lebenszyklus exprimiert [150]. Daher ist es möglich, dass es auch eine Protease gibt, die an den neu entstandenen *cleavage sites* ansetzen kann. Auf post-transkriptionaler Ebene wird die Vorläufer-mRNA des Säugetier-*trxr1*-Gens alternativ in TrxR1a und TrxR1b gespliced [176]. Wobei das Protein TrxR1b im Nukleus lokalisiert. Auch hat PHGPx4 drei verschiedene Isoformen, die durch eine alternative Promotorsequenz aus einem Gen entstehen [177]. Die verschiedenen Isoformen lokalisieren im Cytosol, in Mitochondrium und im Nukleus. Durch RT-PCR konnten die ersten 29 Nukleotide der kompletten bekannten *PfSel3*-Sequenz nicht nachgewiesen werden. Dies ist eventuell ein Hinweis auf einen alternativen Transkriptionsstart. Alternatives Splicen oder alternative Promotorsequenzen für *PfSel3* sind nicht auszuschließen. Weitere Experimente sollten

diese Fragestellung zu der Nukleus/Apicoplasten-Lokalisation von *PfSel3* berücksichtigen. Möglich ist aber auch ein Einbau von Arginin, welches ebenfalls durch ein Konstrukt in weiteren Experimenten analysiert werden sollte. Durch Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen *PfSel3* wäre eine Lokalisation des Wildtyps *in vivo* möglich. Jedoch ist es in dieser Arbeit nicht möglich gewesen einen spezifischen Antikörper zu produzieren. Der Peptidantikörper zeigte in Western Blots mit plasmodialem Zellextrakt keine Bindung und durch die schlechte Überexpression in *E. coli* kann kein Antikörper gegen das gesamte Protein hergestellt werden. Somit sind die GFP-Fusionsproteine zur Zeit die besten Lösungen. Um eine Beeinflussung der Lokalisation durch GFP's experimentell auszuschließen, sollte in den hier beschriebenen Varianten das GFP nochmals N-Terminal an die Sequenzen gefügt werden. Weiterhin kann, wie auch schon für *PfSel1* und *PfSel2* besprochen, eine Variante mit dem SECIS-Element C-terminal an GFP kloniert werden, um so eine Sec-haltige Variante zu erhalten.

Weiterhin konnte ein starker Anstieg der *PfSel3* mRNA innerhalb weniger Stunden nach Zugabe von 0,1 μM bzw 1,5 μM Se in das Zellkulturmedium beobachtet werden. Auch nach hoher Se-Supplementierung ist ein leichter Anstieg zu sehen. In allen Fällen sinkt der Transkriptlevel nach sechs Stunden auf einen Normalzustand zurück. Im Hinblick auf die Lokalisation im Nukleus zusammen mit dieser schnellen und starken Induktion der Transkription könnten die Daten auf eine Rolle von *PfSel3* in der Regulation der Genexpression durch Selenit und als Selenanzeiger hinweisen.

Im Gegensatz dazu wird die relative Konzentration an *PfSel3*-Transkript in dem Parasiten durch nitrosativen Stress (SNP) innerhalb der ersten drei Stunden reprimiert, steigt aber in den darauffolgenden Stunden wieder auf einen Normalwert an. Dagegen hat oxidativer Stress durch Paraquat und Methylenblau, wie bei fast allen in dieser Arbeit gemessenen Zielgenen, keine Auswirkungen auf die Transkription oder die Halbwertszeit der mRNA.

Die verschiedenen Ergebnisse deuten auf zwei verschiedene Funktionen von *PfSel3* hin: A) Eventuell eine regulatorische im Nukleus, wenn Selenit und somit Selen verfügbar ist und B) eine unbekannte Funktion in dem Apicoplasten. Dafür scheint *PfSel3* post-translational modifiziert zu werden oder alternative Promotorsequenzen führen zu einem zweiten *PfSel3*-Produkt. Jedoch sind dies nur Hypothesen, die durch weitere Experimente verifiziert werden müssen. So können z. B. für die Aufklärung einer möglichen DNA-Interaktion DNase-Footprinting-Assays mit rekombinantem Protein oder eine Chromatin-Immunopräzipitation direkt *in vivo*, eventuell mit der *PfSel3:c.del.SECIS* transfizierten *Plasmodium*-Mutante, durchgeführt werden.

4.4 *PfSel4* als ein SelS-Homologon

Für *PfSel4* wurden keine homologen Sequenzen außerhalb der plasmodialen *via* BLAST gefunden [93]. Jedoch konnte in dieser Arbeit durch Alignments mit humanen Selenoproteinen eine gute Übereinstimmung zu hSelS entdeckt werden. Bei beiden Sequenzen liegt Sec am C-Term in

keinem bekannten Motiv vor. Für beide Proteinsequenzen konnten jeweils auch eine TD des Typs 1b sowie eine coiled-coil-Domäne und ein Dileucin-Motiv in den gleichen Regionen festgestellt werden. Dies deutet auf eine hohe Ähnlichkeit von *PfSel4* zu hSelS hin.

Eine phylogenetische Analyse von SelS-Sequenzen unterschiedlicher Organismen, u. a. *T. gondii* und *N. caninum* [135], zeigt eine Gruppierung dieser intrazellulären Parasiten mit den Sel4 Homologen aus *Plasmodium*. Interessanterweise ordnet sich in dieser Gruppe auch SelS von dem extrazellulären Parasiten *P. humanus*. Dies deutet daraufhin, dass die SelS-Homologen der Parasiten einen gemeinsamen Ursprung haben.

