

**HOMÖODYNAMIK**  
**VON REDOXPOTENTIAL UND GLUTATHIONSTOFFWECHSEL**  
**DES MALARIAERREGERS *PLASMODIUM FALCIPARUM***

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Anna Katharina Schuh**

– 2021 –

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Biochemie und Molekularbiologie, Interdisziplinäres Forschungszentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen, unter Leitung von Prof. Dr. Katja Becker angefertigt. Teile der experimentellen Arbeiten wurden an der Monash University Melbourne im Labor von Prof. Dr. Christian Doerig im Rahmen eines DAAD-geförderten Auslandsaufenthaltes durchgeführt.

Erstgutachterin

Prof. Dr. Katja Becker, Professur für Biochemie und Molekularbiologie, Interdisziplinäres Forschungszentrum, Justus-Liebig-Universität Gießen,  
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Zweitgutachterin

Prof. Dr. Katja Sträßer, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen,  
Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

Nach Wahrheit forschen,  
Schönheit lieben,  
Gutes wollen,  
das Beste tun –  
das ist die Bestimmung des Menschen.

Moses Mendelssohn

# DANKSAGUNG

An allererster Stelle möchte ich **Prof. Dr. Katja Becker** danken für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die Betreuung meiner Arbeit, die Motivation und Förderung und die Möglichkeit meines Auslandsaufenthaltes. Aber noch mehr bin ich aus tiefstem Herzen dankbar für die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen. Die Zeit hat mich in vielerlei Hinsicht als Mensch geprägt und geformt.

Frau **Prof. Dr. Katja Sträßer** danke ich für die Übernahme der Zweitbetreuung dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch den weiteren Mitgliedern des Prüfungskomitees danken.

Bei **Kim Heimsch, Dr. Frankziska Mohring, Dr. Mahsa Rahbari, Siegrid Franke** und **Melanie Moser** möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit in der Zellkultur und an verschiedenen Projekten bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit beim „SILAC-Projekt“ danke ich **Susanne Schipper** und **Prof. Dr. Claire Delahaunty**.

**Dr. Karin Fritz-Wolf** danke ich für ihre Arbeit an der Kristallstruktur von sfroGFP2 und die schönen gemeinsamen Stunden in Heidelberg.

Bei weiteren Mitgliedern der AG Becker, die mir mit experimenteller Unterstützung, ihrer Expertise und Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich bedanken: **Marina Fischer, Michaela Stumpf, Norma Schulz, Alexander Höing** und **Dr. Stefan Rahlfs**.

**Dr. Kathrin Buchholz** danke ich für die vielen guten Diskussionen, unsere Bürogemeinschaft und Freundschaft. Ein ganz besonderer Dank geht an **Dr. Kathrin Pauli**, die mit mir die lustigsten und schlimmsten Momente der letzten Jahre geteilt hat.

Mein Dank gilt auch allen weiteren (ehemaligen) Laborkollegen und Mitarbeitern der AG Becker, besonders auch **Dr. Christina Brandstädter**.

Für eine gleichzeitig sehr schöne und effiziente Zeit an der Monash University in Melbourne möchte ich herzlich **Prof. Dr. Christian Doerig** und **Dr. Simona John von Freyend** danken.

Ebenso möchte ich **Prof. Dr. David Fidock** und **Dr. Stan Gabryszewski**, Columbia University, NY, für die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Daniel, der immer an meiner Seite steht – in guten wie in schlechten Zeiten, ebenso wie meiner Familie und meinen Freunden. Ihr seid meine geheime Superkraft. Hope. Faith. Strength.

## VERÖFFENTLICHUNGEN

Rahbari M, Rahlfs S, Przyborski JM, **Schuh AK**, Hunt NH, Fidock DA, Grau GE, Becker K (2017) Hydrogen peroxide dynamics in subcellular compartments of malaria parasites using genetically encoded redox probes. *Sci Rep* 7(1):10449.

**Schuh AK\***, Sheybani B\*, Jortzik E, Niemann B, Wilhelm J, Boening A, Becker K (2018) Redox status of patients before cardiac surgery. *Redox Rep* 23(1):83-93.

**Schuh AK\***, Rahbari M\*, Heimsch KC, Mohring F, Gabryszewski SJ, Weder S, Buchholz K, Rahlfs S, Fidock DA, Becker K (2018). Stable Integration and Comparison of hGrx1-roGFP2 and sfroGFP2 Redox Probes in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *ACS Infect Dis* 4(11):1601-1612.

Heimsch KC, Gerzen C, **Schuh AK**, Nietzel T, Rahlfs S, Przyborski JM, Gohlke H, Schwarzländer M, Becker K, Fritz-Wolf K. Functional and structural characterization of redox sensitive superfolder green fluorescent protein and variants. *in Vorbereitung*

Siddiqui G\*, Giannangelo C\*, De Paoli A, **Schuh AK**, Heimsch KC, Anderson D, Brown TG, MacRaild CA, Wu J, Wang X, Dong Y, Vennerstrom JL, Becker K, Creek DJ. Peroxide antimalarial drugs impact redox homeostasis in *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *in Vorbereitung*

\*Authors contributed equally

## KONFERENZBEITRÄGE

8<sup>th</sup> Short Course for Young Parasitologists, Bernhard Nocht Institut Hamburg, 11. -14.03.2015, *Vortrag*

4<sup>th</sup> Symposium of the SPP1710 Dynamics of thiol-based redox switches in cellular physiology (first funding period) in cooperation with ESF-EMBO Symposium "Thiol-based Redox Switches in Life Sciences", Sant Feliu Spain, 12.-17.09.2015, *Poster*

8<sup>th</sup> Annual Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL) Conference, Gießen, 30.09.2015 – 01.10.2015, *Poster*

MICROBIOLOGY@MONASH 3<sup>rd</sup> Annual Plenary Meeting, Monash University Clayton Australia, 03.12.2015, *Poster*

9<sup>th</sup> Annual Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL) Conference, Gießen, 20.09.2016 – 21.09.2016, *Poster*

10<sup>th</sup> Annual Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL) Conference, Gießen, 27.09.2017 – 28.09.2017, *Poster*

1<sup>st</sup> Symposium of the SPP1710 Dynamics of thiol-based redox switches in cellular physiology (second funding period), Schloss Rauschholzhausen, 12. - 14.03.2018, *Poster*

2<sup>nd</sup> Symposium of the SPP1710 Dynamics of thiol-based redox switches in cellular physiology (second funding period), Schloss Rauschholzhausen, 18. - 19.03.2019, *Vortrag*

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Gefahr, die von Infektionskrankheiten ausgeht, ist aktuell so präsent wie schon lange nicht mehr. Dem Risiko einer Malaria-Infektion sind mehr als 3 Mrd. Menschen weltweit ausgesetzt. Mit jährlich mehr als 400.000 Todesfällen, hauptsächlich in Afrika, zählt die Malaria zu den tödlichsten parasitären Erkrankungen. *Plasmodium falciparum* als Erreger der Malaria tropica, der schwersten Form der Malaria, ist während seines intraerythrozytären Lebenszyklus oxidativem Stress unterschiedlicher Quellen ausgesetzt. Ein wichtiger Abwehrmechanismus dagegen ist sein komplexes antioxidatives Glutathionsystem. Die Untersuchung des Redox-Stoffwechsels, einschließlich des Glutathionsystems, ist von großem Interesse für das Verständnis der Biologie des Malariaparasiten, der Wirkmechanismen von Medikamenten und der Interaktionen von Wirt und Parasit. Zur Untersuchung des Glutathionredoxpotentials und dessen Veränderungen, z.B. durch Medikamente, eignen sich genetisch kodierte Fluoreszenz-basierte Redox-Sensoren (roGFPs), die bereits als leistungsfähige Werkzeuge in einigen Organismen, einschließlich *Plasmodium*, beschrieben wurden. Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen Sensor, das sfroGFP2, zu untersuchen und zu charakterisieren sowie mit der bereits bekannten Sonde hGrx1-roGFP2 *in vitro* und in Zellkultur zu vergleichen. SfroGFP2 enthält die superfolderGFP-Mutationen (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V, A206V), die *Cycle-3*-Mutationen (F99S, M153T, V163A) sowie die F223R-Mutation aus roTurbo. Zur Charakterisierung wurden die rekombinanten Proteine und ihre Reaktivität mit Glutathion und Malariamedikamenten untersucht sowie die Kristallstruktur von sfroGFP2 analysiert. Durch die verbesserte Fluoreszenz und die stabile Transfektion gelang es, zusätzlich zur bereits bekannten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, die Detektion mittels Plattenleser zu etablieren und damit eine schnellere und einfachere Methode mit höherem Durchsatz zu implementieren. Die Expression und Fluoreszenz von sfroGFP2 wurde über den gesamten asexuellen Lebenszyklus verfolgt. Außerdem wurde die neue sfroGFP2-Sonde mit Glutaredoxin (Grx) fusioniert und stabil in das Parasiten-Genom integriert, was die verbesserte Fluoreszenz von sfroGFP2 mit dem Vorteil, unabhängig von der vorliegenden Grx-Konzentration zu sein, kombiniert. Diese Eigenschaften sind besonders für Untersuchungen in Organellen oder kleinen Organismen von Vorteil. Eine weitere zukünftige Optimierung wären Messungen mittels Durchflusszytometrie, die den Vorteil von Single-Cell-Analyse mit Hochdurchsatz vereint.

Glutathion spielt auch als posttranslationale Modifikation von Proteinen (Protein-S-Glutathionylierung) eine Rolle beim Schutz und bei der Aktivität von Proteinen. In einem SILAC-Experiment wurde die Veränderung des Glutathionyloms von *P. falciparum* durch oxidativen Stress untersucht und spezifische Glutathionylierungsstellen gefunden. Ein besonders interessantes Protein, das als differentiell reguliert gefunden wurde, ist das Thioredoxin (*PfTrx1*), das eine zentrale Rolle im antioxidativen Thioredoxinsystem hat. Da auch Kinasen, z.B. FIKK8, als glutathionylierte Proteine gefunden wurden, wirft dies die Frage auf, inwieweit posttranslationale Modifikationen miteinander im *Cross Talk* stehen und sich gegenseitig beeinflussen. Um erste Einblicke hierzu zu bekommen, wurde ein *Pulldown* mit der GFP-getaggten Casein Kinase 1 (*PfCK1*) unter Stressbedingungen durchgeführt und analysiert, ob sich das Interaktom im Vergleich zu ungestressten Parasiten verändert. Die ersten Daten wiesen dabei darauf hin, dass durch eine Behandlung mit Artemisinin Proteine, die an der Translation beteiligt sind, verändert werden. Weitere Untersuchungen hierzu werden notwendig sein, um detailliertere und quantitative Aussagen treffen zu können und mehr über den *Cross Talk* posttranslatinaler Modifikationen zu lernen.

## SUMMARY

The threat posed by infectious diseases is currently more present than it has been for a long time. More than 3 billion people worldwide are at risk of malaria infection. With more than 400,000 deaths annually, mainly in Africa, malaria is one of the deadliest parasitic diseases. *Plasmodium falciparum* as the causative pathogen of Malaria tropica, the most severe form of malaria, is exposed to oxidative stress from various sources during its intraerythrocytic life cycle. An important defense mechanism against this is its complex antioxidant glutathione system. The study of redox metabolism, including the glutathione system, is of great interest for understanding the biology of the malaria parasite, mechanisms of drug action, and host-parasite interactions. Genetically-encoded fluorescence-based redox sensors (roGFPs), which have already been described as powerful tools in several organisms, including *Plasmodium*, are suitable for studying glutathione redox potential and its changes, e.g., due to the action of pharmaceuticals. The aim of the present thesis was to investigate and characterize a new sensor, sfroGFP2, and to compare it with the already known probe hGrx1-roGFP2 *in vitro* and in cell culture. SfroGFP2 contains the superfolderGFP mutations (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V, A206V), the Cycle 3 mutations (F99S, M153T, V163A), and the F223R mutation from roTurbo. For characterization, the recombinant proteins and their reactivity with glutathione and antimalarial drugs were investigated, and the crystal structure of sfroGFP2 was analyzed. Improved fluorescence and stable transfection enabled the establishment of detection by plate reader in addition to the already known confocal laser scanning microscopy, thus implementing a faster and simpler method with higher throughput. The expression and fluorescence of sfroGFP2 was followed throughout the asexual life cycle. In addition, the new sfroGFP2 probe was fused to glutaredoxin (Grx) and stably integrated into the parasite genome, combining the enhanced fluorescence of sfroGFP2 with the advantage of being independent of the Grx concentration present. These properties are particularly advantageous for studies in organelles or small organisms. Another future optimization would be measurements using flow cytometry, which combines the advantage of single-cell analysis with high-throughput.

Glutathione also plays a role in protein protection and activity as a post-translational modification of proteins (protein S-glutathionylation). In a SILAC experiment, the modification of the glutathionylome of *P. falciparum* by oxidative stress was investigated and specific glutathionylation sites were found. A particularly interesting protein that was found to be differentially regulated is thioredoxin (*PfTrx1*), which plays a central role in the antioxidant thioredoxin system. Since kinases, e.g. FIKK8, were also found to be glutathionylated proteins, the question arises whether post-translational modifications are in cross-talk with each other and affect each other. To gain first insights into this, a pulldown was performed with GFP-tagged casein kinase 1 (*PfCK1*) under stress conditions in order to analyze the interactome changes compared to unstressed parasites. Initial data indicated that artemisinin treatment alters proteins involved in translation. Further studies on this will be necessary to provide more detailed and quantitative statements and to learn more about the cross-talk of post-translational modifications.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Summary</b> .....	<b>II</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Malaria</b> .....	<b>1</b>
1.1.1    Verbreitung und Bedeutung der Malaria.....	1
1.1.2    Malaria-Infektionen .....	1
1.1.3    Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	2
1.1.4    Die Bekämpfung von Malaria .....	4
<b>1.2 Redoxmetabolismus in <i>Plasmodium falciparum</i></b> .....	<b>6</b>
1.2.1    Oxidativer Stress .....	6
1.2.2    Quellen von oxidativem Stress bei <i>Plasmodium falciparum</i> und seine Abwehrsysteme...8	
1.2.3    Das Glutathionsystem .....	9
<b>1.3 Genetisch kodierte Redox-Sonden in <i>Plasmodium falciparum</i></b> .....	<b>11</b>
1.3.1    roGFP als Redox-Sensor .....	11
<b>1.4 Redox-Regulierung durch Protein-S-Glutathionylierung</b> .....	<b>15</b>
1.4.1    Funktionen von Protein-S-Glutathionylierung.....	16
1.4.2    Protein-S-Glutathionylierung in <i>Plasmodium</i> .....	17
1.4.3    SILAC ( <i>Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture</i> ) zur Untersuchung von Veränderungen der Glutathionylierungsprofile.....	18
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Geräte</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterial</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3 Chemikalien</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 Antibiotika und Malariamedikamente</b> .....	<b>24</b>
2.4.1    Antibiotika .....	24
2.4.2    Malariamedikamente .....	24
2.4.3    Selektionssubstanzen in der <i>P. falciparum</i> -Zellkultur .....	24
<b>2.5 Puffer und Medien</b> .....	<b>25</b>
2.5.1    Assay Puffer .....	25
2.5.2    Puffer und Lösungen zur Kultivierung von <i>P. falciparum</i> .....	25
2.5.3    Medium/Platten zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	25
2.5.4    Gele .....	25
2.5.5    Elektrophoresepuffer und -lösungen .....	26
2.5.6    Western Blot Puffer und -lösungen.....	26
<b>2.6 Kits und Beads</b> .....	<b>26</b>