Wie für die anderen drei plasmodialen Selenoproteine konnte auch für *PfSel4*, als eine Sec>Cys Mutante, in der heterologen Überexpression in *E. coli* keine zufriedenstellenden Erfolge erzielt werden. Die Ausbeute pendelte, wie auch bei *PfSel1*, zwischen den Werten 0,1 mg/l und 1 mg/l Expression. Jedoch konnte für *PfSel4* nur ein geringer Sauberkeitsgrad erreicht werden, so dass die tatsächliche Ausbeute von *PfSel4* weniger betrug als bei *PfSel1*. Die geringe Ausbeute, die schlechte Löslichkeit und die vielen Abbruchprodukte zeigen, dass *E. coli* starke Probleme hat, das vorliegende *PfSel4* zu exprimieren. Dies könnte an der Lokalisation von *PfSel4* im ER, wie weiter unten diskutiert, liegen. *PfSel4* wurde als ein cytosolisches Protein angenommen, so dass hier kein Signalpeptid vorhanden wäre. Somit wurde in den Expressionsstudien die gesamte Sequenzlänge genutzt. Für weitere Analysen sollten daher mindestens die ersten 20 Aminosäuren als SP angenommen werden und für die Überexpression in *E. coli* abgespalten werden. Auch die TD, mit ihrer starken Hydrophobizität, kann dazu führen, dass exprimiertes *PfSel4* in *E. coli* mit anderen Proteinen oder sich selbst interagiert und *inclusion bodies* formt. Diese sind sehr schlecht zu lösen und bedürfen einer aufwendigen Reinigung. Wie alle anderen plasmodialen Selenoproteine hat *PfSel4* einen stark basischen pI mit 9,78. Dieser kann ebenfalls die Überexpression in *E. coli* stören [158]. Letztendlich ist es auch möglich, dass *PfSel4*, wie auch schon für hSelT angenommen, in *E. coli* toxisch ist und somit abgebaut wird. Die vielen nicht vermeidbaren Abbruchstücke während der Überexpression stützen diese These.

Auch wenn nur eine schlechte Ausbeute und ein geringer Sauberkeitsgrad erzielt werden konnte, wurden erste funktionelle Assays und Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass *PfSel4* eine mögliche Schutzfunktion in der Zelle ausüben könnte. In dem Assay nach HOLMGREN *et al.* [119] konnte durch Zugabe von *PfSel4* als Sec>Cys-Variante die GS vor oxidativem Stress geschützt werden. In Anbetracht der Mutation des ursprünglichen Sec zu Cys könnte das native Protein noch einen besseren Schutz liefern. Verglichen mit den Daten zu SelS sind die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit unterstützend für die Annahme, dass *PfSel4* ein SelS-Homologon ist. Auch wird durch die Überexpression von SelS in eukaryotischen Zellen ein Schutz vor oxidativem Stress und Apoptose aufgebaut [178-182].

Analysen zu der Oligomerisierung mittels Gelfiltrationschromatographie deuten auf eine Multimerisierung *PfSel4*'s durch Disulfidbrücken hin [111]. In *PfSel4* gibt es nur eine Möglichkeit

eine Disulfidbrücke zu bilden – durch Sec im nativen Protein bzw. in den überexprimierten Proteinen durch Cys. Jedoch wird der Gelfiltration eine geringe Aussagekraft zugeschrieben, so dass zur genaueren Bestimmung Quervernetzungsversuche, wie für *PfSel1* und *PfSel2*, durchgeführt werden sollten. Es ist auch möglich, an der Position 133 das Sec/Cys zu Ala zu mutieren und damit ebenfalls weitere Versuche zur Oligomerisierung durchzuführen, da Ala keine Disulfidbrücken aufbauen kann.

Mit der Cystein-Variante von *PfSel4* wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls erste *pull-down*-Assays mittels His-Tag durchgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte ein sehr prominent auftretendes Protein bei 14 kDa durch *PfSel4* gefangen werden. Leider war es in der dieser Arbeit nicht möglich, dieses Protein zu identifizieren. Eine Analyse durch MALDI-TOF-MS konnte *PfTrx1* identifizieren, jedoch konnte dieses Ergebnis durch eine weitere Analyse nicht bestätigt werden. Damit konnte *PfTrx1* als Beuteprotein für *PfSel4* nicht verifiziert werden.

GAO *et al.* konnten einen Anstieg der SelS-mRNA durch ER-Stress zeigen [178]. Auch löst Stress durch β -Mercaptoethanol einen Anstieg aus [179]. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Anstieg der *PfSel4*-mRNA durch oxidativen Stress in Form von Paraquat ermittelt werden. Auch eine Zugabe von Metylenblau erzielte keine Veränderungen des Transkriptlevels. Jedoch reprimierte nitrosativer Stress durch den NO-Donor SNP den mRNA-Level von *PfSel4* nach neun Stunden um das 0,3-fache gegenüber der Kontrolle. Gleichzeitig waren nach neun Stunden 71% der Parasiten im Trophozitenstadium. Hier zeigten sich auch morphologisch die ersten Anzeichen des toxischen Effektes von SNP – 1,6% der Parasiten waren pyknotisch. In den darauffolgenden Stunden normalisierte sich der mRNA-Level wieder. Der Effekt von SNP nach neun Stunden auf die *PfSel4*-mRNA zeigt, dass besonders in späten Ringen/jungen Trophoziten die metabolische Situation einen Einfluss zulässt. Die gleichen Punkte können hier diskutiert werden wie unter *PfSel2*.

Weiterhin ist ein Anstieg der [mRNA] des *pfsel4*-Gens unter Se-Zugabe der verschiedensten Konzentrationen zu sehen. Ein stetiger Anstieg ist bei geringeren Mengen an Se zu erkennen. Hier verändert sich der Transkriptlevel von 1,4 nach drei Stunden im Ring- bis auf 2,1 im Schizontenstadium durch 0,1 μ M Se. Bei 1,5 μ M Se ist dieses Bild noch etwas ausgeprägter und steigt bis auf 2,6 im Schizontenstadium an. Nach drei Stunden ist ebenfalls die relative mRNA-Konzentration unter 7 μ M Se auf 1,9 gestiegen. Jedoch normalisiert sich der Level im Laufe der darauffolgenden Stunden wieder. Aus diesen Daten ist erkenntlich, dass entweder die Transkription des *pfsel4*-Gens bzw. die Halbwertszeit der *PfSel4*-mRNA durch den Selenstatus positiv beeinflusst wird. Für hSelW und hTrxR konnte z. B. eine Veränderung der mRNA-Halbwertszeit durch Se beobachtet werden [151, 152]. Diese Mechanismen sind bei hSelW und hTrxR im Gegensatz zu *PfSel3* aber „Langzeiteffekte“, bei denen über einen längeren Zeitraum der mRNA-Level steigt und nicht sofort ein Maximum erreicht. Die Transkription von SelS ist hingegen vom Selenstatus unabhängig [182, 183].

YE *et al.* identifizierten SelS als einen Faktor für die Re-Translokation von falschgefalteten Proteinen aus dem ER in das Cytosol [184]. Hierbei bindet SelS Derlin1 (Der1) und verbindet Der1 mit der p97ATPase (auch VCP genannt). Auch in *Plasmodium falciparum* wurden vor kurzem vier Paraloge zu Der1 entdeckt. Zwei von ihnen konnten im Apicoplasten bzw. ER nachgewiesen werden [185, 186]. Aus diesem Grunde ist es auch wahrscheinlich, dass es einen Faktor, ähnlich SelS, in *P. falciparum* gibt, der Der1 mit VCP verbindet. Eine Protein-Protein-Interaktion ist über die vorhergesagte coiled-coil-Struktur möglich.

Die vorliegende Arbeit zeigt viele Ähnlichkeiten von *PfSel4* zu SelS. Daher wird postuliert, dass *PfSel4* ein Homolog von SelS ist.

4.5 Biosynthesemaschinerie von Selenoproteinen

Neben dem Einfluss verschiedenster externer Stimuli auf die Transkription der vier plasmodialen Selenoproteine wurden in dieser Arbeit auch die Effekte auf die Proteine, welche in die Biosynthese für die Selenoproteine involviert sind, untersucht. Wie schon bei den Analysen zu *PfSel1* – *PfSel4* konnten durch Paraquat und Methylenblau keine Unterschiede der mRNA-Level gegenüber den Kontrollen gemessen werden. Auch nitrosativer Stress in Form von SNP hat nur einen geringen Einfluss auf die Level. Hier ist aber vor allem die Transkription von *PfSPS* und *PfSBP2* in den ersten Stunden nach Zugabe von SNP reprimiert und steigt dann um ein Vielfaches in den letzten Stunden der Behandlung an. Die *Pf*tRNA^{ser[sec]} sowie *PfEFSec* werden nicht beeinflusst. Die Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration von *PfSPS* und *PfSBP2* korreliert mit der von *PfSel2*. Demnach hat SNP durch die Bildung von nitrosativem und oxidativem Stress [187] einen starken Einfluss auf die Transkription dieser Gene. An Säuger-SBP2 konnte eine direkte Regulation der Funktion durch oxidativen Stress festgestellt werden [92]. SBP2 hat eine Cysteinereiche Domäne, die durch oxidativen Stress Disulfidbrücken bildet. Dadurch ändert sich die Lokalisation von cytosolisch zu nuklear. Dies wird wahrscheinlich durch eine Maskierung des Nukleus-Exportsignals hervorgerufen.

Auch ist die relative mRNA-Konzentration aller untersuchten Proteine durch den Selenstatus reguliert. Vor allem die spezifische tRNA^{ser[sec]} steigt stetig an. Hingegen wird *pfsbp2* nur in den ersten drei Stunden erhöht transkribiert. Eine Erhöhung des Transkriptlevels der Biosynthesefaktoren muss nicht zwingend mit dem Anstieg des Proteinlevels einhergehen. Jedoch indizieren diese Ergebnisse, dass die Erhöhung der mRNA-Level der Biosynthesemaschinerie-Proteine mit der Erhöhung der Transkriptlevel der Selenoproteine *PfSel1* – *PfSel4* direkt im Zusammenhang stehen. Auch ist eine Hierarchie zwischen den einzelnen Genen, wie schon in Säugetier-Zellen bekannt ist [73], zu erkennen. So scheinen *PfSel2* und v. a. *PfSel3* im Ringstadium wichtig zu sein. Auch *PfSPS* wird besonders im Ringstadium durch leichte Se-Erhöpfung gefördert. Hingegen werden die Transkriptlevel von *PfSel1*, *PfSel4* und *Pf*tRNA^{ser[sec]} erst im späteren Stadien, v. a. Schizonten, durch leichte Se-Erhöpfung erhöht. Wobei starke Se-

Erhöhung die mRNA-Level von *Pf*RNA^{ser[sec]} während des gesamten Lebenszyklus positiv beeinflusst. Der Level der *Pf*EFSec-mRNA wird durch Selen im Ring/Trophozoiten-Stadium ähnlich stark angehoben.

4.6 Regulation redoxaktiver Proteine im Vergleich der Selenoproteine

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war den Effekt von oxidativem und nitrosativem Stress durch Paraquat und SNP sowie durch Methylenblau auf die Transkription weiterer redoxaktiver Proteine, wie TrxR, TPxGI und Grx zu ermitteln. Ähnlich zu den Selenoproteinen konnte keine Veränderung des Transkriptlevels durch Methylenblau detektiert werden.

Durch die Zugabe von 20 µM Paraquat konnte nur ein negativer Effekt auf die relative mRNA-Konzentration des *tpxgl*- sowie *trx1*-Gens nach jeweils neun Stunden ermittelt werden. Alle anderen gemessenen mRNA-Level unterschieden sich nicht von der Kontrolle.

Nitrosativer Stress in Form von SNP hat hingegen einen starken Einfluss auf den Transkriptlevel der Peroxiredoxine, Grx, Trx1 und TrxR. Dabei fiel dieses nach neun Stunden meist abrupt auf das 0,3-fache bis 0,7-fache der Kontrolle ab und stieg in den nächsten sechs Stunden wieder. Dies ist ähnlich stark den Transkriptprofilen der Selenoproteine. AOP erreichte einen extremen Wert mit einer 10-fachen mRNA-Erhöhung durch nitrosativen Streß in Schizonten. Auch wenn zwischen den gemessenen qRT-Werten ein großer Standardfehler liegt, ist doch in beiden Fällen eine starke Erhöhung des Transkriptlevels zu erkennen. Auch 1cys-Prx sowie TPxGI und TrxR stiegen auf das 2- – 4-fache des Normalwertes an. Diese Induktionen der Transkription steht wahrscheinlich in Verbindung mit der Bildung von oxidativem Stress, der durch SNP induziert wird sowie durch die Entstehung von Peroxynitrit [188] und darauffolgende Peroxidation von Lipiden und Oxidation von Proteinen [187]. AOP ist das erste bekannte Peroxiredoxin, das Lipidperoxidationen aufhebt [67]. Die Erhöhung des nitrosativen und gleichzeitig oxidativen Stresses in den Malaria-Parasiten führt demnach zu einer Induktion der Transkription der Gene antioxidativer Proteine.