2.7 Organismen .....	27
2.8 Plasmide .....	27
2.9 Proteinkristallisation .....	28
2.10 Software .....	28
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Polymerasekettenreaktion .....	29
3.1.2 DNA-Quantifikation .....	29
3.1.3 Agarosegelelektrophorese .....	29
3.1.4 Klonierung von hGrx1-sfroGFP2 .....	30
3.1.5 Preparation von Plasmid-DNA .....	31
<b>3.2 Plasmodium falciparum Kultivierung .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 <i>In vitro</i> Kultivierung von <i>P. falciparum</i> .....	31
3.2.2 Bestimmung der Parasitämie und der Stadien .....	31
3.2.3 Blutstabilate .....	32
3.2.4 Sorbitol- und Percoll-Synchronisation .....	32
3.2.5 Anreicherung von Trophozoit-Stadien .....	33
3.2.6 <i>In vitro</i> -Bestimmung der EC <sub>50</sub> von <i>P. falciparum</i> .....	33
3.2.7 Ernte von Parasitenpellets mit Saponinlyse .....	34
3.2.8 Herstellung von Parasiten-Zellextrakten .....	34
3.2.9 <i>Plasmodium falciparum</i> Transfektion und stabile Integration .....	34
3.2.10 Herstellung monoklonaler Parasitenlinien .....	36
<b>3.3 Biochemische Methoden .....</b>	<b>37</b>
3.3.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford .....	37
3.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	38
3.3.3 Western Blot .....	38
3.3.4 Bestimmung der Glutathionreduktase-Aktivität .....	39
3.3.5 Bestimmung von Gesamtglutathion, reduziertem Glutathion und Thiolen im Parasitenlysat .....	39
3.3.6 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose .....	40
<b>3.4 Biosensor Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Heterologe Überexpression der Sensoren .....	41
3.4.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung der rekombinanten Proteine .....	41
3.4.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	42
3.4.4 Plattenleser-Messungen .....	43
3.4.5 Berechnung des Grades der Oxidation und des Glutathionredoxpotentials .....	43
3.4.6 Expression von sfroGFP2 im asexuellen Lebenszyklus .....	44
3.4.7 Effekte von redox-aktiven Verbindungen und Malariamedikamenten auf die Redox- Homöostase .....	44
3.4.8 Kristallisation von sfroGFP2 .....	45
<b>3.5 SILAC-Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Etablierung der Stress-Bedingungen .....	46
3.5.2 Markierung und Ernte der Parasiten .....	46
3.5.3 Isolierung von S-glutathionylierten Proteinen aus <i>P. falciparum</i> Zelllysat .....	46
3.5.4 Massenspektrometrische Analyse und Auswertung .....	47
3.5.5 Auswertung .....	48

<b>3.6 Untersuchung der Interaktionspartner der PfCK1 und ihrer Veränderung durch (oxidativen) Stress (GFP-Pulldown).....</b>	<b>48</b>
3.6.1 Kultivierung und Ernte der Parasiten.....	48
3.6.2 Anreicherung der GFP-getaggten CK1 und ihrer Interaktionspartner .....	49
3.6.3 Massenspektrometrische Analyse.....	49
3.6.4 Auswertung.....	50
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 sfroGFP2 als Redox-Sonde in P. falciparum.....</b>	<b>51</b>
4.1.1 <i>In vitro</i> -Vergleich der rekombinanten Proteine .....	51
4.1.2 Interaktion der Sonden mit Glutathion und Glutaredoxin.....	52
4.1.3 Transfer der Redox-Messungen auf den Plattenleser.....	54
4.1.4 Interaktionen von Wirkstoffen mit rekombinatem sfroGFP2 .....	58
4.1.6 <i>In cellulo</i> -Vergleich von hGrx1-roGFP2 und sfroGFP2 .....	60
4.1.7 Effekte von Wirkstoffen auf NF54 <sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54 <sup>[sfroGFP2]</sup> .....	62
4.1.8 Expression von sfroGFP2 über den Lebenszyklus.....	65
4.1.9 Stabile Integration.....	66
4.1.10 Kristallisation von sfroGFP2 .....	67
4.1.11 hGrx1-sfroGFP2 .....	70
<b>4.2 SILAC .....</b>	<b>72</b>
4.2.1 Etablierung der Bedingungen für oxidativen Stress .....	72
4.2.2 <i>Pulldown</i> der glutathionylierten Proteine .....	73
<b>4.3 GFP-Pulldown der CK1 mit ihren Interaktionspartnern .....</b>	<b>80</b>
4.3.1 Stressbedingungen und Ernte der Parasiten.....	80
4.3.2 Etablierung des GFP-Pulldowns.....	80
4.3.3 Massenspektrometrische Analyse der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner .....	81
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
<b>5.1 Stabile Transfektion und Transfer der Messungen auf den Plattenleser.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2 Charakterisierung und Etablierung der sfroGFP2 Redox-Sonde.....</b>	<b>88</b>
5.2.1 Untersuchung der rekombinanten Proteine.....	88
5.2.2 Interaktion der Sonden mit Glutathion und Glutaredoxin.....	89
5.2.3 <i>In cellulo</i> Vergleich von hGrx1-roGFP2 und sfroGFP2.....	90
5.2.4 Kristallstruktur von sfroGFP2.....	92
5.2.5 Fazit und weitere Anwendungsmöglichkeiten genetisch kodierter Fluoreszenz-basierter Sonden.....	96
<b>5.3 SILAC zur Untersuchung von Veränderungen der Glutathionilyierungsprofile als Antwort auf oxidativen Stress .....</b>	<b>97</b>
<b>5.4 GFP-Pulldown der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner und deren Veränderung durch (Redox-)Stress .....</b>	<b>100</b>
<b>6 Referenzen .....</b>	<b>102</b>
<b>7 Appendix.....</b>	<b>115</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>116</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schätzung der weltweiten <i>P. falciparum</i> -Todeszahlen in allen Altersgruppen für 2019 .....	2
Abbildung 2: Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i> . .....	3
Abbildung 3: ROS und andere aktive Spezies können über verschiedene endogene Quellen erzeugt werden.....	8
Abbildung 4: Das antioxidative Abwehrsystem von <i>Plasmodium</i> . .....	9
Abbildung 5: Veränderungen des Spektrums von roGFP2 in Abhängigkeit des Oxidationsstatus. ....	12
Abbildung 6: Ableitung verschiedener roGFPs vom wtGFP.....	13
Abbildung 7: Der Glutathion-Biosensor hGrx1-roGFP2 ist eine Fusion aus humanem Glutaredoxin 1 (hGrx1) mit roGFP2. ....	13
Abbildung 8: Varianten von GFP basierend auf dem GFP aus <i>Aequorea Victoria</i> . ....	14
Abbildung 9: Oxidative posttranslationale Modifikationen an Cysteinen. ....	15
Abbildung 10: Protein-S-Glutathionylierung. ....	16
Abbildung 11: Funktionelle Klassifizierung der Protein-S-glutathionylierten Proteine in <i>P. falciparum</i> . ....	18
Abbildung 12: Schema der stabilen Integration von hGrx1-sfroGFP2 in NF54attB.....	35
Abbildung 13: Spektren der rekombinanten Proteine hGrx1-roGFP2, sfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2. ....	51
Abbildung 14: Dynamische Veränderung des Ratios durch Oxidations- und Reduktionsmittel. ....	52
Abbildung 15: Inkubation von sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 mit GSH und GSSG. ....	53
Abbildung 16: Äquilibrierung der Sonden mit GSH und GSSG in An- und Abwesenheit von Grx.....	54
Abbildung 17: Test der Zellzahlen bei Messungen in Mikrotiterplatten (384-well) am Plattenleser. ....	55
Abbildung 18: <i>Real-time Imaging</i> des dynamischen Bereichs von NF54attB <sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54attB <sup>[sfroGFP2]</sup> mit CLSM und Plattenleser .....	56
Abbildung 19: Vergleich verschiedener Plattenleser zur Messung des Redox-Status mit genetisch kodierten Sonden in NF54 <sup>[sfroGFP2]</sup> . ....	57
Abbildung 20: Effekte von Malariamedikamenten auf rekombinantes sfroGFP2. ....	59
Abbildung 21: Stabil transfizierte <i>P. falciparum</i> NF54attB-Parasiten, die hGrx1-roGFP2 (A) oder sfroGFP2 (B) exprimieren. ....	61
Abbildung 22: Änderungen des Redox-Ratios durch Malariamedikamente und redoxaktive Verbindungen in <i>P. falciparum</i> NF54 <sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> - und NF54 <sup>[sfroGFP2]</sup> -Parasiten nach 4-stündiger Inkubation. ....	62
Abbildung 23: Änderungen des Redox-Ratios durch Malariamedikamente und redoxaktive Verbindungen von <i>P. falciparum</i> NF54 <sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> - und NF54 <sup>[sfroGFP2]</sup> -Parasiten nach 24-stündiger Inkubation. ....	64
Abbildung 24: SfroGFP2 Fluoreszenzsignale im Verlauf des asexuellen Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> NF54attB-Parasiten .....	65

Abbildung 25: Western Blot der sfroGFP2 Expression 5 bis 50 h nach Invasion bei NF54 <sup>[sfroGFP2]</sup> -Parasiten. ....	66
Abbildung 26: Glutathion und Thiole in transfizierten und nicht-transfizierten NF54 <sup>attB</sup> -Parasiten. ....	67
Abbildung 27: Reinigung von sfroGFP2 für die Kristallisation. ....	68
Abbildung 28: Kristalle von sfroGFP2. ....	68
Abbildung 29: Kristallstruktur von sfroGFP2. ....	69
Abbildung 30: Überprüfung der Fluoreszenz von NF54 <sup>[hGrx1-sfroGFP2]</sup> . ....	70
Abbildung 31: Verifizierung der stabilen Integration von hGrx1-sfroGFP2 in NF54 <sup>attB</sup> -Parasiten über PCR. ....	71
Abbildung 32: Test der Glukose-Oxidase-Stressbedingungen. ....	72
Abbildung 33: $\alpha$ -GSH Western Blot mit Nachweis der glutathionylierten Proteine im Parasiten-Zelllysate zur Testung einer geeigneten Glukose-Oxidase-Konzentration zur Induktion von oxidativem Stress. ....	73
Abbildung 34: Workflow der SILAC-Probenaufbereitung. ....	74
Abbildung 35: $\alpha$ -Biotin Western Blots der <i>Pulldowns</i> . ....	75
Abbildung 36: Elutionsprofil der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner während des GFP- <i>Pulldowns</i> . ....	80
Abbildung 37: Venn-Diagramme der Anzahl der (gemeinsamen) Proteine. ....	81
Abbildung 38: Heatmap der hoch- bzw. herunterregulierten Proteine der mit ART, GOD und VI16832 behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. ....	82
Abbildung 39: Klassifizierung der Proteine nach Proteinklasse und molekularer Funktion. ....	85
Abbildung 40: Vergleich der Spektren von hGrx1-roGFP2, hGrx1-sfroGFP2 und sfroGFP2 in oxidiertem und reduziertem Zustand. ....	89
Abbildung 41: Struktur von avGFP und des Chromophors. ....	93
Abbildung 42: Vergleich der Strukturen von roGFP2 und sfroGFP2. ....	95
Abbildung 43: Die Rolle von Protein-S-Glutathionylierung unter basalen Bedingungen und unter oxidativem Stress. ....	97
Abbildung 44: Struktur von PfGrx1. ....	99

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Radikalische und nicht-radikalische ROS (Sies & Jones, 2020).....	7
Tabelle 2: Pipettierschema der PCR. ....	29
Tabelle 3: Verdau des pET28-Plasmids. ....	30
Tabelle 4: Ligation von hGrx1-sfroGFP2 mit dem pDC2-Vektor.....	30
Tabelle 5: Kontrollverdau.....	31
Tabelle 6: PCR-Mix zur Blut-PCR.....	36
Tabelle 7: Blut-PCR zur Verifizierung der genomischen Integration. ....	36
Tabelle 8: Primer zur Überprüfung der stabilen Integration.....	36
Tabelle 9: Pipettierschema der Standardkurve für den Bradford-Assay.....	37
Tabelle 10: Antikörper und Verdünnungen.....	39
Tabelle 11: Pipettierschema GR-Assay.....	39
Tabelle 12: Pipettierschema des Ellman Assays.....	40
Tabelle 13: Aufteilung der Proben für den <i>Pulldown</i> der glutathionylierten Proteine. ....	47
Tabelle 14: Vergleich des $E_{GSH}$ im Zytosol von NF54 <sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54 <sup>[sfroGFP2]</sup> . ....	60
Tabelle 15: Anzahl der <i>Pf</i> -Proteine nach <i>Pulldown</i> und MS-Analyse.....	76
Tabelle 16: Glutathionylierte Proteine mit ihrer <i>Modification Site</i> . ....	78
Tabelle 17: Interaktionspartner der <i>PfCK1</i> nach <i>Co-IP</i> . ....	83
Tabelle 18: Übersicht der Mutationen in sfroGFP2. ....	94

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A, $\Delta A$	Absorption, Absorptionsdifferenz
ACT	Artemisinin-basierte Kombinationstherapie ( <i>Artemisinin-based combination therapy</i> )
AQ	Amodiaquin
ART	Artemisinin
AS	Aminosäure(n)
ATM	Artemether
ATS	Artesunat
ATQ	Atovaquon
av	<i>Aequoria victoria</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSD	Blasticidin S
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CK1	Casein Kinase 1
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ( <i>Confocal laser scanning microscopy</i> )
CQ	Chloroquin
kDa	Kilodalton
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DIA	Diamide
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Ellmans Reagens)
DTT	1,4-Dithiothreitol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E <sub>GSH</sub>	Glutathionabhängiges Redoxpotential
FAD	Flavinadenindinukleotid
G6PD	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
$\gamma$ GCS	Glutamacysteinyligase / $\gamma$ -Glutamacysteinsynthetase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GOD	Glukose-Oxidase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GS	Glutathion-Synthetase
GSH	Reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GSSG	Glutathiondisulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hGR	humane Glutathionreduktase
hGrx	humanes Glutaredoxin

hk	Hämatokrit
IAA	Iodacetamid
iRBC	infizierter Erythrozyt ( <i>infected red blood cell</i> )
LB	Luria-Bertani Medium
LUM	Lumefantrin
MAL	Malarone
MDG	Millenniumsentwicklungsziele ( <i>Millennium Development Goals</i> )
Mito	Mitochondrium
MQ	Mefloquin
MS	Massenspektrometrie
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat)
NDA	Naphthalene-2,3-Dicarboxaldehyde
NEM	N-Ethylmaleimid
OAT	Ornithin-Amonitransferase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
QN	Chinin ( <i>Quinine</i> )
RBC	Erythrozyt ( <i>Red blood cell</i> )
RBM	<i>Roll Back Malaria</i>
roGFP	<i>Redution-oxidation sensitive green fluorescent protein</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNS	Reaktive Stickstoffspezies ( <i>reactive nitrogen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
SOD	Superoxiddismutase
SSA	Sulfosalicylsäure
tGSH	Gesamtglutathion
TNB <sup>-</sup>	2-Nitro-5-thiobenzoate
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	Unit
VA	Volumenaktivität
WHO	<i>World Health Organization</i> / Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Malaria

### 1.1.1 Verbreitung und Bedeutung der Malaria

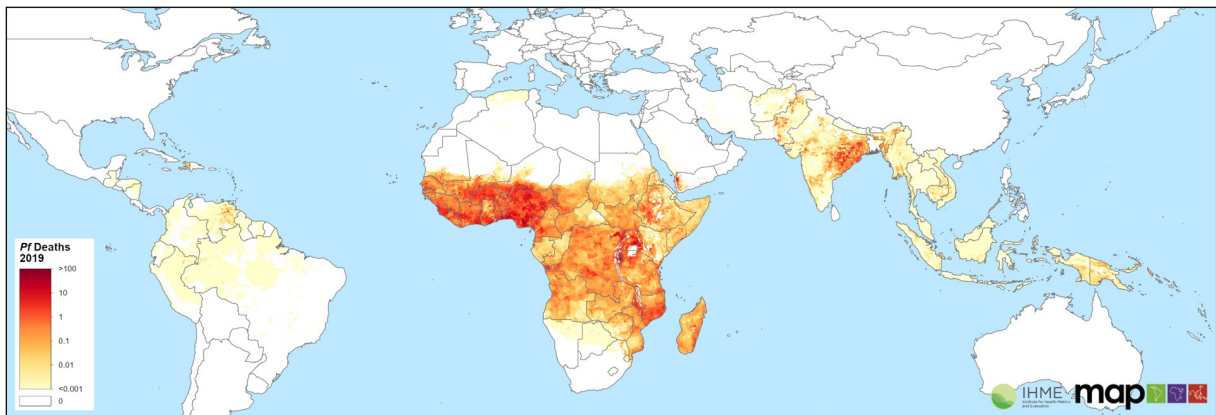
Die Bedrohung, die von Infektionskrankheiten ausgeht, ist in der aktuellen Lage, in der die ganze Welt von einer Pandemie erfasst wurde, omnipräsent. Obwohl die Malaria, die schon als „unangefochtene Königin unter den parasitären Infektionskrankheiten“ bezeichnet wurde, schon seit den 1970er Jahren nicht mehr in Europa endemisch ist (Piperaki & Daikos, 2016), sind der Gefahr einer Malariainfektion weltweit immer noch 3,2 Mrd. Menschen in 97 Ländern ausgesetzt (WHO, 2015). Laut dem aktuellsten World Malaria Report der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2020 wurde die Erkrankungszahl für das Jahr 2019 auf 229 Mio. Fälle geschätzt und etwa 409.000 Menschen starben an einer Malariainfektion (WHO, 2020). Als im Jahr 2000 die *United Nations Millennium Declaration* unterzeichnet und die *Millennium Development Goals* (MDG) festgelegt wurden, war eines der großen Ziele Infektionskrankheiten - und namentlich auch die Malaria - zu bekämpfen (WHO, 2018) und die Inzidenz bis 2015 um 75 % zu verringern (WHO, 2015). Obwohl sich die Inzidenzraten von 2010 bis 2018 von 71 auf 57 Fälle pro 100.000 Personen reduziert haben, stagnieren diese Zahlen seit 2014 (WHO, 2019d). Die weltweite Mortalitätsrate sank zwischen den Jahren 2000 und 2013 von 47 % auf 30 % (WHO, 2018).