Im Vergleich zu den untersuchten Selenoproteinen ist durch SNP zuerst eine Repression zu erkennen. Jedoch werden einige wichtige Genexpressionen, wie die des AOP und TrxR nach längerer Zeit, wenn die Parasiten späte Trophozoiten/ Schizonten sind, wieder stark induziert. Dies ähnelt *Pf*Sel2 und lässt weiterhin auf eine wichtige redox-gekoppelte Funktion von *Pf*Sel2 unter oxidativen und nitrosativen Stress schließen.

5 Literaturverzeichnis

1. Mendis K, Rietveld A, Warsame M, Bosman A, Greenwood B, Wernsdorfer WH: **From malaria control to eradication: The WHO perspective.** *Trop Med Int Health* 2009, **14**(7):802-809.
2. Sherman IW: **A brief history of malaria and discovery of the parasite's life cycle.** In: *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection.* Edited by Sherman IW. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1998: 3-10.
3. Vitoria M, Granich R, Gilks CF, Gunneberg C, Hosseini M, Were W, Ravigliione M, De Cock KM: **The global fight against HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: current status and future perspectives.** *Am J Clin Pathol* 2009, **131**(6):844-848.
4. Greenwood B, Targett G: **Do we still need a malaria vaccine?** *Parasite Immunol* 2009, **31**(9):582-586.
5. **World Malaria Report 2008** [<http://apps.who.int/malaria/wmr2008/>]
6. Barat LM, Palmer N, Basu S, Worrall E, Hanson K, Mills A: **Do malaria control interventions reach the poor? A view through the equity lens.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **71**(2 Suppl):174-178.
7. Somi MF, Butler JR, Vahid F, Njau JD, Kachur SP, Abdulla S: **Economic burden of malaria in rural Tanzania: variations by socioeconomic status and season.** *Trop Med Int Health* 2007, **12**(10):1139-1147.
8. Onwujekwe O, Malik el F, Mustafa SH, Mnzavaa A: **Do malaria preventive interventions reach the poor? Socioeconomic inequities in expenditure on and use of mosquito control tools in Sudan.** *Health Policy Plan* 2006, **21**(1):10-16.
9. Sachs J, Malaney P: **The economic and social burden of malaria.** *Nature* 2002, **415**(6872):680-685.
10. Poncon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D: **Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France.** *Malar J* 2007, **6**:18.
11. Baird JK: **Resurgent malaria at the millennium: control strategies in crisis.** *Drugs* 2000, **59**(4):719-743.
12. Zoller T, Naucke TJ, May J, Hoffmeister B, Flick H, Williams CJ, Frank C, Bergmann F, Suttorp N, Mockenhaupt FP: **Malaria transmission in non-endemic areas: case report, review of the literature and implications for public health management.** *Malar J* 2009, **8**:71.
13. Sam-Yellowe TY: **Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival.** *Parasitol Today* 1996, **12**(8):308-316.
14. Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI: **Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**(3):203-216.
15. Sinden RE, Gilles HM: **The malarial parasite.** In: *Essential Malariology.* Edited by Warrell DA, Gilles HM, Fourth edn. London: Arnold; 2002: 8 - 34.
16. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, Singh B: **Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection.** *Clin Infect Dis* 2009, **49**(6):852-860.
17. White NJ: **Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite.** *Clin Infect Dis* 2008, **46**(2):172-173.
18. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: **A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings.** *Lancet* 2004, **363**(9414):1017-1024.
19. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H: **Naturally acquired Plasmodium knowlesi malaria in human, Thailand.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**(12):2211-2213.
20. Guerra CA, Snow RW, Hay SI: **Mapping the global extent of malaria in 2005.** *Trends Parasitol* 2006, **22**(8):353-358.
21. Wahlgren M, Carlson J, Helmbj H, Hedlund I, Treutiger CJ: **Molecular mechanisms and biological importance of Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting.** *Mem Inst*

- Oswaldo Cruz 1992, **87 Suppl 3**:323-329.
22. Chen Q, Barragan A, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Sahlen A, Carlson J, Datta S, Wahlgren M: **Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum.** *J Exp Med* 1998, **187**(1):15-23.
 23. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK: **The pathogenic basis of malaria.** *Nature* 2002, **415**(6872):673-679.
 24. Service MW, Townson H: **The Anopheles vector.** In: *Essential Malariology*. Edited by Vahid F, Fourth edn. London: Arnold; 2002: 59 - 84.
 25. Collins FH, Hill CA: **The Anopheles gambiae genome.** In: *Molecular Approaches to Malaria*. Edited by Sherman IW. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2005.
 26. Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J: **A global index representing the stability of malaria transmission.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**(5):486-498.
 27. Reiter P: **Climate change and mosquito-borne disease.** *Environ Health Perspect* 2001, **109 Suppl 1**:141-161.
 28. Brower V: **Vector-borne diseases and global warming: are both on an upward swing? Scientists are still debating whether global warming will lead to a further spread of mosquitoes and the diseases they transmit.** *Embo Rep* 2001, **2**(9):755-757.
 29. Hulden L, Heliovaara K: **Endemic malaria: an 'indoor' disease in northern Europe. Historical data analysed.** *Malar J* 2005, **4**(1):19.
 30. Patz JA, Olson SH: **Malaria risk and temperature: influences from global climate change and local land use practices.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(15):5635-5636.
 31. **Climate change and human health - risks and responses**
[<http://www.who.int/globalchange/climate/summary/en/print.html>]
 32. Reiter P: **Climate change and mosquito-borne disease: knowing the horse before hitching the cart.** *Rev Sci Tech* 2008, **27**(2):383-398.
 33. Sahu NK, Sahu S, Kohli DV: **Novel molecular targets for antimalarial drug development.** *Chem Biol Drug Des* 2008, **71**(4):287-297.
 34. Garcia CR, Markus RP, Madeira L: **Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection.** *J Biol Rhythms* 2001, **16**(5):436-443.
 35. Kwiatkowski D: **Febrile temperatures can synchronize the growth of Plasmodium falciparum in vitro.** *J Exp Med* 1989, **169**(1):357-361.
 36. Gravenor MB, Kwiatkowski D: **An analysis of the temperature effects of fever on the intra-host population dynamics of Plasmodium falciparum.** *Parasitology* 1998, **117 (Pt 2)**:97-105.
 37. Wirth DF: **Biological revelations.** *Nature* 2002, **419**(6906):495-496.
 38. Dixon MW, Thompson J, Gardiner DL, Trenholme KR: **Sex in Plasmodium: a sign of commitment.** *Trends Parasitol* 2008, **24**(4):168-175.
 39. Kooij TW, Matuschewski K: **Triggers and tricks of Plasmodium sexual development.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**(6):547-553.
 40. Meshnick SR: **From Quinine to Qinghaosu: Historical Perspectives.** In: *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. Edited by Sherman IW. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1998: 341 - 353.
 41. Vangapandu S, Jain M, Kaur K, Patil P, Patel SR, Jain R: **Recent advances in antimalarial drug development.** *Med Res Rev* 2007, **27**(1):65-107.
 42. Olliaro PL, Taylor WR: **Antimalarial compounds: from bench to bedside.** *J Exp Biol* 2003, **206**(Pt 21):3753-3759.
 43. **WHO announces pharmaceutical companies agree to stop marketing single-drug artemisinin malaria pills**
[<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr23/en/index.html>]
 44. **Facts on ACTs**
[http://www.rollbackmalaria.org/cmcc_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet_9.htm]
 45. Kremser P: **Fosmidomycin and clindamycin for the treatment of malaria.** In: *6 Jahrestreffen der AG Malaria der PEG in Zusammenarbeit mit der DTG: 2008; Tübingen;*