Eine Malariaerkrankung stellt nicht nur eine lebensbedrohliche Erkrankung dar, sondern hat auch immense sozioökonomische Auswirkungen. Dies zeigt sich auch in der hohen Korrelation zwischen Malaria-endemischen Gebieten und Armut (Sachs & Malaney, 2002). Neben den direkten Kosten für den/die Patienten/in (z.B. Kauf von Medikamenten und die Reise zum Behandlungsort) und dem Einkommensverlust durch den Arbeitsausfall, fallen auch Kosten für die Regierungen und Gesundheitssysteme an. Diese umfassen die Gesundheitseinrichtungen, Interventionen wie das Sprühen von Insektiziden und die Verteilung von Moskitonetzen und Weiteres. Die direkten Kosten, die durch Malaria verursacht werden, werden dabei auf jährlich mehr als 12 Mrd. US-Dollar geschätzt, wobei die Kosten für den Verlust des Wirtschaftswachstums um ein Vielfaches höher liegen (CDC, 2020).

### 1.1.2 Malaria-Infektionen

*Plasmodium* als Erreger der Malaria gehört zur Gattung der *Apikomplexa* und ist ein einzelliger, eukaryotischer Parasit, welcher von weiblichen *Anopheles* Moskitos auf den Menschen übertragen wird. Es sind fünf humanpathogene *Plasmodien*-Spezies bekannt, die unterschiedliche Formen der Malaria auslösen: *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*, die beide die Malaria tertiana hervorrufen, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass Fieberschübe etwa alle 48 Stunden auftreten. Die Malaria quartana wird durch *Plasmodium malariae* ausgelöst und ruft Fieberschübe an jedem dritten Tag hervor. *Plasmodium knowlesi* stellt eine Sonderform dar. Dieser in Südostasien vorkommende Stamm galt bislang hauptsächlich als gefährlich für Makaken, kann jedoch auch Menschen infizieren (Pain *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2004). Eine akute Malariaerkrankung ist gekennzeichnet durch Fieber, Kopfschmerzen,

Erbrechen, Schwitzen, wobei periodisch auftretendes Fieber das Hauptsymptom für Malariainfektionen ist.



**Abbildung 1: Schätzung der weltweiten *P. falciparum*-Todeszahlen in allen Altersgruppen für 2019**  
(<https://malariaatlas.org/trends/region/MAP/GLOBAL>).

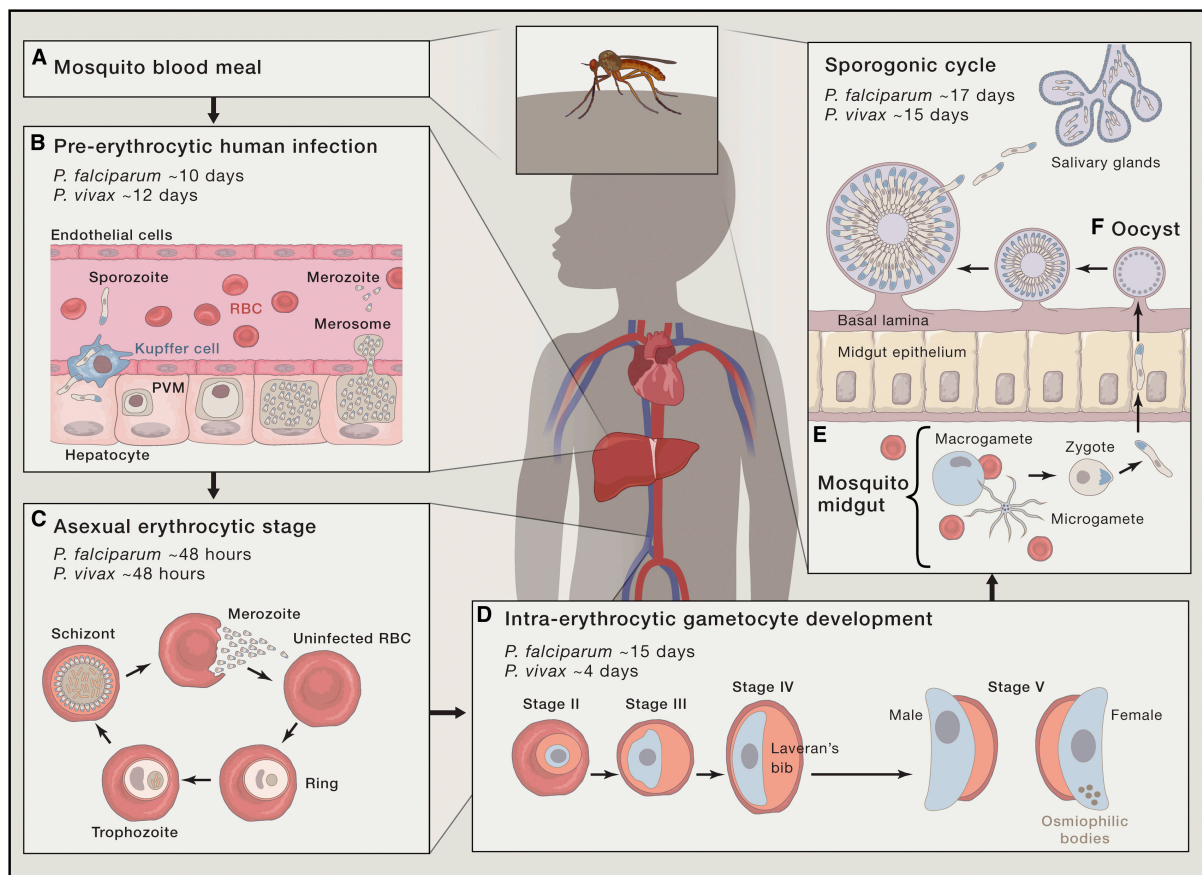
Die häufigste und schwerste Form der Malaria, die Malaria tropica, wird von *Plasmodium falciparum* ausgelöst. Sie macht etwa die Hälfte aller humanen Malariaerkrankungen aus und ist für mehr als 90 % der Todesfälle verantwortlich. Dabei sind Kinder unter fünf Jahren (67 % aller Malaria-Todesfälle) und schwangere Frauen am gefährdetsten. Sub-Sahara-Afrika ist dabei besonders betroffen (Abbildung 1). Dort traten 2018 93 % aller Erkrankungen auf und 94 % aller Todesfälle (WHO, 2019d). Bei dieser Form der Malaria treten die Fieberschübe unregelmäßig auf. Weitere Symptome können Durchfall, Atemnot, Anämie und Nierenversagen sein. Eine Komplikation, die zu einem schweren Verlauf bis zum Tod führen kann, ist die zerebrale Malaria, bei der Erreger in das Nervensystem eindringen. Ohne Therapie kann eine manifestierte Malaria tropica nach wenigen Tagen zum Tod führen. Im Gegensatz zu den Erregern der Malaria tertiana, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* werden aber keine Ruhestadien in der Leber, sogenannte Hypnozoiten, gebildet, die einen erneuten Krankheitsausbruch zu einem späteren Zeitpunkt verursachen können. Co-Infektionen mit anderen Krankheitserregern wie HIV, *Mycobacterium tuberculosis* und Helminthen sind weit verbreitet. HIV-infizierte Erwachsene haben ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf und Tod. Die Gesamtprävalenz der Helminthen-Infektion ist in Malaria-endemischen Gebieten sehr hoch (>50 % der Bevölkerung) und geht mit einer erhöhten Malariaparasitämie einher (Phillips *et al.*, 2017).

### 1.1.3 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Die fünf humanpathogenen *Plasmodien*-Spezies haben einen komplexen Lebenszyklus mit dem Menschen und *Anopheles*-Mücken als Wirt, der sich in den asexuellen Zyklus (Schizogonie) und den sexuellen Zyklus (Gamogonie) unterteilen lässt (Abbildung 2).

Eine Malariainfektion beginnt mit dem Biss einer infizierten weiblichen *Anopheles* Mücke (A). Es sind etwa 70 *Anopheles*-Spezies bekannt, die die Malaria auf den Menschen übertragen können (Sinka *et al.*, 2012). Über den Speichel der Mücke gelangen Sporoziten über den menschlichen Blutkreislauf in die Leber, wo sie Hepatozyten infizieren (B). Dort vermehren sie

sich und zehntausende Merozoiten werden in Merosomen verpackt in den Blutstrom entlassen und dringen dort in Erythrozyten ein.



**Abbildung 2: Der Lebenszyklus von *Plasmodium*.** Der vollständige Lebenszyklus des einzelligen Malaria-parasiten findet in Mensch und Mosquito statt. Dabei gibt es einen asexuellen, intraerythrozytären Vermehrungszyklus, der etwa 48 Stunden dauert. Ein Teil der Parasiten entwickelt sich zu den sexuellen Stadien, die zur Übertragung notwendig sind (Cowman *et al.*, 2016).

In den Erythrozyten findet der bei *Plasmodium falciparum* etwa 48 Stunden andauernde asexuelle Zyklus statt (C). Die Merozoiten reifen zu Ringstadien heran, bevor sie zu Trophozyten und schließlich zu Schizonten werden. Wenn diese rupturieren, entlassen sie eine Vielzahl an Merozoiten ins Blut und der intraerythrozytäre asexuelle Zyklus, welcher die typischen klinischen Symptome hervorruft, beginnt erneut. Das in den Erythrozyten in großen Mengen enthaltene Hämoglobin nutzen die Parasiten dabei als Quelle für Aminosäuren. Als Nebenprodukt entsteht dabei freies Häm, das toxisch ist und zu unlöslichem, kristallinem Hämzoin, auch Malaria-Pigment genannt, umgewandelt und in der Nahrungsvakuole des Erregers gespeichert wird (Francis *et al.*, 1997; Goldberg & Slater, 1992).

Ein Teil der Schizonten entwickelt sich zu den sexuellen Blutstadien, den Gametocyten (D). Unter Stressbedingungen, zum Beispiel bei Anämie, nimmt die Menge der Gametocyten zu. Diese können dann durch die Blutmahlzeit eines Moskitos aufgenommen werden, bilden eine Zygote (E) und reifen in der Mücke schließlich zu Oozysten heran (F). Wenn diese rupturieren, werden Sporozoiten entlassen, die zur Speicheldrüse wandern und bei einem Biss auf den Menschen übertragen werden können (Josling & Llinás, 2015).

### 1.1.4 Die Bekämpfung von Malaria

In Bezug auf die Bekämpfung der Malaria unterscheidet man drei Begrifflichkeiten (WHO, 2019c):

**Malaria-Kontrolle:** Beschreibt die Reduzierung der Krankheitsinzidenz, -prävalenz, -morbidität oder -mortalität auf ein lokal akzeptables Niveau als Ergebnis bewusster Bemühungen. Weiterführende Interventionen sind erforderlich, um die Kontrolle aufrechtzuerhalten.

**Malaria-Eliminierung:** Beschreibt die Unterbrechung der lokalen Übertragung (Reduzierung der Inzidenz einheimischer Fälle auf null) eines bestimmten Malariaparasiten in einem bestimmten geografischen Gebiet als Ergebnis bewusster Aktivitäten. Fortgesetzte Maßnahmen zur Verhinderung der Wiederaufnahme der Übertragung sind erforderlich.

**Malaria-Ausrottung (*Eradication*):** Dauerhafte Reduzierung der weltweiten Inzidenz der durch menschliche Malariaparasiten verursachten Infektion auf null als Ergebnis bewusster Aktivitäten. Sobald die Ausrottung erreicht ist, sind keine Interventionen mehr erforderlich.

Obwohl das Ziel der Ausrottung schon vor 65 Jahren von der WHO ausgerufen wurde, wurde wiederholt in Frage gestellt, ob dies überhaupt zu erreichen sei (The Lancet, 2007). Neben den bereits erwähnten *Millennium Development Goals* der UN gab und gibt es immer wieder internationale Anstrengungen im Kampf gegen Malaria. Darunter sind und waren:

- WHO Global Malaria Eradication Program (Nájera *et al.*, 2011; WHO, 1973, 2019a)
- Malaria Eradication Research Agenda (malERA) (Alonso *et al.*, 2011; Rabinovich *et al.*, 2017)
- MESA Alliance, originally named as the Malaria Eradication Scientific Alliance (MESA Alliance, 2020)
- RBM Partnership to End Malaria (RBM, 2020)
- High Burden to High Impact Approach (HBHI) (WHO, 2019d)
- WHO Global Malaria Programme (WHO, 2014)
- UN Sustainable Development Goals von 2016-2030 (United Nations, 2020)
- WHO Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030 (WHO, 2015)

Inzwischen gibt es eine neue Initiative der *Lancet Commission on Malaria Eradication* „Malaria Eradication within a generation“, die eine Ausrottung der Malaria bis 2050 fordert und für möglich hält (Feachem *et al.*, 2019).

Fast 400 Jahre nach der Entdeckung von Chinin ist dieses als Wirkstoff gegen Malaria auch heute noch von Bedeutung (Achan *et al.*, 2011). Nachdem das „Globale Programm zur Ausrottung von Malaria“ vorübergehend erfolgreich war, gab es einige Rückschläge durch Resistenzbildung im Moskitovektor und in den Parasiten (Nájera *et al.*, 2011). Seit den 1950er Jahren galten Chloroquin und Amodiaquin als die Mittel der Wahl für die Behandlung aller Malariainfektionen. Jedoch entwickelten sich schon kurz nach der Einführung von Chloroquin Resistenzen in den Malaria-endemischen Ländern Kolumbien und Venezuela, welche sich nach Südamerika, Südostasien, Indien und in die östlichen Regionen Afrikas ausbreiteten (Payne, 1987; Wellems & Plowe, 2001).

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte durch den Einsatz von Insektizid-behandelten Moskitonetzen und effektivere Therapien gemacht werden (Tse *et al.*, 2019). Bei einer Infektion mit *P. falciparum* empfiehlt die WHO heute Artemisinin-basierte Kombinations-therapien (ACTs) zur Behandlung der unkomplizierten Malaria. Durch die Kombination zweier Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen sind ACTs die wirksamsten Malaria-medikamente, die aktuell zur Verfügung stehen. Dabei sollte sich die Wahl der ACT auf die Ergebnisse von Studien zur therapeutischen Wirksamkeit gegen lokale Stämme von *P. falciparum* Malaria stützen (White, 2008; WHO, 2021). Schwere Verläufe sollten mit injizierbarem Artesunat behandelt werden, gefolgt von einer vollständigen Behandlung mit einer oralen ACT über drei Tage (White *et al.*, 2014; WHO, 2021). Die zunehmende Resistenzbildung macht eine Suche nach neuen Wirkstoffen mit anderen Wirkmechanismen dringlich (Tilley *et al.*, 2016; Tse *et al.*, 2019).

Die derzeit verwendeten Malariamedikamente sind in sieben Klassen unterteilt: 4-Amino-chinoline, Arylaminoalkohole, 8-Aminochinoline, Artemisinine, Antifolate, Inhibitoren der Atmungskette und Antibiotika (Schlitzer, 2008).

Neben der Behandlung der akuten Erkrankung sind weitere Angriffspunkte zur Bekämpfung der Malaria die Prävention (zum Beispiel durch Bettnetze, Insektenschutzmittel und medikamentöse Prophylaxe) und das *Transmission Blocking*, die Verhinderung der Übertragung. Dies kann geschehen, indem keine sexuellen Stadien mehr im menschlichen Wirt gebildet werden, oder dadurch, dass diese im Vektor nicht weiter heranreifen und übertragen werden können oder durch die Eliminierung der Moskitos als Vektor. In der Vergangenheit wurden auch gute Erfolge in der Vektorkontrolle durch das Insektenvernichtungsmittel DDT erreicht, jedoch bildeten sich auch hier schnell Resistenzen (Enayati & Hemingway, 2010; Nájera *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2017).