- 2008: 22.
46. Warrell DA, Watkins WM, Winstanley PA: **Treatment and prevention of malaria**. In: *Essential Malariaology*. Edited by Warrell DA, Gilles HM, Fourth edn. London: Arnold; 2002: 268 - 312.
47. Nosten F, Hien TT, White NJ: **Use of artemisinin derivatives for the control of malaria**. *Med Trop (Mars)* 1998, **58**(3 Suppl):45-49.
48. Wongsrichanalai C, Meshnick SR: **Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border**. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(5):716-719.
49. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ *et al*: **Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria**. *N Engl J Med* 2009, **361**(5):455-467.
50. Maude RJ, Pontavornpinyo W, Saralamba S, Aguas R, Yeung S, Dondorp AM, Day NP, White NJ, White LJ: **The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in Cambodia**. *Malar J* 2009, **8**:31.
51. Verdrager J: **Epidemiology of the emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in South-East Asia and Australasia**. *J Trop Med Hyg* 1986, **89**(6):277-289.
52. Greenberg AE, Ntumbanzondo M, Ntula N, Mawa L, Howell J, Davachi F: **Hospital-based surveillance of malaria-related paediatric morbidity and mortality in Kinshasa, Zaire**. *Bull World Health Organ* 1989, **67**(2):189-196.
53. Targett GA, Greenwood BM: **Malaria vaccines and their potential role in the elimination of malaria**. *Malar J* 2008, **7** Suppl 1:S10.
54. Hill AV: **Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases**. *Annu Rev Genet* 2006, **40**:469-486.
55. Segal S, Hill AV: **Genetic susceptibility to infectious disease**. *Trends Microbiol* 2003, **11**(9):445-448.
56. Nasr A, Iriemenam NC, Giha HA, Balogun HA, Anders RF, Troye-Blomberg M, ElGhazali G, Berzins K: **FcγRIIIa (CD32) polymorphism and anti-malarial IgG subclass pattern among Fulani and sympatric ethnic groups living in eastern Sudan**. *Malar J* 2009, **8**:43.
57. Pierce SK, Miller LH: **World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not**. *J Immunol* 2009, **182**(9):5171-5177.
58. Christophides GK: **Transgenic mosquitoes and malaria transmission**. *Cell Microbiol* 2005, **7**(3):325-333.
59. Windbichler N, Papathanos PA, Crisanti A: **Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in Anopheles gambiae**. *PLoS Genet* 2008, **4**(12):e1000291.
60. Marshall JM, Taylor CE: **Malaria control with transgenic mosquitoes**. *PLoS Med* 2009, **6**(2):e20.
61. Brown AE, Catteruccia F: **Toward silencing the burden of malaria: progress and prospects for RNAi-based approaches**. *Biotechniques* 2006, **Suppl**:38-44.
62. Pritchard JF, Jurima-Romet M, Reimer ML, Mortimer E, Rolfe B, Cayen MN: **Making better drugs: Decision gates in non-clinical drug development**. *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**(7):542-553.
63. Goldberg DE: **Parasitology. When the host is smarter than the parasite**. *Science* 2002, **296**(5567):482-483.
64. Nwaka S, Ridley RG: **Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships**. *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**(11):919-928.
65. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H: **Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions**. *Int J Parasitol* 2004, **34**(2):163-189.
66. Muller S: **Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum**. *Mol Microbiol* 2004, **53**(5):1291-1305.
67. Nickel C, Rahlfs S, Deponte M, Koncarevic S, Becker K: **Thioredoxin networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum**. *Antioxid Redox Signal* 2006, **8**(7-8):1227-1239.