Ein Impfstoff gegen Malaria wäre ein wichtiges Instrument zur Prävention. Hierzu wird schon seit den 1960er Jahren geforscht (Hill, 2011). Die sich in der Entwicklung befindlichen Impfstoffe können in drei Kategorien unterteilt werden, die auf verschiedene Parasitenstadien abzielen: das präerythrozytäre Stadium/Sporozoit (Blockierung der Invasion in die Hepatozyten und Verhinderung einer Infektion mit Blutstadien), die Blutstadien (Immunisierung mit Antigenen zur Begrenzung des Parasitenwachstums) und das Übertragungsstadium (gezielte Gametozytenbekämpfung zur Verhinderung der Übertragung). Zusätzlich gibt es Multistadienimpfstoffe, die auf verschiedene Stadien abzielen (Cockburn & Seder, 2018; Metzger *et al.*, 2020). In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten wurden große Anstrengungen und Forschungsmittel in die Entwicklung von Malariaschutzimpfungen gesteckt. Es konnten einige Kandidaten identifiziert werden, die auf die Blutstadien des Parasiten abzielen. Die meisten Impfstoffkandidaten befinden sich in Phase-I-Studien, hatten akzeptable Sicherheitsprofile und eine starke Immunogenität, wenn sie homologen Parasitenstämmen ausgesetzt waren (Salamanca *et al.*, 2019). Die Wirksamkeit der Impfstoff-Kandidaten nahm jedoch ab, wenn sie heterologen Stämmen ausgesetzt waren, was erneut die Dringlichkeit einer Verbesserung der Malariaschutzimpfungen zeigte. Eine große Herausforderung ist die hohe Variabilität der *Plasmodium*-Antigene (Cockburn & Seder, 2018; Metzger *et al.*, 2020; Salamanca *et al.*,

2019). Der nach drei Jahrzehnten Forschungsarbeit am weitesten fortgeschrittene verfügbare Impfstoff ist der präerythrozytäre, gegen Sporozoitene wirksame Impfstoff RTS,S/ATS01. Während der Phase-III-Studie und einer 18-monatigen Nachbeobachtung variierte die Gesamtwirksamkeit des Impfstoffs je nach Alter und Faldefinition zwischen 5-45 % (Metzger *et al.*, 2020) und wurde 2015 von der europäischen Arzneimittel-Agentur für Kleinkinder zugelassen (Feachem *et al.*, 2019). Ein Impfstoff mit einer Wirksamkeit von 75 % und mehr, wie von der WHO gefordert, ist jedoch in absehbarer Zeit unerreichbar (Salamanca *et al.* 2019; Metzger *et al.* 2020). Seit 2019 läuft eine Phase-IV-Studie mit einer großangelegten Pilotkampagne in Malawi, Ghana und Kenia (Maxmen, 2019; Metzger *et al.*, 2020; WHO, 2019b). Dennoch befürchten Experten, dass ein wirksamer Impfstoff mit langanhaltendem Schutz nicht vor 2035 zur Verfügung steht, wenn überhaupt jemals (Feachem *et al.*, 2019). Es scheint unwahrscheinlich, dass Malaria-Impfstoffe die bestehenden Instrumente zur Malaria-Kontrolle ersetzen werden, es sei denn, es könnte eine komplette Immunität erreicht werden. Vielmehr ist zu erwarten, dass Vakzine ein Bestandteil von Malariakontrollprogrammen sein werden, zusätzlich zu weiteren Maßnahmen wie Zugang zu einer schnellen Diagnostik, Behandlung mit ACTs, der Einsatz von langlebigen Insektizid-behandelten Moskitonetzen und das Besprühen von Innenräumen mit geeigneten Insektiziden (Matuschewski, 2017).

## 1.2 Redoxmetabolismus in *Plasmodium falciparum*

### 1.2.1 Oxidativer Stress

Der Begriff "Oxidativer Stress" wurde in den 1980er Jahren von Helmut Sies geprägt. Er definiert ihn als „eine Störung des Prooxidantien-Antioxidantien-Gleichgewichts zu Gunsten des ersteren, das potenziell zu Schäden führt“ (Sies, 1997).

Sauerstoff als die Lebensgrundlage für fast alle Lebewesen existiert in seiner freien Form seit mehr als zwei Milliarden Jahren auf der Erde. Etwa 50 bis 100 Mio. Jahre nach seiner Entstehung hat der sehr geringe Gehalt an Luftsauerstoff deutlich zugenommen. Dieses Ereignis ist als das Große Oxidationsereignis (*Great Oxygenation Event*) bekannt. Mögliche Erklärungen sind, dass Sauerstoff ein Abfallprodukt des Stoffwechsels der ersten Lebensformen war, dass Pflanzen begannen, Sauerstoff durch Photosynthese zu produzieren, oder dass geologische Prozesse den Sauerstoffanstieg kontrollierten (Holland, 2006; Kasting, 1993; Yang *et al.*, 2018). Der kontinuierliche Anstieg der Sauerstoffkonzentrationen bis zu 21 % in der heutigen Atmosphäre bereitete diesen ersten Organismen Probleme. Die sich entwickelnde Ozonschicht verhinderte das ungehinderte Eindringen der energiereichen UV-Strahlen, was die Grundlage für die Bildung vieler lebenswichtiger Verbindungen war. Da in der Atmosphäre genügend Sauerstoff vorhanden ist, um ein Leben ohne Photosynthese zu ermöglichen, erfolgt die Oxidation nur mit aerober Energie aus einem sauerstoffabhängigen Substrat. Organismen haben sich im Verlauf der Evolution an die Sauerstoffbelastung angepasst und diese zu ihrem Vorteil genutzt. Sauerstoff ist nicht nur die Lebensgrundlage für viele Lebewesen, einschließlich des Menschen, sondern nach wie vor bedrohlich. Aufgrund seiner paramagnetischen diradikalen Struktur ist er sehr reaktiv und bedroht das reduzierende Milieu der Zellen (Goody & Walker, 1985). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden von allen

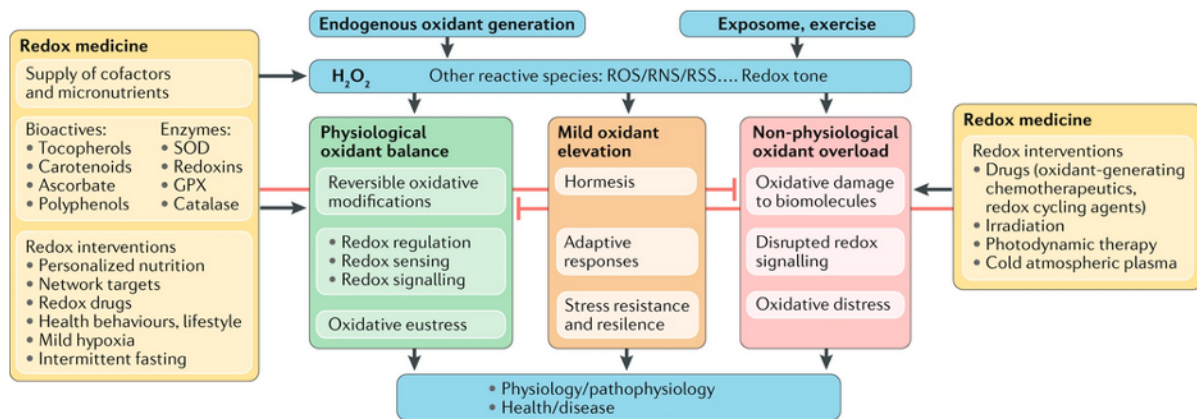
aeroben Organismen produziert und haben wichtige physiologische Funktionen, sind als oxidativer Stress aber auch an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt. ROS sind instabile und reaktive Moleküle, die Sauerstoff enthalten. Der Begriff ROS fasst eine Gruppe von Molekülen mit unterschiedlichen Eigenschaften und physiologischen sowie pathophysiologischen Funktionen zusammen (Tabelle 1). Einige davon sind Radikale und haben ein ungepaartes Elektron.

**Tabelle 1: Radikalische und nicht-radikalische ROS** (Sies & Jones, 2020).

Nicht-radikale ROS	ROS Radikale
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Superoxid-Anion-Radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )
Organische Hydroperoxide (ROOH)	Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ )
Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ )	Peroxyradikal ( $\text{rOO}\cdot$ )
elektronisch angeregtes Carbonyl (RCO)	Alkoxyradikal ( $\text{rO}\cdot$ )
Ozon ( $\text{O}_3$ )	
Hypochlorige Säure (HClO) und Hypobromige Säure (HOBr)	

Zusätzlich zu den ROS spielen auch weitere reaktive Spezies wie Stickstoffspezies (RNS), die sich von NO ableiten, reaktive Sulfur-Spezies (RSS), reaktive Carbonyl-Spezies (RCS) und reaktive Selenspezies eine Rolle in der Redox-Biologie (Sies *et al.*, 2017). Mechanismen, die zur ROS/RNS-Produktion in Organismen führen, sind beispielsweise: unerwünschte Nebenprodukte im mitochondrialen Elektronentransport, Enzyme wie Dehydrogenasen und Oxidasen, das Immunsystem und exogene Faktoren wie UV-Strahlen, Luftverschmutzung, Medikamente und Chemikalien (Brieger *et al.*, 2012). Dennoch sind RNS und ROS nicht *per se* schädlich, sondern haben eine wichtige regulatorische Funktion, deren Bedeutung immer mehr in den Fokus rückt (Kawagishi & Finkel, 2014; Ristow, 2014; Sies & Jones, 2020). Dabei beschreibt der Begriff *Oxidative Eustress* (griechisch *eu*, für "gut", "positiv") eine Aufrechterhaltung eines physiologischen Niveaus, welches wesentlich für die Steuerung von Prozessen durch Redox-Signale ist (Sies *et al.*, 2017; Sies & Jones, 2020).

Der Redox-Medizin wird das Potential zugeschrieben, Oxidationslevel zum therapeutischen Nutzen zu modulieren. Erhöhte Konzentrationen von Oxidantien sollen dabei kontrolliert werden, um die Toxizität im Zusammenhang mit oxidativem Stress (der zum Zelltod und zur Gewebedegeneration führt) zu verhindern und die Redox-Balance aufrechtzuerhalten. Dabei wurde *ROS-Scavenging* als Strategie zur Verlängerung der Lebensspanne und zur Krebsprävention vorgeschlagen. Eine Möglichkeit, die ROS-Level zu kontrollieren, ist die Zufuhr von Co-Faktoren (vor allem Nikotinamid-Nukleotide und Flavine), die für die meisten Redox-Reaktionen essentiell und daher für das richtige Redox-Gleichgewicht erforderlich sind. Ein weiterer Ansatz ist die Zufuhr von Antioxidantien und kleiner bioaktiver Moleküle als Bausteine und Komponenten von Enzymen wie Thioredoxin, Glutaredoxin und Peroxiredoxin, Glutathionperoxidase (GPx) und Superoxiddismutasen (SODs) (siehe Abbildung 3). Unter bestimmten Umständen, wie z.B. bei Krebserkrankungen sowie zur Stärkung der Immunantwort und der Erregerabwehr, könnte es vorteilhaft sein, eine erhöhte ROS-Erzeugung zu induzieren, um oxidativen Stress zu verursachen und die Zellabtötung zu fördern (Sies & Jones, 2020).



**Abbildung 3: ROS und andere aktive Spezies können über verschiedene endogene Quellen erzeugt werden.** Die Gesamtheit der Expositionen (chemische und biologische Agenzien, Strahlung, psychosoziale Komponenten, Ernährung, Bewegung und Lebensstil), das so genannte Exposom, hat einen wichtigen Einfluss auf die Oxidationslevel. Die physiologischen Konzentrationen von Oxidantien unterstützen die Physiologie (oxidativer Eustress), während eine übermäßige Exposition Schäden verursacht (oxidativer Distress). Eine milde Erhöhung des Oxidationslevels führt zur Anpassung an Stress und Belastbarkeit (ein als Hormesis bekanntes Konzept) (Sies & Jones, 2020).

Dieser Ansatz ist auch besonders interessant für die Bekämpfung des Malariaparasiten, der in einer prooxidativen Umwelt lebt und ein komplexes antioxidatives Verteidigungssystem besitzt, welches einen guten Angriffspunkt für Medikamente bietet. Redox-Cycling-Medikamente, wie beispielsweise Methylenblau (Akoachere *et al.*, 2005), werden bereits in klinischen Phasen gegen Malaria getestet (Dicko *et al.*, 2018; Jorge *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2018).

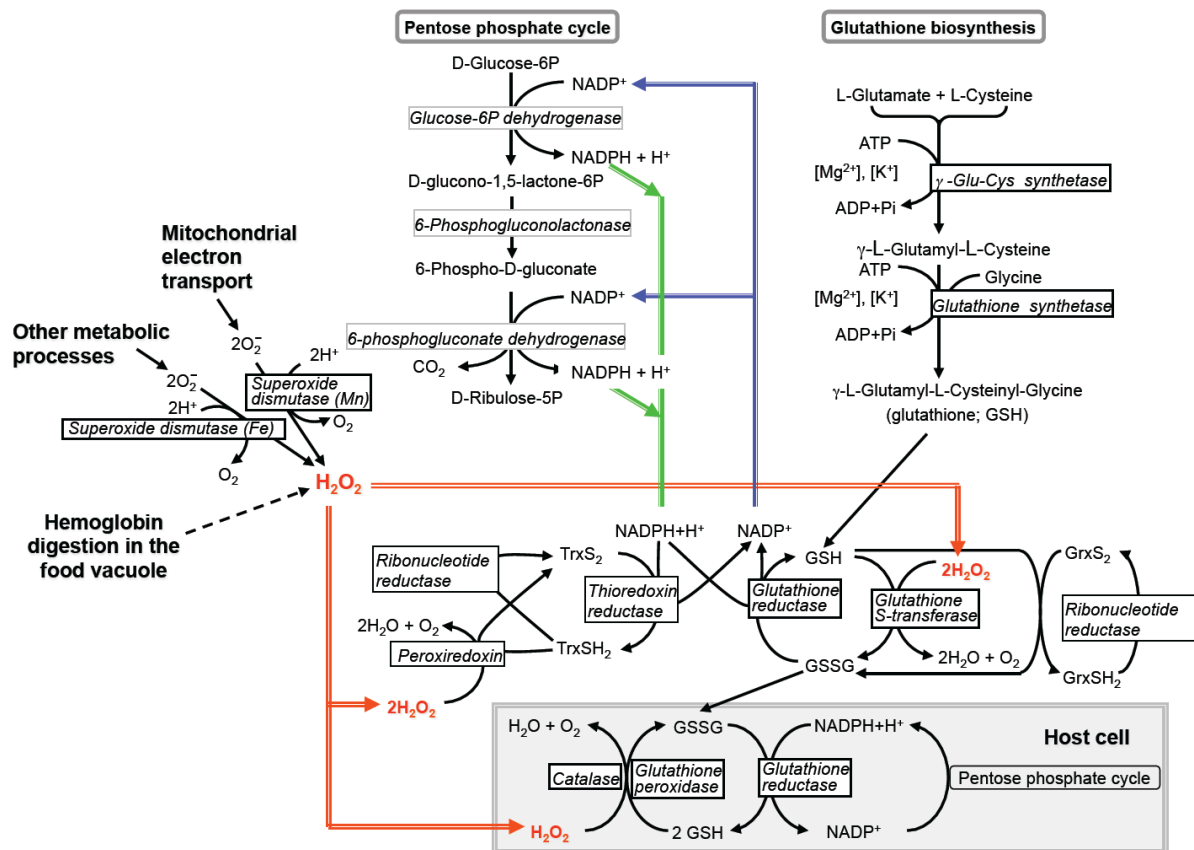
### 1.2.2 Quellen von oxidativem Stress bei *Plasmodium falciparum* und seine Abwehrsysteme

Während ihres komplexen Lebenszyklus müssen sich die Malariaparasiten an verschiedene Umgebungen anpassen und sind dabei Angriffen des Wirtsimmunsystems ausgesetzt, haben hohe Proliferationsraten und verdauen das Hämoglobin der humanen Erythrozyten, wodurch prooxidatives Häm produziert wird (Becker *et al.*, 2004). Der Abbau von Hämoglobin zur Gewinnung von Aminosäuren stellt dabei die Hauptquelle für ROS dar (Müller, 2004). Um dem oxidativen Stress entgegenzuwirken, braucht der Parasit ein komplexes antioxidatives Abwehrsystem. Dieses umfasst die beiden interagierenden, NADPH-abhängigen Glutathion- und Thioredoxinsysteme, Plasmoredoxin, fünf Peroxiredoxine, Glutaredoxin und Glutaredoxin-ähnliche Proteine, eine Glutathion-S-Transferase (GST) mit Peroxidase-Aktivität und zwei Superoxiddismutasen (Abbildung 4). Bemerkenswert ist außerdem, dass *Plasmodium* keine Katalase und keine klassische Glutathionperoxidase (GPx) besitzt (Jortzik & Becker, 2012). Das Redoxsystem und dessen Kompartimentierung wurden schon im Detail untersucht und beschrieben (Kehr *et al.*, 2010).

Am Beispiel des Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangels (G6PD), von dem weltweit etwa 400 Millionen Menschen betroffen sind, zeigt sich, dass die verminderte Verfügbarkeit von NADPH als reduzierendem Agens zum Teil vor Malaria schützt. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass das Verbreitungsgebiet dieses vererbaren Enzymdefektes sich weitgehend



mit Malaria-endemischen Gebieten deckt (Howes *et al.*, 2013; Luzzatto & Seneca, 2014; Peters & Van Noorden, 2009).



**Abbildung 4: Das antioxidative Abwehrsystem von *Plasmodium*.** Das Glutathion- und Thioredoxinsystem ist von zentraler Bedeutung bei der Abwehr von oxidativem Stress und zur Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase im Parasiten. Beide Systeme sind NADPH-abhängig, welches insbesondere im Pentosephosphatweg gebildet wird. Zur Abwehr von oxidativem Stress gibt es auch Interaktionen mit dem umgebenden Erythrozyten (Becker *et al.*, 2004).

Die Redox-Balance, das antioxidative Abwehrsystem sowie effizientes *Redox-Signalling* sind für den Parasiten von großer Bedeutung und stellen interessante Angriffspunkte für die zielgerichtete Medikamentenentwicklung dar; sie sind außerdem an den Mechanismen der Medikamentenwirkung und Resistenz beteiligt (Becker *et al.*, 2004; Blasco *et al.*, 2017; Jortzik & Becker, 2012).

### 1.2.3 Das Gluthationsystem

Glutathion ist ein Tripeptid, das aus L-Glutamat, L-Cystein und Glycin von der ATP-abhängigen  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthase und der Gluthationsynthase im Zytosol synthetisiert wird und an der Redoxregulation, Genexpression, Signaltransduktion und Apoptose beteiligt ist (Sies, 1999). Als eines der wichtigsten niedermolekularen Antioxidantien und Redoxpuffer in eukaryotischen Zellen unterstützt Glutathion in erster Linie die Redoxhomöostase und gilt als repräsentativer Indikator für den Redox-Status von Zellen. Innerhalb der Zellen kann Glutathion in zwei verschiedenen Formen vorliegen, reduziert als GSH und oxidiert als Gluthiondisulfid (GSSG) (Müller, 2015; Valko *et al.*, 2007). Unter oxidativem Stress erhöht sich das Verhältnis GSH/GSSG. Als eines der wichtigsten Antioxidantien ist es in fast allen

Zellen in niedrigen millimolaren Konzentrationen (0,5-10 mM) vorhanden (Dalle-Donne *et al.*, 2007; Pastore *et al.*, 2003), wobei die Verteilung von Glutathion innerhalb der Zellen offenbar nicht ganz gleichmäßig ist: 1-11 mM im Zytosol, 3-15 mM im Nukleus und 5-11 mM in den Mitochondrien (Valko *et al.*, 2007).

Die wichtigsten Schutzfunktionen des Glutathions gegen oxidativen Stress sind folgende:

- es dient als Co-Faktor von antioxidativen Enzymen wie der Glutathion-S-Transferase (GST), von GPx, der Glyoxalase und weiteren Enzymen
- als nicht-enzymatischer Scavanger von Hydroxyl-Radikalen, Superoxidanionen und Singulett-Sauerstoff
- zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid und Lipidperoxiden (durch die katalytische Wirkung von GPx)
- sowie zur Regeneration wichtiger Antioxidantien zurück zu ihren aktiven Formen (Vitamin C und E) (Valko *et al.*, 2007).

Wie in vielen anderen Zellen ist Glutathion mit einer Konzentration von 2 mM auch das am häufigsten vorkommende Antioxidans in *Plasmodium* und damit in deutlich höherer Konzentration vorhanden als NADPH (<100 µM) und Thioredoxin (<50 µM) (Becker *et al.*, 2003). Oxidiertes Glutathion wird kontinuierlich von der Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch reduziert und erhält damit das reduzierende Milieu der Zellen aufrecht. Zusätzlich kann es aus der Zelle exportiert werden, um das intrazelluläre GSH/GSSG-Verhältnis aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus kann es mit zellulären Proteinen gemischte Disulfide bilden, wobei reduzierte intrazelluläre Glutathionkonzentrationen durch *De-Novo*-Synthese ausgeglichen werden können (Masella *et al.*, 2005). *Plasmodium falciparum* besitzt ein vollständiges Glutathionssystem mit einer spezifischen Glutathionreduktase (*PfGR*) (Abbildung 4) (Becker *et al.*, 2003; Müller, 2015). Das Flavoenzym ist ein Homodimer, das über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Die *PfGR* liegt sowohl im Zytosol als auch im Apicoplasten vor (Kehr *et al.*, 2010). Die GR von Malariaparasiten erwies sich überraschenderweise nicht als essentiell für die *P. berghei* Blutstadien *in vivo*, da weiterhin lebensfähige und infektiöse Parasiten gebildet wurden. Jedoch ist sie essentiell für die Entwicklung in der Mücke (Buchholz *et al.*, 2010; Pastrana-Mena *et al.*, 2010). Für *P. falciparum* ist noch nicht abschließend geklärt, ob die GR essentiell ist. Sie könnte dennoch ein geeignetes *drug target* zur Entwicklung neuer Moleküle darstellen, da ihre Struktur bekannt ist und eine biochemische und enzymkinetische Charakterisierung vorliegt (Böhme *et al.*, 2000; Sarma *et al.*, 2003). Dies wird auch dadurch unterstützt, dass die humane GR (hGR) sich strukturell von der *PfGR* unterscheidet. Außerdem wurde gezeigt, dass ein Mangel von FAD als prosthetische Gruppe oder NADPH als Substrat, ähnlich wie beim G6PD-Mangel, zu einem Schutz vor Malaria führt (Sarma *et al.*, 2003).

### 1.3 Genetisch kodierte Redox-Sonden in *Plasmodium falciparum*

Quellen oxidativen und nitrosativen Stresses bei parasitären Protozoen und Methoden zur Messung von Redox-Veränderungen unter oxidativem, pharmakologischem oder metabolischem Stress wurden vor einigen Jahren vergleichend zusammengefasst (Rahbari *et al.*, 2015). Die Eignung von Methoden zur Untersuchung von Redox-Stress in *Plasmodium* wurden systematisch untersucht und verglichen. Darunter waren solche, die die Zellintegrität zerstören und einige, bei denen sie erhalten bleibt. Dazu gehörten unter anderem molekulare Sonden wie CM-H<sub>2</sub>DCFDA und Thiol Tracker™ Violett, biochemische Assays mit Ellmans-Reagenz und Naphthalene-2,3-Dicarboxaldehyde (NDA) sowie der genetisch kodierte Biosensor hGrx1-roGFP2 (Mohring *et al.*, 2016).

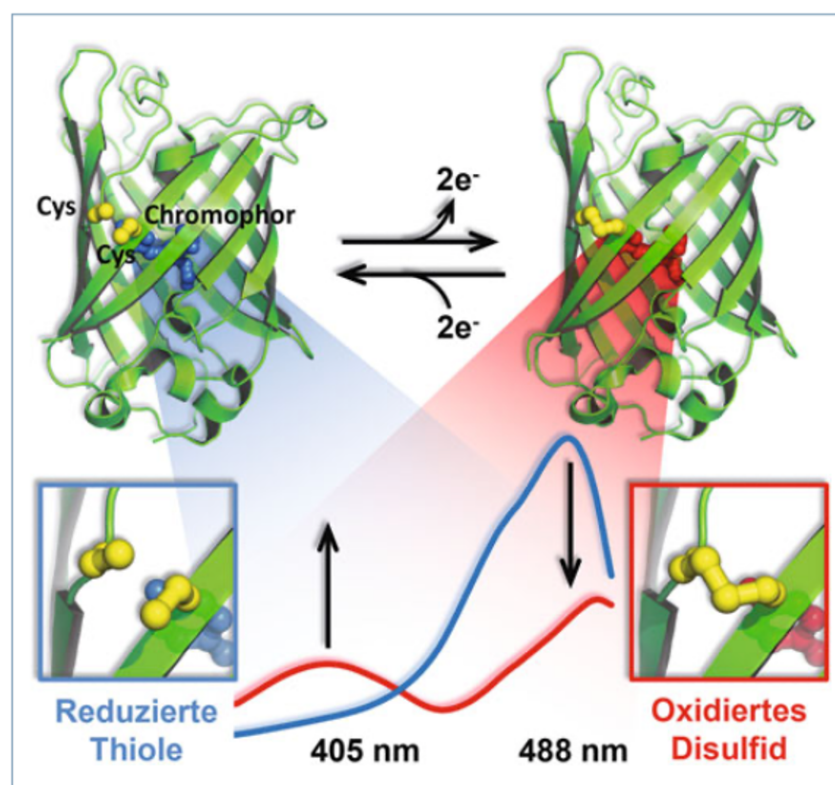
Genetisch kodierte, Fluoreszenz-basierte Redox-Sensoren wurden bereits als gute Werkzeuge zur Bestimmung des Glutathion-abhängigen Redoxpotenzials in lebenden Parasiten beschrieben. Redox-sensitive GFP-basierte Sensoren (roGFP) wurden unter anderem erfolgreich in (Mirko-)Organismen wie *Arabidopsis thaliana* (Meyer *et al.*, 2007), HeLa-Zellen (Gutscher *et al.*, 2008), Hefe (Morgan *et al.*, 2011), *Drosophila melanogaster* (Albrecht *et al.*, 2011), *Salmonella enterica* (Van Der Heijden *et al.*, 2015) *Staphylococcus aureus* (Van Loi & Antelmann, 2020) und *Trypanosoma brucei* (Ebersoll *et al.*, 2020) eingesetzt. Die episomale Transfektion, Eignung und Anwendung von genetisch kodierten Redox-Sonden in *Plasmodium* wurde bereits in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten publiziert (Kasozi *et al.*, 2013; Mohring *et al.*, 2016; Rahbari, Rahlfs, Jortzik, *et al.*, 2017; Rahbari, Rahlfs, Przyborski, *et al.*, 2017). Neben der Überwachung medikamenteninduzierten Redox-Veränderungen im Zytosol konnten sie auch erfolgreich in Organellen eingebracht und damit dort das Redox-Potential bestimmt werden. Ein Teil der vorliegenden Arbeit hatte das Ziel, zuverlässige und hochempfindliche Instrumente zur Untersuchung des Redox-Stoffwechsels und der Mechanismen der Arzneimittelwirkung und -resistenz in *Plasmodium* weiter zu optimieren und diese Methode der breiteren Malaria-Forschungsgemeinschaft zugänglich zu machen. Dies wurde in Teilen schon veröffentlicht (Schuh *et al.*, 2018).

#### 1.3.1 roGFP als Redox-Sensor

Für die Entdeckung des *Green Fluorescent Proteins* (GFP; grün fluoreszierendes Protein) aus *Aequorea Victoria* wurde 2008 der Nobelpreis für Chemie verliehen (NobelPrize.org, 2008; Sanders & Jackson, 2009). Seit der Entdeckung des Proteins in den 1960er Jahren (Shimomura *et al.*, 1962) gibt es eine enorme Vielfalt an verschiedenen GFP-Varianten (FBP, 2020) mit einer Vielzahl von Anwendungen. Die GFP-Expression gekoppelt an Proteine kann zur Überwachung der Genexpression und Proteinlokalisierung in lebenden Organismen verwendet werden (Chalfie *et al.*, 1994), die mittels Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und andere fluoreszenzbasierte Methoden erfasst werden können.

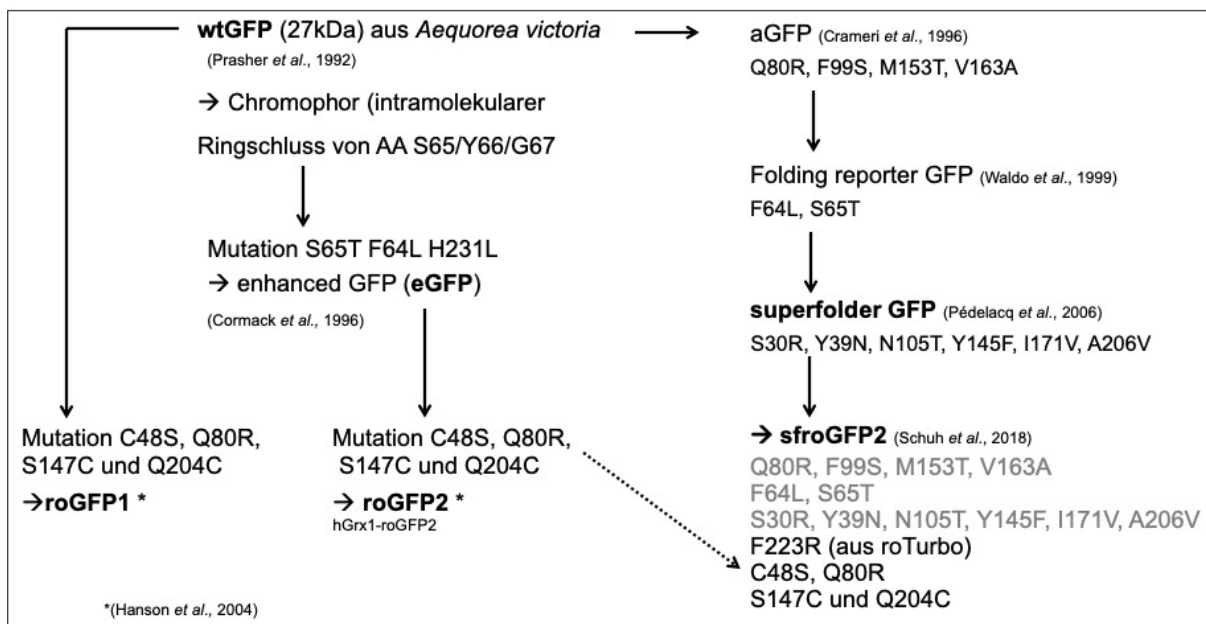
GFP besteht aus 238 Aminosäuren, einschließlich eines Fluorophors (Prasher *et al.*, 1992), das durch intramolekulare Zyklisierung von drei Aminosäuren gebildet wird (S65/Y66/G67). Während bei den meisten fluoreszierenden Proteinen die Protonierung des Chromophors zu einer Auslöschung der Fluoreszenz führt, fluoresziert das Wildtyp-GFP-Chromophor sowohl

im deprotonierten als auch im protonierten Zustand und zeigt zwei Exzitationsspitzen. GFP ist resistent gegenüber Proteasen und stabil bei physiologischen pH-Werten und eignet sich zur Entwicklung von Sonden (Meyer & Dick, 2010). Um ein Redox-sensitives GFP (roGFP) zu generieren, wurden artifiziell zwei redox-aktive Cysteine (S147C/Q204C) in der Nähe des Chromophors eingefügt, die ein Disulfid bilden können (Hanson *et al.*, 2004). RoGFP2 zeigt, wie auch das wtGFP, zwei Exzitationsspitzen bei 395 nm und 475 nm, wobei der erste Peak der protonierten, neutralen Form und der zweite Peak der deprotonierten, anionischen Form entspricht. Das bedeutet, dass sich in Abhängigkeit des Oxidationsstatus des Proteins das Spektrum verändert (Abbildung 5). Das Emissionsmaximum liegt bei 509 nm (Meyer & Dick, 2010). Ein besonderer Vorteil dieser Sonden ist, dass ihre Messung ratiometrisch ist und daher unabhängig von der absoluten Proteinmenge der Sonde.



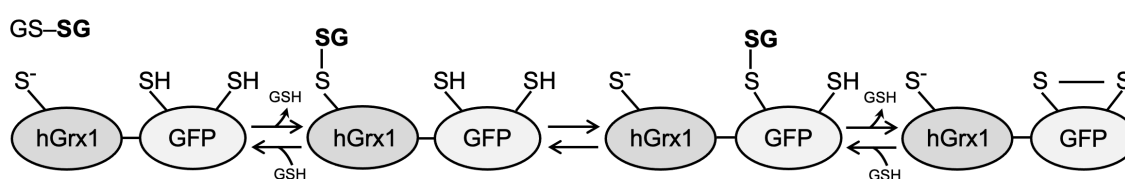
**Abbildung 5: Veränderungen des Spektrums von roGFP2 in Abhängigkeit des Oxidationsstatus.** In reduzierter Form liegt roGFP2 deprotoniert vor und zeigt ein Maximum in der Nähe von 488 nm (blaue Kurve). Durch Oxidation wird das Chromophor protoniert und die Disulfidbrücken geschlossen und kann bei 405 nm angeregt werden (rote Kurve) (Morgan & Schwarzländer, 2016).

Es gibt eine ganze Reihe von roGFPs, die auf verschiedenen Varianten des GFP basieren und sich in ihrer *Dynamic Range*, dem *Mid-point Potential* und ihrer pH-Sensitivität unterscheiden. Verschiedene genetisch kodierte Redox-Sensoren wurden kürzlich ausführlich in einer Übersichtsarbeit beschrieben und verglichen (Kostyuk *et al.*, 2020). RoGFP1 basiert auf dem wtGFP und roGFP2 basiert auf dem enhanced GFP (eGFP), welches drei Mutationen enthält (siehe auch Abbildung 6). Die S65T-Mutation verschiebt den Exzitationspeak zu 488 nm und zur Deprotonierung des Chromophors. Das *Mid-point Potential* von roGFP2 bei pH 7 ist -280 mV und ist etwas höher als bei roGFP1 (Meyer & Dick, 2010).