68. Becker K, Kanzok SM, Iozef R, Fischer M, Schirmer RH, Rahlfs S: **Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites.** *Eur J Biochem* 2003, **270**(6):1057-1064.
69. Rahlfs S, Nickel C, Deponte M, Schirmer RH, Becker K: **Plasmodium falciparum thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism.** *Redox Rep* 2003, **8**(5):246-250.
70. Rahlfs S, Becker K: **Interference with redox-active enzymes as a basis for the design of antimalarial drugs.** *Mini Rev Med Chem* 2006, **6**(2):163-176.
71. Sarma GN, Nickel C, Rahlfs S, Fischer M, Becker K, Karplus PA: **Crystal structure of a novel Plasmodium falciparum 1-Cys peroxiredoxin.** *Journal of Molecular Biology* 2005, **346**(4):1021-1034.
72. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK: **From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health.** *Antioxid Redox Signal* 2007, **9**(7):775-806.
73. Schomburg L, Schweizer U: **Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1790**(11):1453-1462.
74. Reeves MA, Hoffmann PR: **The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation.** *Cell Mol Life Sci* 2009.
75. Macino G, Coruzzi G, Nobrega FG, Li M, Tzagoloff A: **Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**(8):3784-3785.
76. Yamao F, Muto A, Kawauchi Y, Iwami M, Iwagami S, Azumi Y, Osawa S: **UGA is read as tryptophan in Mycoplasma capricolum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(8):2306-2309.
77. Inamine JM, Ho KC, Loechel S, Hu PC: **Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma genitalium, and Mycoplasma gallisepticum.** *J Bacteriol* 1990, **172**(1):504-506.
78. Zinoni F, Birkmann A, Leinfelder W, Bock A: **Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from Escherichia coli directed by a UGA codon.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(10):3156-3160.
79. Urban C, Beier H: **Cysteine tRNAs of plant origin as novel UGA suppressors.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**(22):4591-4597.
80. Meyer F, Schmidt HJ, Plumper E, Hasilik A, Mersmann G, Meyer HE, Engstrom A, Heckmann K: **UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of Euplotes octocarinatus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(9):3758-3761.
81. Feng YX, Copeland TD, Oroszlan S, Rein A, Levin JG: **Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(22):8860-8863.
82. Chittum HS, Lane WS, Carlson BA, Roller PP, Lung FD, Lee BJ, Hatfield DL: **Rabbit beta-globin is extended beyond its UGA stop codon by multiple suppressions and translational reading gaps.** *Biochemistry* 1998, **37**(31):10866-10870.
83. Beier H, Grimm M: **Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(23):4767-4782.
84. Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL: **Biosynthesis of Selenocysteine on Its tRNA in Eukaryotes.** *PLoS Biol* 2006, **5**(1):e4.
85. Xu XM, Mix H, Carlson BA, Grabowski PJ, Gladyshev VN, Berry MJ, Hatfield DL: **Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery.** *J Biol Chem* 2005, **280**(50):41568-41575.
86. Small-Howard A, Morozova N, Stoytcheva Z, Forry EP, Mansell JB, Harney JW, Carlson BA, Xu XM, Hatfield DL, Berry MJ: **Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(6):2337-2346.
87. Stoytcheva Z, Tujebajeva RM, Harney JW, Berry MJ: **Efficient incorporation of multiple selenocysteines involves an inefficient decoding step serving as a potential translational checkpoint and ribosome bottleneck.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(24):9177-9184.

88. Howard MT, Aggarwal G, Anderson CB, Khatri S, Flanigan KM, Atkins JF: **Recoding elements located adjacent to a subset of eukaryal selenocysteine-specifying UGA codons.** *Embo J* 2005, **24**(8):1596-1607.
89. Howard MT, Moyle MW, Aggarwal G, Carlson BA, Anderson CB: **A recoding element that stimulates decoding of UGA codons by Sec tRNA[Ser]Sec.** *Rna* 2007, **13**(6):912-920.
90. Tamura T, Yamamoto S, Takahata M, Sakaguchi H, Tanaka H, Stadtman TC, Inagaki K: **Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(46):16162-16167.
91. Chavatte L, Brown BA, Driscoll DM: **Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes.** *Nat Struct Mol Biol* 2005, **12**(5):408-416.
92. Papp LV, Lu J, Striebel F, Kennedy D, Holmgren A, Khanna KK: **The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(13):4895-4910.
93. Lobanov AV, Delgado C, Rahlfs S, Novoselov SV, Kryukov GV, Gromer S, Hatfield DL, Becker K, Gladyshev VN: **The Plasmodium selenoproteome.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(2):496-505.
94. Zhong L, Arner ES, Holmgren A: **Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(11):5854-5859.
95. Waller RF, Reed MB, Cowman AF, McFadden GI: **Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway.** *Embo J* 2000, **19**(8):1794-1802.
96. Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI: **Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(21):12352-12357.
97. Kalendar R, Lee D, Schulman AH: **FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search.** In: *Genes, Genomes and Genomics*. vol. 3; 2009.
98. Kibbe WA: **OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(Web Server issue):W43-46.
99. Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T: **MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(2):511-518.
100. Su XZ, Wu Y, Sifri CD, Wellems TE: **Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**(8):1574-1575.
101. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
102. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res* 2004, **64**(15):5245-5250.
103. Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE, Hviid L, Theander TG: **Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria.** *Mol Microbiol* 2003, **49**(1):179-191.
104. Frank M, Dzikowski R, Costantini D, Amulic B, Berdougou E, Deitsch K: **Strict pairing of var promoters and introns is required for var gene silencing in the malaria parasite Plasmodium falciparum.** *J Biol Chem* 2006, **281**(15):9942-9952.
105. Sturm N, Hu Y, Zimmermann H, Fritz-Wolf K, Wittlin S, Rahlfs S, Becker K: **Compounds structurally related to ellagic acid show improved antiplasmodial activity.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(2):622-630.
106. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**(7):RESEARCH0034.
107. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson