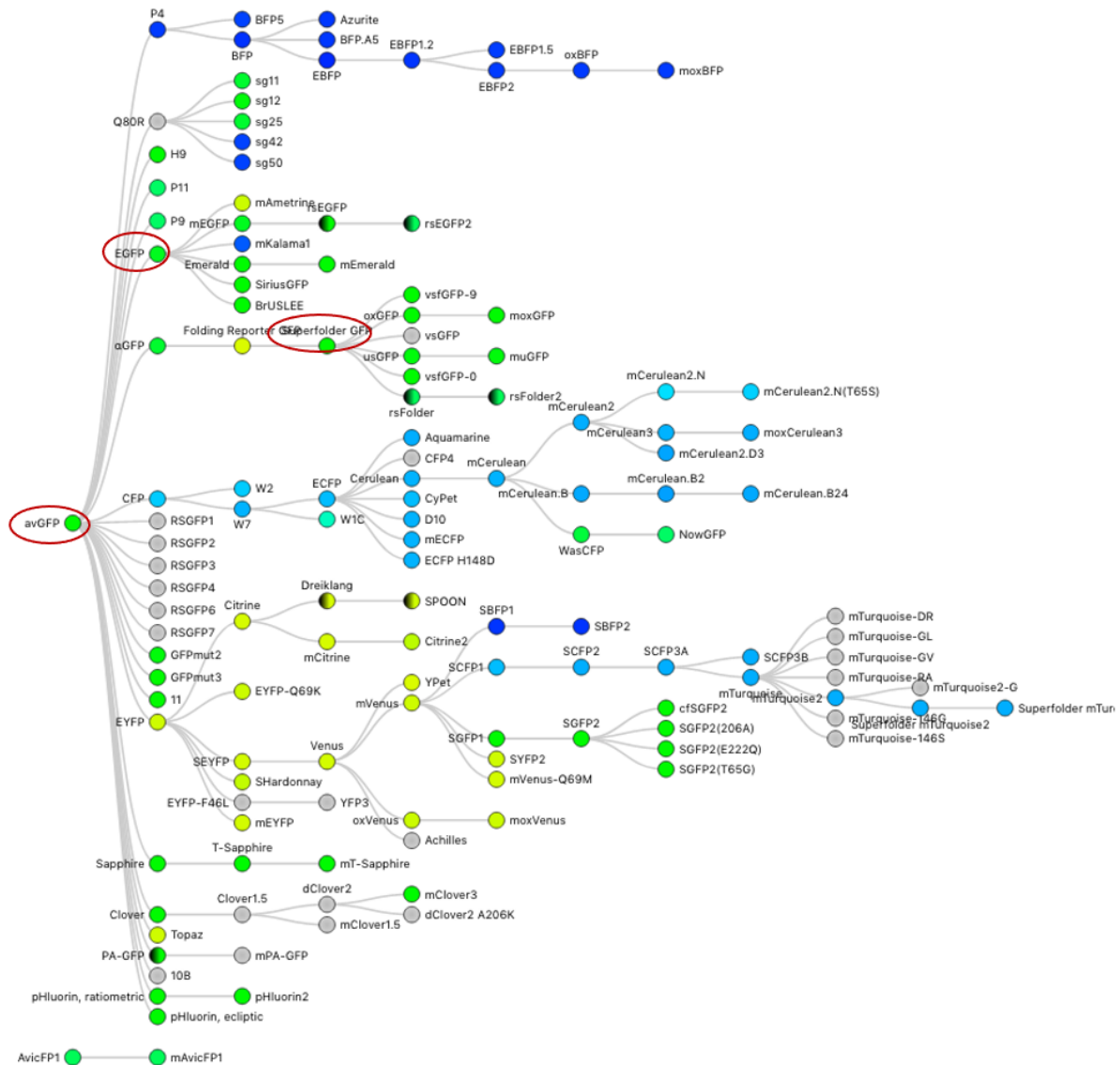
**Abbildung 6: Ableitung verschiedener roGFPs vom wtGFP.** SfroGFP2 enthält die roGFP2-Mutationen, die von Hanson *et al.* beschrieben wurden, die superfolder-Mutationen inklusive der *folding-enhancing*, *enhanced-GFP* und *cycle-3*-Mutationen (Pédrelacq *et al.*, 2006) und die F223R Mutation von *roTurbo* (Dooley *et al.*, 2012).

RoGFP2 equilibriert sich mit dem Glutathionredox-Paar und reagiert unter physiologischen Bedingungen nicht mit reaktiven Sauerstoffspezies (Meyer & Dick, 2010). Diese Equilibrierungsreaktion mit GSH/GSSG wird von Grx katalysiert und dadurch beschleunigt (Abbildung 7). Um die Sensitivität von roGFP für den Redox-Zustand des Glutathions zu erhöhen, wurde humanes Glutaredoxin-1 (hGrx1) an den N- oder C-Terminus von roGFP fusioniert. hGrx1 katalysiert ein schnelles Redox-Gleichgewicht zwischen Glutathion und roGFP2, sodass der Sensor nanomolare Veränderungen von GSSG vor dem Hintergrund des millimolaren GSH innerhalb von Sekunden detektieren kann (Gutscher *et al.*, 2008).



**Abbildung 7: Der Glutathion-Biosensor hGrx1-roGFP2 ist eine Fusion aus humanem Glutaredoxin 1 (hGrx1) mit roGFP2.** Alle Schritte sind reversibel, wodurch sich der Sensor an den zellulären Redox-Status anpassen kann und dynamische Messungen möglich sind (nach Meyer & Dick, 2010).

Seit der Entdeckung des GFP vor mehr als 50 Jahren sind zahlreiche Varianten des Proteins mit unterschiedlichen Eigenschaften entstanden. Abbildung 8 zeigt einen Stammbaum der FPbase, der die Entstehung der Varianten zeigt.

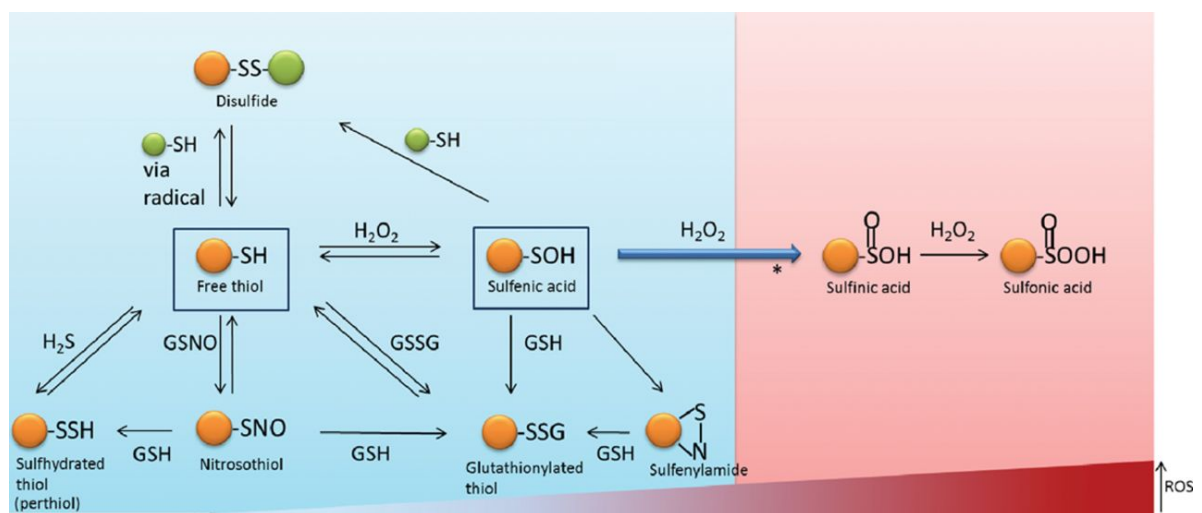


**Abbildung 8: Varianten von GFP basierend auf dem GFP aus *Aequorea Victoria*.** Seit der Entdeckung des GFP in den 1960er Jahren sind vielzählige Varianten entstanden. Basierend auf den verschiedenen GFP-Varianten wurden auch unterschiedliche roGFPs entwickelt (modifiziert nach FBP, 2020).

Ebenso haben sich neben roGFP1 und roGFP2 weitere Redox-sensitive GFP-Varianten entwickelt, wie zum Beispiel roClover, roTurbo und sfroGFP2, welches in dieser Arbeit untersucht wurde. SfroGFP2 wurde im Labor von Myles Akabas, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA, entwickelt und in Kooperation mit dem Labor von David Fidock stabil in *P. falciparum* NF54*attB*-Parasiten integriert. SfroGFP2 ist eine roGFP2-Variante, die den vollständigen Satz an superfolderGFP-Mutationen (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V, A206V) sowie die Cycle-3-Mutationen (F99S, M153T, V163A) umfasst. Darüber hinaus wurde die F223R-Mutation aus der roTurbo-Sonde eingefügt, welche in Abbildung 6 dargestellt sind (Dooley *et al.*, 2012; Pédelacq *et al.*, 2006; Schuh *et al.*, 2018).

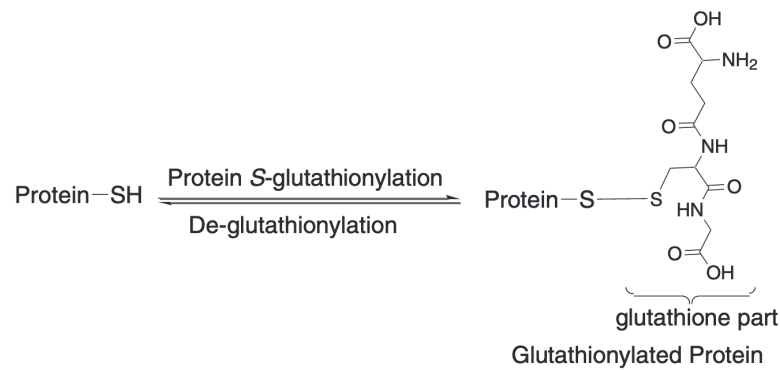
## 1.4 Redox-Regulierung durch Protein-S-Glutathionylierung

Die Redox-Homöostase reguliert eine große Anzahl wichtiger zellulärer Prozesse. Ungleichgewichte werden mit der Entstehung von zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht. Posttranslationale Modifikationen (PTMs) sind bei der Regulierung von Proteinfunktionen von Bedeutung und stehen in Zusammenhang mit Genexpression, Signalkaskaden, Proteintransport, der Regulierung der Aktivität und Stabilität von Enzymen sowie Zell-Zell-Interaktionen, -Proliferation und -Differenzierung (Dalle-Donne *et al.*, 2007; Doerig *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2011). Am empfänglichsten für Redox-Modifikationen sind dabei die Thiol(SH)-Gruppen von Cysteinen (Grek *et al.*, 2013). Die verschiedenen Oxidationszustände erlauben dabei eine Vielzahl von PTMs: (I) S-Glutathionylierung (RS-SG), (II) S-Nitrosylierung (auch S-Nitrosation genannt; SNO), (III) Sulfhydrylierung (SSH), (IV) Disulfidbindungen (RS-SR), (V) Sulfenylierung (SOH), (VI) Sulfinsäuren (SO<sub>2</sub>H) und (VII) Sulfonsäuren (SO<sub>3</sub>H). Abbildung 9 zeigt diese Modifizierungen, von denen viele reversibel sind (Chung *et al.*, 2013).



**Abbildung 9: Oxidative posttranslationale Modifikationen an Cysteinen.** PTMs hängen dabei auch von der Menge des oxidativen Stresses ab, wobei die blau hinterlegten Modifizierungen als Schutz der Proteine gesehen werden. Im Gegensatz dazu werden die Sulfin- und Sulfonsäure als (dauerhafte) Schädigung angesehen. \*Die Oxidation von Sulfen- zu Sulfinsäure galt lange Zeit als irreversibel, wurde aber durch die Entdeckung von Sulfiredoxin widerlegt (Chung *et al.*, 2013).

*Plasmodium* zeigt nur geringe transkriptionelle Veränderungen als Antwort auf äußere Stimuli, was darauf hindeutet, dass vielseitige posttranskriptionelle und posttranslationale Modifizierungen eine wichtige Funktion in der Proteinregulation haben könnten (Ganesan *et al.*, 2008; Jortzik, 2011). Es ist bekannt, dass Transkriptionsregulation in der Kontrolle der Parasitenentwicklung wichtig ist und PTMs von Proteinen wurden als Regulatoren und/oder Effektoren in fast allen Stadien des Lebenszyklus von *Plasmodium spp.* beschrieben und waren in einigen Fällen an der Regulierung des Übertritts zwischen den Entwicklungsstadien beteiligt (Doerig *et al.*, 2015).



**Abbildung 10: Protein-S-Glutathionylierung.** Bei der Glutathionylierung wird ein Glutathionmolekül kovalent an eine SH-Gruppe eines Proteins gebunden (Chen *et al.*, 2012).

Protein-S-Glutathionylierung beschreibt die Bildung einer reversiblen Bindung von Glutathion an das Cystein eines Proteins (Abbildung 10) und ist mit 85-90 % die häufigste Cystein-Modifikation (Jortzik *et al.*, 2012). Diese kann durch eine Reaktion von GSSG oder S-Nitrosoglutathion (GSNO) mit einem freien Thiol entweder durch ein einzelnes Elektron über Thiylradikale (RS-) oder über Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen zwischen Proteinthiolen und GSSG oder PSSG geschehen. Dabei kann ein S-nitrosyliertes Thiol als Zwischenprodukt gebildet werden oder ein GSH an eine Sulfensäure binden. Zusätzlich kann aus der Sulfensäure zunächst ein Sulfenylamid entstehen und durch Reaktion mit GSH ein S-glutathionyliertes Protein gebildet werden (Abbildung 9) (Chung *et al.*, 2013; Dalle-Donne *et al.*, 2007; Gallogly & Mieyal, 2007; Jie Zhang *et al.*, 2018). Sulfensäuren sind sehr instabil und können zur Sulfinsäure oxidiert und weiter irreversibel zur Sulfonsäure überoxidiert werden. Daher kann die S-Glutathionylierung von Sulfensäuren als Schutz der Proteine vor der irreversiblen Überoxidation dienen. Darüber hinaus können die Enzyme Glutaredoxin und Glutathion-S-Transferase (GST) die Modifikation fördern (Jortzik *et al.*, 2012; Rashdan *et al.*, 2020; Jie Zhang *et al.*, 2018). Die Rückreaktion, die sogenannte Deglutathionylierung, kann von Glutaredoxin, Thioredoxin und Sulfiredoxin katalysiert werden oder nicht-enzymatisch direkt über GSH stattfinden (Dalle-Donne *et al.*, 2007; Gallogly & Mieyal, 2007; Grek *et al.*, 2013; Jortzik *et al.*, 2012).

#### 1.4.1 Funktionen von Protein-S-Glutathionylierung

Es ist bekannt, dass Protein-S-Glutathionylierung eine Rolle bei einigen schweren Erkrankungen spielt wie beispielsweise Alzheimer, Mukoviszidose, Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen und Nierenerkrankungen im Endstadium. Inzwischen rückt sie in ihrer regulatorischen Funktion als „Thiol-Schalter“ immer mehr in den Blick der Forschung. Erkenntnisse deuten darauf hin, dass physiologische Prozesse von der Protein-S-Glutathionylierung abhängen, die nicht mit generalisiertem oxidativem Stress assoziiert sind (Dalle-Donne *et al.*, 2007; Giustarini *et al.*, 2017; Hill & Bhatnagar, 2012; Mieyal *et al.*, 2008). Wie oben beschrieben, schützt die Glutathionylierung Thiole vor irreversibler Oxidation bei oxidativem Stress und dient zusätzlich als GSH-Speicher, da GSSG sonst schnell aus der Zelle ausgeschleust wird (Dalle-Donne *et al.*, 2009; Giustarini *et al.*, 2017). Die S-Glutathionylierung von Proteinen führt zu proteinspezifischen funktionellen Veränderungen, in den meisten Fällen

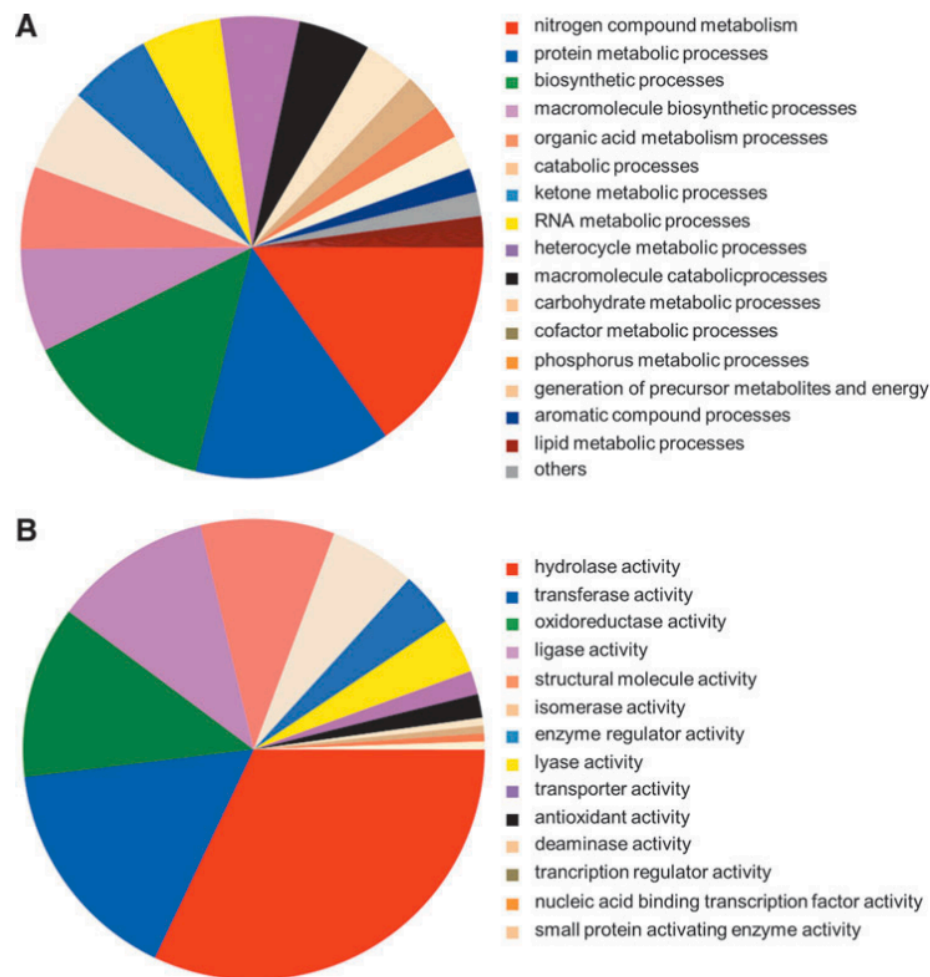


führt sie zu einer Hemmung ihrer Aktivität, was bei Enzymen besonders deutlich wird, aber zum Beispiel auch bei Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B zutrifft. Sie wird daher als Mechanismus zum Schutz reaktiver Cysteinreste vor irreversibler Überoxidation unter erhöhtem oxidativen Stress angesehen, die eine Reaktivierung der Proteinfunktion unter reduzierenden Bedingungen ermöglicht (Dalle-Donne *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 Protein-S-Glutathionylierung in *Plasmodium*

PTMs sind bei parasitären Proteinen weit verbreitet und haben wichtige Funktionen bei der Regulation. Aufgrund der Vielfalt der posttranslationalen Modifikationen sind die Möglichkeiten dieser Art der Proteinregulation vielzählig und bieten hervorragende Ansatzpunkte für die Entdeckung antiparasitärer Wirkstoffe (Doerig *et al.*, 2015; Yakubu *et al.*, 2018). Die Protein-S-Glutathionylierung, bei der ein Glutathionmolekül kovalent an ein Cystein eines Proteins bindet, wurde in einigen Organismen studiert, darunter auch *P. falciparum* (Kehr *et al.*, 2011). Dabei wurden die zuvor glutathionylierten Proteine über einen *Biotin-Switch* angereichert, wobei die glutathionylierten Proteine zuerst mit Glutaredoxin (Grx) deglutathionyliert wurden, anschließend die nun freien SH-Gruppen mit Biotinmaleimid markiert und über Beads angereichert wurden, bevor schließlich die Proteine mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden konnten (siehe auch 3.5.3 und 3.5.4).

Dabei konnten aus dem Zellextrakt der Parasiten 493 Proteine identifiziert werden, von denen 321 eine annotierte Funktion hatten, bei 172 Proteinen war die Funktion unbekannt. Viele der S-glutathionylierten Proteine sind am Metabolismus von Stickstoffverbindungen beteiligt, am Proteinmetabolismus, an biosynthetischen Prozessen sowie am Metabolismus von RNA, Kohlenhydraten und Lipiden (Abbildung 11 A). Die meisten identifizierten Enzyme wiesen entweder eine Hydrolase-, Transferase- oder Oxidoreduktase-Aktivität auf (Abbildung 11 B). Zusätzlich wurde systematisch die S-Glutathionylierung von 15 Proteinen mit zentralen Funktionen in Stoffwechselwegen durch Protein-Immunoblotting und enzymatische Assays untersucht (Kehr *et al.*, 2011). Veränderungen der Protein-S-Glutathionylierungsmuster unter erhöhtem oxidativem Stress und die Mechanismen der Protein(de-)glutathionylierung und deren Selektivität bei *P. falciparum* sind dabei grundsätzlich von großem Interesse.



**Abbildung 11: Funktionelle Klassifizierung der Protein-S-glutathionylierten Proteine in *P. falciparum*.** Die Proteine wurden entsprechend nach zellulären Stoffwechselforgängen (A) und nach ihrer katalytischen Aktivität (B) geclustert (Kehr *et al.*, 2011).

### 1.4.3 SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) zur Untersuchung von Veränderungen der Glutathionierungsprofile

*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (SILAC) ist eine robuste und zuverlässige Methode zur Proteinquantifizierung in der Massenspektrometrie (Deng *et al.*, 2019; Ong, 2012) und kann zur Untersuchung von qualitativen und quantitativen Profilen S-glutathionlierter Proteine und Überwachung von Veränderungen unter Stressbedingungen genutzt werden. Sie wurde 2004 für *Plasmodium falciparum* etabliert (Nirmalan *et al.*, 2004). Bei dieser massenspektrometrischen Methode zur Mengenbestimmung durch Isotopenmarkierung werden isotopenmarkierte Aminosäuren *in vivo* während der Proteinsynthese eingebaut (Deng *et al.*, 2019). SILAC mit Isoleucin ist dabei für *P. falciparum* besonders geeignet, unter anderem da 99.9 % der etwa 5300 vorhergesagten plasmodialen Proteine Isoleucin enthalten und der Massenshift von 7 Da eine klare spektrale Trennung erlaubt (Sims & Hyde, 2006). SILAC mit Isoleucin wurde zuvor schon in *Plasmodium* angewandt, um Veränderungen der Proteinexpression in Trophozoiten und Stress durch die Malaria-Medikamente Artemisinin und Chloroquin zu untersuchen (Prieto *et al.*, 2008).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Redox-Biologie des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* zu leisten. Dies ist von großem Interesse, um die Biologie des Erregers, die Wirkmechanismen von Medikamenten und die Interaktionen von Wirt und Parasit besser zu verstehen. Genetisch kodierte Redox-Sensoren sind seit einigen Jahren sehr verbreitet und werden unter anderem zur Messung des Redox-status und des Glutathion-Redoxpotentials eingesetzt. Auch für *P. falciparum* wurden diese Sonden bereits etabliert. Die bisher verwendete episomale Transfektion und die Detektion am konfokalen Mikroskop sind jedoch sehr aufwändig und stehen vielerorts nicht zur Verfügung.

In dieser Arbeit sollten die ratiometrischen Redox-Sensoren hGrx1-roGFP2 und sfroGFP2 in den Blutstadien von *P. falciparum*-Parasiten charakterisiert und verglichen werden. Dabei sollten beide Sensoren *in vitro* und in Zellkultur hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften und Reaktivität untersucht werden. Durch die Einführung der stabilen genomischen Integration und der damit verbesserten Expression der Redox-Sensoren sollte die Messung des Oxidationsgrades mittels Plattenleser-Detektion etabliert und mit der bereits etablierten Einzelzell-Bildgebung am konfokalen Mikroskop systematisch verglichen werden. Dabei sollten zuverlässige, sensitive Instrumente zur Untersuchung des Redox-Stoffwechsels und der Mechanismen der Arzneimittelwirkung und -resistenz in *Plasmodium* weiter optimiert werden, um diese Methoden der breiteren Malaria-Community zugänglich zu machen.

Inzwischen existiert eine Vielzahl an roGFP-basierten Sensoren mit unterschiedlichen Eigenschaften und Vorteilen. Um die neue sfroGFP2-Sonde mit ihren Mutationen und deren Auswirkungen auf die Fluoreszenz und Reaktivität der Sonde besser zu verstehen, sollte die Struktur mittels Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden.

Zur weiteren Untersuchung des Glutathionstoffwechsels sollte die Veränderung der Glutathionylierungsprofile des Proteoms von *P. falciparum* durch oxidativen Stress untersucht werden. Dazu wurde ein SILAC-Experiment durchgeführt, bei dem die glutathionylierten Proteine unter physiologischen Bedingungen und unter oxidativem Stress verglichen wurden, um differentiell regulierte Proteine zu identifizieren. Kinasen wurden bereits zuvor als Ziel der Glutathionylierung in *P. falciparum* unter physiologischen Bedingungen gefunden. Mit einem weiteren Experiment sollte nun geprüft werden, ob sich durch oxidativen oder pharmakologischen Stress die Interaktionspartner verändern. Dazu wurde die GFP-getaggte Casein-Kinase 1 (PfCK1) und ihre Interaktionspartner über einen *Pulldown*-Assay mit anschließender Massenspektrometrie unter basalen und gestressten Bedingungen untersucht und verglichen.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analyse-Waage	Scaltec Instruments, Göttingen
Analyse-Waage AJ100	Mettler-Toledo, Gießen
Autoklav VX-95	Systemec, Wettenberg
Beckman SW41-Ti Ultrazentrifuge	Beckman, München
CLARIOstar Plattenleser	BMG labtech, Ortenberg
Confocal microscope TCS SP5	Leica, Wetzlar
Doumax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Durchlichtmikroskop axiostar	Zeiss, Jena
Elektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, München
Eismaschine F80C	Icematic, Deutschland, Meerbusch
FAS Digi Gel Imaging System	Nippon Genetics, Düren
Filmentwickler Optimax TR	MS Laborgeräte, Heidelberg
FPLC-System Äkta	GE Healthcare, Freiburg
GelDoc 2000	Bio-Rad, München
Gene Pulser Elektroporator	Bio-Rad, München
Heizblock neoBlock II	neoLab, Heidelberg
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Heto Power Dry LL3000	Thermo Scientific, Dreieich
Inkubator cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler Innova <sup>®</sup> 44	Eppendorf, Hamburg
Inkubator, Mytron	Thermo Scientific, Dreieich
Incubator shaker KS500	Junke & Kundel, IKA-Werke, Staufen
Incubator shaker SM25	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Intas ECL ChemoStar	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Kristallisationsroboter Honeybee 961 mit <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peristaltikpumpe Masterflex<sup>®</sup> US<sup>®</sup></li> <li>• Vakuumpumpe 6035A080-02</li> </ul>	Digilab, Marlborough, USA
MACS <sup>®</sup> Separator QuadroMACS <sup>™</sup>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Magnetrührer RCTbasic	IKA <sup>®</sup> -Werke, Staufen
Magnetrührer color squid	IKA <sup>®</sup> -Werke, Staufen
Magnetrührer HI 300N	HANNA Instruments, Vöhringen
Mehrkanalpipette Discovery 1 – 10 µl	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Mehrkanalpipette Discovery 20 – 200 µl	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Mehrkanalpipette Transferpette 2 – 20 µl	BRAND GmbH, Wertheim
Mehrkanalpipette Transferpette 10-100 µl	BRAND GmbH, Wertheim
Mehrkanalpipette Viaflo 125 µl (elektronisch)	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Minigel-Elektrophoresesystem Owl <sup>™</sup> Easy-Cast <sup>™</sup>	Owl Scientific, Massachusetts, USA
Neubauer Zählkammer (Hämocytometer)	Brand GmbH, Wertheim
PCR-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg

pH-meter	Knick, Berlin
Pipetten Eppendorf Research Plus (10, 20, 100, 200 und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Gilson Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Power Pac 300 and 1000	Bio-Rad, München
Rotilabo®-X-ray-cassette	Carl Roth, Karlsruhe
Sicherheitswerkbank Herasafe™	Thermo Scientific, Dreieich
Spectrophotometer Beckman DU 650	Thermo Scientific, Dreieich
Spektrophotometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Speed vac Savant	Thermo Scientific, Dreieich
Tecan Infinite Mikrotiterplatten-Leser M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Tischzentrifuge Mini-spin	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5414R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallwasserbad Sonorex RK100	Bandelin, Berlin
Überkopfschüttler, Trayster Digital	IKA®-Werke, Staufen
Vortex-Mixer MS2 Minishaker	IKA®-Werke, Staufen
Wasserbad, Typ 3042	Köttermann, Uetze
Western Blot Trans-Blot® SD Semi-dry transfer cell	Bio-Rad, München
Western Blot Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
Zentrifuge Megafuge 1.0 R (mit Ausschwingrotor 2704, Becher 7570G, Adapter Typ E 7576 + 7577)	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC 6+ mit Rotoren SS-34, SLA 3000	Thermo Scientific, Dreieich
µCuvette G1.0	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Quelle
Cryo.S™	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Discofix®-3 Dreiwegehahn, blau	B.Braun, Melsungen
Einwegspritzen 10 ml	B.Braun, Melsungen
Elektroporationsküvette, GenePulser® (0,2)	Bio-Rad, München
Filtereinheit Rotrand 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel
Glaskapillaren/Mikropipetten 10 µl	BRAND GmbH, Wertheim
Ibidi 6 channel µ-Slide poly-L-lysine-coated	Ibidi, Martinsried
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
LoBind® Tubes	Eppendorf, Hamburg
Low Binding Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
MACS Columns D	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatte, 96 well, PP, V-Boden, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatte, 96 well, PP, half area, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Mikrotiterplatte, 96 well, PP, half area, schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrocellulose Blotting Membran, 0,45 µm	GE Healthcare, Freiburg
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Scientific, Osterode
Omnifix® Luer Lock Solo	B.Braun, Melsungen
Parafilm M PM-996	Bemis, Neenah, USA
Pasteurpipetten 150 mm Länge	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Petrischalen	SARSTEDT, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10; 10 lang; 200; 1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (10; 200; 1000 µl)	nerbe plus, Winsen a. d. Luhe
Pipettenspitzen VIAFLO GRIPTIPS 125 µl	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Pipettenspitzen Omnitip™ FastRack 10 µl	ULPLAST, Warschau
Pipettenspitzen Omnitip™ FastRack 200 µl	ULPLAST, Warschau
Reagent Reservoirs	VWR, West Chester, USA
Reagiergefäße LoBind 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Roti®-PVDF-Membran	Carl Roth, Karlsruhe
SafeSeal Reagiergefäß, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Serologische Pipetten (1, 5, 10, 25 & 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterican® Einmalkanüle	B.Braun, Melsungen
Zeba™ Spin Desalting Columns	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellkulturplatten (6-; 96-well)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

## 2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit, sofern nicht anders beschrieben, von BioRad (München), Merck/Sigma-Aldrich (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Lösung	Bio-Rad, München
Acrylamid-Lösung	Bio-Rad, München
Aldrithiol-4 (4,4'-Dipydyldisulfid, DPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	PeqLab, Erlangen
Albumax	Gibco, Karlsruhe
APS	Carl Roth, Karlsruhe
Artemisinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotinmaleimid	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA ( <i>Bovine serum albumin</i> )	Carl Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diamid	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
GeneRuler 1kb (Größenmarker)	Thermo Scientific, Dreieich
Giemsa	Merck, Darmstadt
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Glukose-Oxidase (GOD)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
GSH	Carl Roth, Karlsruhe
GSSG	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstroke, England
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumbikarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ni-NTA agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
M-PER™ Extraktions-Reagenz	Thermo Scientific, Dreieich
NADPH	Biomol, Hamburg
PageRuler Prestained Protein Ladder #26616	Thermo Fisher Scientific, Osterode
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll®	GE Health Care/Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saponin	Carl Roth, Karlsruhe
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sorbitol	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton/Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan- monolaurat)	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

## 2.4 Antibiotika und Malariamedikamente

### 2.4.1 Antibiotika

Antibiotikum	Quelle	Stockkonzentration	Wirkkonz.
Carbenicillin	Carl Roth, Karlsruhe	50 mg/ml in 50 % Ethanol	100 µg/ml
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe	25 mg/ml in 100 % Ethanol	25 µg/ml
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe	400 mg/ml	22 µg/ml
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe	25 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	50 µl/ml

### 2.4.2 Malariamedikamente

Substanz	Stocklösung	Hersteller/Quelle
Amodiaquin (AQ)	10 mM in DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Artemisinin (ART)	10 mM in DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
Artemether (ATM)	10 mM in DMSO	TCI Deutschland, Eschborn
Artesunat (ATS)	10 mM in DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Atovaquon (ATQ)	10 mM in DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroquin (CQ)	10 mM in DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Compound 1o	10 mM in DMSO	Prof. Reimar Krieg, Jena
Lumefantrin (LUM)	10 mM in DMSO	Prof. David Fidock, New York, USA
Mefloquin (MQ)	10 mM in DMSO	Roche, Mannheim
Chinin ( <i>Quinine</i> ) (QN)	10 mM in DMSO	ACROS Organics, Geel, Belgien