- KE, Bowman S *et al*: **Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum***. *Nature* 2002, **419**(6906):498-511.
108. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF *et al*: **The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12**. *Science* 1997, **277**(5331):1453-1462.
109. Angov E, Hillier CJ, Kincaid RL, Lyon JA: **Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host**. *PLoS ONE* 2008, **3**(5):e2189.
110. Eberle R: **Die Selenoproteine 1 und 2 aus *Plasmodium falciparum*: Optimierung der Expression und Interaktomanalysen**. *Masterarbeit*. Gießen: Biochemie der Ernährung, Justus-Liebig-Universität; 2009.
111. Ronzheimer N: **Das Selenoproteom von *Plasmodium falciparum*: Untersuchungen zu Oligomerisierungszustand und Interaktom**. *Masterarbeit*. Gießen: Biochemie der Ernährung, Justus-Liebig-Universität; 2010.
112. Trager W, Jensen JB: **Human malaria parasites in continuous culture**. *Science* 1976, **193**(4254):673-675.
113. Lambros C, Vanderberg JP: **Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture**. *J Parasitol* 1979, **65**(3):418-420.
114. Tonkin CJ, van Dooren GG, Spurck TP, Struck NS, Good RT, Handman E, Cowman AF, McFadden GI: **Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method**. *Mol Biochem Parasitol* 2004, **137**(1):13-21.
115. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY: **A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties**. *J Biol Chem* 1985, **260**(6):3440-3450.
116. Blatter LA, Wier WG: **Intracellular diffusion, binding, and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2**. *Biophys J* 1990, **58**(6):1491-1499.
117. Johansson L, Chen C, Thorell JO, Fredriksson A, Stone-Elander S, Gafvelin G, Arner ES: **Exploiting the 21st amino acid-purifying and labeling proteins by selenolate targeting**. *Nat Methods* 2004, **1**(1):61-66.
118. Johansson L, Gafvelin G, Arner ES: **Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use**. *Biochim Biophys Acta* 2005, **1726**(1):1-13.
119. Holmgren A: **Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action**. *J Biol Chem* 1979, **254**(18):9113-9119.
120. Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER: **The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system**. *J Biol Chem* 1988, **263**(10):4704-4711.
121. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R *et al*: **ClustalW and ClustalX version 2**. *Bioinformatics* 2007, **23**(21):2947-2948.
122. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Mol Biol Evol* 1987, **4**(4):406-425.
123. Page RD: **TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers**. *Comput Appl Biosci* 1996, **12**(4):357-358.
124. Kurowski MA, Bujnicki JM: **GeneSilico protein structure prediction meta-server**. *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(13):3305-3307.
125. Nakai K, Horton P: **PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization**. *Trends Biochem Sci* 1999, **24**(1):34-36.
126. Zuegge J, Ralph S, Schmuker M, McFadden GI, Schneider G: **Deciphering apicoplast targeting signals--feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins**. *Gene* 2001, **280**(1-2):19-26.
127. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H: **Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools**. *Nat Protoc* 2007, **2**(4):953-971.
128. Lupas A, Van Dyke M, Stock J: **Predicting coiled coils from protein sequences**. *Science* 1991, **252**(5009):1162-1164.
129. McDonnell AV, Jiang T, Keating AE, Berger B: **Paircoil2: improved prediction of coiled**

- coils from sequence.** *Bioinformatics* 2006, **22**(3):356-358.
130. Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, Zahn-Zabal M, Jongeneel CV, Falquet L: **MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(Web Server issue):W332-335.
131. Gould CM, Diella F, Via A, Puntervoll P, Gemund C, Chabanis-Davidson S, Michael S, Sayadi A, Bryne JC, Chica C *et al*: **ELM: the status of the 2010 eukaryotic linear motif resource.** *Nucleic Acids Res*, **38**(Database issue):D167-180.
132. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, A. B: **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.** In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Edited by Walker JM: Humana Press; 2005: 571-607.
133. den Dunnen JT, Antonarakis SE: **Mutation nomenclature.** *Curr Protoc Hum Genet* 2003, **Chapter 7**:Unit 7 13.
134. den Dunnen JT, Antonarakis SE: **Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion.** *Hum Mutat* 2000, **15**(1):7-12.
135. Novoselov SV, Lobanov AV, Hua D, Kasaikina MV, Hatfield DL, Gladyshev VN: **A highly efficient form of the selenocysteine insertion sequence element in protozoan parasites and its use in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(19):7857-7862.
136. Lobanov AV, Gromer S, Salinas G, Gladyshev VN: **Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(14):4012-4024.
137. Hartmann E, Rapoport TA, Lodish HF: **Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**(15):5786-5790.
138. Reinhardt A, Hubbard T: **Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**(9):2230-2236.
139. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guerineau NC *et al*: **Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion.** *Faseb J* 2008, **22**(6):1756-1768.
140. Klein P, Kanehisa M, DeLisi C: **The detection and classification of membrane-spanning proteins.** *Biochim Biophys Acta* 1985, **815**(3):468-476.
141. Lu C, Qiu F, Zhou H, Peng Y, Hao W, Xu J, Yuan J, Wang S, Qiang B, Xu C *et al*: **Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes.** *FEBS Lett* 2006, **580**(22):5189-5197.
142. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN: **Characterization of mammalian selenoproteomes.** *Science* 2003, **300**(5624):1439-1443.
143. Turanov AA, Lobanov AV, Fomenko DE, Morrison HG, Sogin ML, Klobutcher LA, Hatfield DL, Gladyshev VN: **Genetic code supports targeted insertion of two amino acids by one codon.** *Science* 2009, **323**(5911):259-261.
144. Diefenderfer C, Lee J, Mlyanarski S, Guo Y, Glover KJ: **Reliable expression and purification of highly insoluble transmembrane domains.** *Anal Biochem* 2009, **384**(2):274-278.
145. Jones DH, Ball EH, Sharpe S, Barber KR, Grant CW: **Expression and membrane assembly of a transmembrane region from Neu.** *Biochemistry* 2000, **39**(7):1870-1878.
146. Singh SM, Panda AK: **Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins.** *J Biosci Bioeng* 2005, **99**(4):303-310.
147. Zhong L, Holmgren A: **Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations.** *J Biol Chem* 2000, **275**(24):18121-18128.
148. Berry MJ, Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR: **Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation.** *Endocrinology* 1992, **131**(4):1848-1852.
149. Buettner C, Harney JW, Larsen PR: **The role of selenocysteine 133 in catalysis by the human type 2 iodothyronine deiodinase.** *Endocrinology* 2000, **141**(12):4606-4612.
150. Chung DW, Ponts N, Cervantes S, Le Roch KG: **Post-translational modifications in**

- Plasmodium: more than you think!** *Mol Biochem Parasitol* 2009, **168**(2):123-134.
151. Gallegos A, Berggren M, Gasdaska JR, Powis G: **Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium.** *Cancer Res* 1997, **57**(21):4965-4970.
152. Gu QP, Ream W, Whanger PD: **Selenoprotein W gene regulation by selenium in L8 cells.** *Biometals* 2002, **15**(4):411-420.
153. Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM *et al.*: **Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote.** *PLoS Biol* 2006, **4**(9):e286.
154. Coyne RS, Thiagarajan M, Jones KM, Wortman JR, Tallon LJ, Haas BJ, Cassidy-Hanley DM, Wiley EA, Smith JJ, Collins K *et al.*: **Refined annotation and assembly of the *Tetrahymena thermophila* genome sequence through EST analysis, comparative genomic hybridization, and targeted gap closure.** *BMC Genomics* 2008, **9**:562.
155. Castellano S, Andres AM, Bosch E, Bayes M, Guigo R, Clark AG: **Low exchangeability of selenocysteine, the 21st amino acid, in vertebrate proteins.** *Mol Biol Evol* 2009, **26**(9):2031-2040.
156. **PSORT II Localization Features**
[<http://wolfsort.org/WoLFPSORTdoc/psortFeatureDescriptions.html#m3a>]
157. Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN: **SeIT, SeIW, SeIH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family.** *Biochemistry* 2007, **46**(23):6871-6882.
158. Birkholtz LM, Blatch G, Coetzer TL, Hoppe HC, Human E, Morris EJ, Ngcete Z, Oldfield L, Roth R, Shonhai A *et al.*: **Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation.** *Malar J* 2008, **7**:197.
159. Moreno SN, Docampo R: **Calcium regulation in protozoan parasites.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**(4):359-364.
160. Gordeeva AV, Zvyagil'skaya RA, Labas YA: **Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells.** *Biochemistry (Mosc)* 2003, **68**(10):1077-1080.
161. Florea SM, Blatter LA: **The effect of oxidative stress on Ca²⁺ release and capacitative Ca²⁺ entry in vascular endothelial cells.** *Cell Calcium* 2008, **43**(4):405-415.
162. Grellier P, Depoix D, Schrevel J, Florent I: **Discovery of new targets for antimalarial chemotherapy.** *Parasite* 2008, **15**(3):219-225.
163. Coulson RM, Hall N, Ouzounis CA: **Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Genome Res* 2004, **14**(8):1548-1554.
164. Llinas M, Deitsch KW, Voss TS: **Plasmodium gene regulation: far more to factor in.** *Trends Parasitol* 2008, **24**(12):551-556.
165. Callebaut I, Prat K, Meurice E, Mornon JP, Tomavo S: **Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes.** *BMC Genomics* 2005, **6**:100.
166. Tong X, Evangelista A, Cohen RA: **Targeting the redox regulation of SERCA in vascular physiology and disease.** *Curr Opin Pharmacol* 2009.
167. Dyer M, Jackson M, McWhinney C, Zhao G, Mikkelsen R: **Analysis of a cation-transporting ATPase of *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol* 1996, **78**(1-2):1-12.
168. Stoytcheva ZR, Berry MJ: **Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1790**(11):1429-1440.
169. Knoepfel L, Steinkuhler C, Carri MT, Rotilio G: **Role of zinc-coordination and of the glutathione redox couple in the redox susceptibility of human transcription factor Sp1.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **201**(2):871-877.
170. Morel Y, Barouki R: **Repression of gene expression by oxidative stress.** *Biochem J* 1999, **342 Pt 3**:481-496.
171. Nakornchai S, Konthiang P: **Potentiation of antimalarial drug action by chlorpheniramine against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro.**

- Parasitol Int* 2006, **55**(3):195-199.
172. Rahlfs S, Fischer M, Becker K: **Plasmodium falciparum possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain.** *J Biol Chem* 2001, **276**(40):37133-37140.
173. Shen H, Yang C, Liu J, Ong C: **Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells.** *Free Radic Biol Med* 2000, **28**(7):1115-1124.
174. Yoon SO, Kim MM, Chung AS: **Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**(23):20085-20092.
175. Spyrou G, Bjornstedt M, Kumar S, Holmgren A: **AP-1 DNA-binding activity is inhibited by selenite and selenodiglutathione.** *FEBS Lett* 1995, **368**(1):59-63.
176. Damdimopoulos AE, Miranda-Vizuete A, Treuter E, Gustafsson JA, Spyrou G: **An alternative splicing variant of the selenoprotein thioredoxin reductase is a modulator of estrogen signaling.** *J Biol Chem* 2004, **279**(37):38721-38729.
177. Tramer F, Vetere A, Martinelli M, Paroni F, Marsich E, Boitani C, Sandri G, Panfili E: **cAMP-response element modulator-tau activates a distinct promoter element for the expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene.** *Biochem J* 2004, **383**(Pt 1):179-185.
178. Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR: **Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein.** *FEBS Lett* 2004, **563**(1-3):185-190.
179. Du S, Liu H, Huang K: **Influence of SelS Gene Silence on beta-Mercaptoethanol-mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Apoptosis in HepG2 Cells.** *Biochim Biophys Acta*.
180. Du JL, Sun CK, Lu B, Men LL, Yao JJ, An LJ, Song GR: **Association of SelS mRNA expression in omental adipose tissue with Homa-IR and serum amyloid A in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Chin Med J (Engl)* 2008, **121**(13):1165-1168.
181. Kim KH, Gao Y, Walder K, Collier GR, Skelton J, Kissebah AH: **SEPS1 protects RAW264.7 cells from pharmacological ER stress agent-induced apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **354**(1):127-132.
182. Kelly E, Greene CM, Carroll TP, McElvaney NG, O'Neill SJ: **Selenoprotein S/SEPS1 modifies endoplasmic reticulum stress in Z variant alpha1-antitrypsin deficiency.** *J Biol Chem* 2009, **284**(25):16891-16897.
183. Sunde RA, Paterson E, Evenson JK, Barnes KM, Lovegrove JA, Gordon MH: **Longitudinal selenium status in healthy British adults: assessment using biochemical and molecular biomarkers.** *Br J Nutr* 2008, **99** Suppl 3:S37-47.
184. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA: **A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol.** *Nature* 2004, **429**(6994):841-847.
185. Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM, Maier UG: **Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates?** *Mol Biol Evol* 2007, **24**(4):918-928.
186. Spork S, Hiss JA, Mandel K, Sommer M, Kooij TW, Chu T, Schneider G, Maier UG, Przyborski JM: **An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of Plasmodium falciparum.** *Eukaryot Cell* 2009, **8**(8):1134-1145.
187. Yamamoto T, Bing RJ: **Nitric oxide donors.** *Proc Soc Exp Biol Med* 2000, **225**(3):200-206.
188. Lamarque D, Whittle BJ: **Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors.** *Eur J Pharmacol* 1995, **277**(2-3):187-194.

**„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an
interessant zu werden,
wo sie aufhört.“**

(Justus von Liebig)

Ich erkläre:

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

Gießen, den 30.06.2010

Anne Röseler