### 2.4.3 Selektionssubstanzen in der *P. falciparum*-Zellkultur

Substanz	Finale Konzentration	Hersteller/Quelle
WR999210	2 nM/5 nM	Jacobus Pharmaceuticals, New Jersey, USA
Blasticidin S HCl (BSD)	2,5 µg/µl	AppliChem, Darmstadt
G418 (geneticin)	125 µg/µ	Carl Roth, Karlsruhe



## 2.5 Puffer und Medien

### 2.5.1 Assay Puffer

Puffer	Zusammensetzung
NADPH Puffer	3 mM NADPH, 143 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6 mM EDTA, pH 7,5
GR Puffer	20,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 26,5 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 mM EDTA, 0,2 M KCl, pH 6,9
roGFP Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl pH 8,0
Standard Puffer	100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM EDTA pH 7,0

### 2.5.2 Puffer und Lösungen zur Kultivierung von *P. falciparum*

Puffer	Zusammensetzung
Cytomix	120 mM KCl, 0,15 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES/2 mM EGTA pH 7,6 mit 1 M KOH
<i>Freezing Solution</i>	3 % Sorbitol, 0,65 % NaCl, 28 % Glycerol, ddH <sub>2</sub> O ad 50 ml
Modifiziertes RPMI-Medium	RPMI 1640 mit 0,5 % w/v Albumax, 9 mM Glukose, 0,2 mM Hypoxanthin, 2,1 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und 22 µg/ml Gentamycin
Ringerlösung	122,5 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,8 mM MgCl <sub>2</sub> , 11 mM D-Glukose, 25 mM HEPES, 1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 mit NaOH
Saponinlyse-Puffer	7 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 11 mM NaHCO <sub>3</sub> , 58 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 14 mM Glucose, 0,02 % Saponin, pH 7,4 mit HCl
SYBR Green-I Assay Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,16 % w/v Saponin und 1,6 % v/v Triton X-100

### 2.5.3 Medium/Platten zur Kultivierung von *E.coli*

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (Lysogeny broth)	10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Platten	15 g Agar ad 1 l LB-Medium, 2 ml Antibiotikum (Stocklösung); die entsprechenden Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren bei 50-60 °C hinzugefügt

### 2.5.4 Gele

Gel	Zusammensetzung
Agarose-Gel	0,7 % Agarose in TBE-Puffer
SDS-PAGE Trenngel (12 %)	5,1 ml ddH <sub>2</sub> O, 3,75 ml Trenngelpuffer, 6 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %), 150 µl SDS (10 %), 75 µl APS (10 %), 7,5 µl TEMED
SDS-PAGE Sammelgel (4 %)	3,05 ml ddH <sub>2</sub> O, 1,25 ml Probegelpuffer, 650 µl Acrylamid/Bisacrylamid (30 %), 5 µl SDS (10 %), 25 µl APS (10 %), 5 µl TEMED

### 2.5.5 Elektrophoresepuffer und -lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Coomassie Brilliant Blue Färbelösung	160 mg Coomassie Brilliant Blue R250 in 1 l <sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O, 3 ml konz. HCl
Elektrophoresekammerpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 mit konz. HCl
SDS-Probenpuffer (1x) (mit DTT)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25 % Glycerin, 2 % SDS, 0,01 % (w/v) Bromophenolblau (+50 mM DTT) + 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol
SDS-Probenpuffer (4x) (mit DTT)	250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40 % Glycerin, 8 % SDS, 0,03 % (w/v) Bromophenolblau (+200 mM DTT)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8
10x TBE	1 M Tris, 1 M Borsäure, 2 mM, pH 8,0 mit Essigsäure

### 2.5.6 Western Blot Puffer und -lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	300 mM Tris (36,3 g/1000 ml <sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O)
Anodenpuffer II	25 mM Tris (3.03 g/1000 ml <sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O)
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure (2,6 g/500 ml <sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O)
TBS-Puffer	10 mM Tris, 155 mM NaCl, mit HCl bei RT auf pH 7,4 eingestellt
TBST-Puffer	10 mM TRIS, 155 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, mit HCl bei RT auf pH 7,4 eingestellt
Essigsäure	1 %
Ponceau-S-Stocklösung (10x)	2 % Ponceau S, 3 % TCA
Luminol	1,25 mM Luminol, 0,0093 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 0,1 M Tris-HCl pH 8,6 (bis 4 Wochen haltbar, bei 4 °C gelagert)
Cumarinsäure	0,11 % Cumarinsäure in DMSO
ECL-Reagens ( <i>enhanced chemoluminescence</i> )	1 ml Luminol, 10 µl Cumarinsäure

## 2.6 Kits und Beads

Kits/Beads	Hersteller
Kapa Blood PCR-Mastermix B Kit, Peqlab	VWR, Darmstadt
GFP-Trap <sup>®</sup> _A	ChromoTek, Planegg-Martinsried
SoftLink <sup>™</sup> Soft Release Avidin Resin	Promega, Mannheim
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PureYield <sup>™</sup> Plasmid Miniprep System	Promega, Mannheim
MSB <sup>®</sup> Spin PCRapace	Invitek Molecular GmbH, Berlin
Pierce Silver Staining Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA

## 2.7 Organismen

Organismus	Quelle
<i>P. falciparum</i> 3D7	Prof. Michael Lanzer, Heidelberg
<i>P. falciparum</i> NF54attB	Prof. David Fidock, Columbia University, NY, USA
<i>E. coli</i> BL21 B F- dcm omp T hsdS(rB - mB -) gal λ(DE3)	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> M15 F-, Φ80ΔlacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> XL1-Blue <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene, La Jolla, USA

Die Erythrozytenkonzentrate (Blutgruppe A<sup>+</sup>) für die *P. falciparum*-Zellkultur wurden von der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen bezogen.

## 2.8 Plasmide

Vektor	Resistenz	Hersteller/Quelle
pDC2-CAM-[XXX]-attP	BSD Carbenicillin	Prof. David Fidock, Columbia University, NY, USA
pDC2-CAM-[hGrx1-sfroGFP2]-attP	BSD Carbenicillin	generiert
pINT	Carbenicillin	Prof. David Fidock, Columbia University, NY, USA
pET28a(+)-[hGrx1-sfroGFP2]	Kanamycin	General Biosystems, Durham, USA
pQE30-[sfroGFP2]	Carbenicillin	AG Becker, Giessen
pQE60-[hGrx1-roGFP2]	Carbenicillin	AG Becker, Giessen

## 2.9 Proteinkristallisation

Zur Testung der Kristallisationsbedingung von sfroGFP2 wurden verschiedene kommerziell erhältliche Kristallisationsscreens verwendet.

Screen	Quelle
Additive Screen HT	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
JBScreen Classic HTS I	Jena Bioscience, Jena
JBScreen Classic HTS II	Jena Bioscience, Jena
JBScreen Wizard 1 & 2 HTS	Jena Bioscience, Jena
JBScreen Wizard 3 & 4 HTS	Jena Bioscience, Jena
JCSG Core I Suite	Qiagen, Hilden
JCSG Core II Suite	Qiagen, Hilden
JCSG Core III Suite	Qiagen, Hilden
JCSG Core IV Suite	Qiagen, Hilden
XP Screen	Jena Bioscience, Jena
PEG Screen Teil 1*	AG Becker
PEG Screen Teil 2*	AG Becker

\*Zusätzlich wurden in der AG Becker hergestellte Kristallisationsscreens getestet.

## 2.10 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ChemoStar TS Software	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
LAS AF Lite	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
LAS AF	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mars	BMG Labtech, Ortenberg
Snappgene	GSL Biotech LLC, San Diego, USA

### 3 METHODEN

Die Arbeiten mit *E. coli* wurden unter S1-Bedingungen durchgeführt. Die Arbeiten mit (genetisch veränderten) *Plasmodium falciparum*-Parasiten wurden unter S2-Bedingungen durchgeführt. Alle Materialien und Lösungen wurden im Anschluss gesammelt und für 30 min bei 120 °C und 2,5 bar autoklaviert. Materialien zur sterilen Arbeit wurden steril eingekauft oder zuvor autoklaviert oder mit Heißluft sterilisiert.

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation bestimmter Zielgene wurde die Polymerasekettenreaktion genutzt (PCR). Sie startet mit der Denaturierung des doppelsträngigen DNA bei 95 °C (Mullis und Faloona 1987). Darauf folgten 24 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung, 30 s Annealing bei 94 °C und 2 min Elongation bei 58 °C. Zeit und Temperaturen hingen von der Länge der DNA-Sequenz, der Länge des Primers und der optimalen Temperatur für die Aktivität der Polymerase ab. Nach Bindung der Sense- und Antisense-Primer (Oligonukleotide) an die passende Sequenz der Template-DNA beginnt die DNA-Polymerase (Accu Prime Taq Polymerase) den neuen Strang mit Einzelnucleotiden (dNTPs) zu verlängern. Eine Übersicht über die PCR-Zeiten und Temperaturen ist in Tabelle 2 angegeben. Die Zeit für den Elongationsschritt betrug 60 s/1 kb des amplifizierenden PCR-Konstrukts.

**Tabelle 2: Pipettierschema der PCR.**

	<b>hGrx1-sfroGFP2</b>
Denaturierung	2 min, 94 °C
Zyklen	24x
Denaturierung	30 s, 94 °C
Annealing	30 s, 58 °C
Elongation	2 min, 72 °C
Finale Elongation	4 min, 72 °C
Hold	4 °C

##### 3.1.2 DNA-Quantifikation

Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration einer Probe erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem BioPhotometer mit UV-Küvetten oder dem BioSpectrometer basic (beide Eppendorf, Hamburg). Nach Sambrook *et al.* (1989) entspricht  $A_{260\text{nm}} = 1$  der DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde das Verhältnis von  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  berechnet. Eine Probe wurde mit dem Verhältnis  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8-2,0$  als rein definiert.

##### 3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse und Trennung von DNA-Fragmenten genutzt. 0,7 % Agarose wurden in Elektrophoresepuffer (TBE) in einer Mikrowelle erhitzt, um sie zu lösen und anschließend in den Gelschlitten gegossen. Dieser wurde in die Elektro-

phoresekammer überführt, welche mit TBE gefüllt wurde. Proben wurden mit *DNA-Dye NonTox* Ladepuffer, welcher die DNA direkt anfärbt, im Verhältnis 1:5 gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde die *Gene Ruler 1 kb DNA ladder* verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 30-60 min durchgeführt. Die DNA-Banden wurden mit UV-Licht in der Gel-Dokumentationskammer (FAS Digi Gel Imaging System; Nippon Genetics, Düren) sichtbar gemacht.

### 3.1.4 Klonierung von hGrx1-sfroGFP2

#### Restriktionsverdau

Das hGrx1-sfroGFP2-Konstrukt wurde bei der Firma General Biosystems (Durham, USA) bestellt und in einem pET28-Vektor geliefert. Vor der Umklonierung wurde die DNA in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen. Um das ringförmige Plasmid zu linearisieren wurde die DNA mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten. Zuerst wurde der pET28-Vektor für eine Stunde bei 37 °C verdaut (Tabelle 3). Anschließend wurde das Konstrukt mit dem MSB® Spin PCRapace Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration bestimmt.

**Tabelle 3: Verdau des pET28-Plasmids.**

Komponente	Volumen
hGrx1-sfroGFP2	8 µl
AvrII	1 µl
XhoI	1 µl
Puffer R	3 µl
ddH <sub>2</sub> O (autoklaviert)	17 µl
Gesamtvolumen	30 µl

#### Ligation

Bei der Ligation wird das gewünschte Insert mit dem Vektor verbunden. Das Enzym Ligase verbindet ATP-abhängig die komplementären 3'-Hydroxy-Enden mit den 5'-Phosphat-Enden über eine Phosphodiesterbindung kovalent. Die Ligation des Konstrukts mit dem bereits offen vorliegenden pDC2-Plasmid erfolgte über Nacht bei 4 °C (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Ligation von hGrx1-sfroGFP2 mit dem pDC2-Vektor.**

Komponente	Volumen
hGrx1-sfroGFP2 (26,4 ng/µl)	8 µl
pDC2 (16,4 ng/µl)	7 µl
T4 DNA Ligase (1-3 U/ml)	1 µl
T4 DNA Ligase Puffer (10 x)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O (autoklaviert)	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

#### Transformation

Bei der Transformation erfolgt die Aufnahme von Fremd-DNA in *E. coli* Zellen. Dazu gibt es unterschiedliche Methoden wie beispielsweise die Elektroporation oder die Calciumchlorid-präzipitation, welche hier verwendet wurde. Für die Transformation wurden 5 µl des Ligationsansatzes zu 125 µl kompetenter XL1blue Zellen hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Es folgte ein kurzer Hitzeschock bei 42 °C für 90 s zur Aufnahme der Fremd-DNA, bevor die Zellen für 2 min auf Eis ruhten. Es wurden 300 µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension auf einer Agarplatte mit entsprechender Antibiotika-Resistenz zur Selektion (LBC) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den erschienenen Kolonien wurden mehrere LB-Röhrchen angeimpft und über die Mini-Prep DNA gewonnen. Mit dieser wurde ein Kontrollverdau durchgeführt (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Kontrollverdau.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Plasmid aus Mini-Prep	8 µl
AvrII	1 µl
XhoI	1 µl
Puffer rot	2 µl
ddH <sub>2</sub> O (autoklaviert)	8 µl
Gesamtvolumen	20 µl

### 3.1.5 Preparation von Plasmid-DNA

Die Mini-Prep-Methode wurde zum routinemäßigen Reinigen kleiner DNA-Mengen bei Klonierungen angewandt. Hierfür wurde das PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Ein Pellet einer 3 ml Übernachtskultur mit dem entsprechenden Plasmid wurde lysiert, neutralisiert und auf die Säule aufgetragen. Es folgte ein Waschschriff, bevor die Plasmid-DNA mit 30 µl Elutionspuffer eluiert wurde. Um größere Mengen DNA zur Transfektion der *P. falciparum* Parasiten zu gewinnen, wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Hochsalzpuffer eluiert und mittels Isopropanolpräzipitation entsalzt und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Danach wurde es unter der sterilen Werkbank getrocknet und in 200 µl Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch wie oben beschrieben (siehe 3.1.2) bestimmt.

## 3.2 *Plasmodium falciparum* Kultivierung

### 3.2.1 *In vitro* Kultivierung von *P. falciparum*

*P. falciparum* Parasiten wurden, basierend auf der Methode von Trager und Jensen (1976), kultiviert. Hierzu wurden die Parasiten in 15 oder 30 ml Schalen mit A<sup>+</sup> Erythrozyten (3,3 % Hämatokrit) in RPMI 1640 Medium (versetzt mit 0,5 % w/v Albumax, 9 mM Glukose, 0,2 mM Hypoxanthin, 2,1 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und 22 µg/ml Gentamycin) bei 37 °C in Gasgemisch aus 3 % O<sub>2</sub>, 3 % CO<sub>2</sub>, und 94 % N<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2.2 Bestimmung der Parasitämie und der Stadien

Zur Bestimmung der Parasitämie und der Stadien wurden dünne Blutausrich mit Giemsa-Lösung gefärbt und am Mikroskop gezählt. Dazu wurde ein kleiner Tropfen Blut auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet, mit Methanol fixiert und anschließend in frisch angesetzter

Giemsa-Färbelösung (10 % Giemsa-Lösung in VE-Wasser) für 5-20 min gefärbt. Die Ausstriche wurden mit VE-Wasser abgespült, getrocknet und mit einem Öl-Immersionsobjektiv (100x) am Lichtmikroskop analysiert.

Die Parasitämie beschreibt den prozentualen Anteil der mit Plasmodium infizierten Erythrozyten (iRBCs) in Relation zur gesamten Erythrozytenzahl. Die Parasitämie berechnet sich wie folgt:

$$(\text{Anzahl Parasiten}/\text{Anzahl Erythrozyten}) \times 100 = \text{Parasitämie in \%}$$

### 3.2.3 Blutstabilate

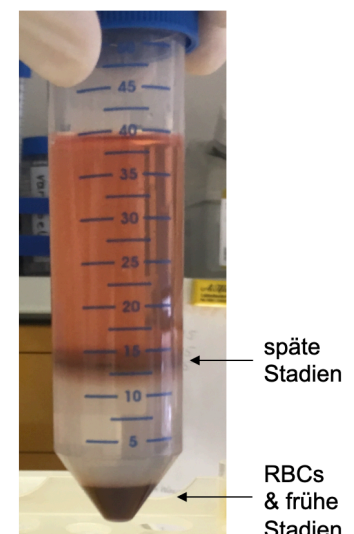
Zur Lagerung der Parasiten wurden Blutstabilate in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurde eine 15 ml Schale mit vorwiegend Ringstadien abzentrifugiert und das Pellet mit den Erythrozyten mit 500 µl *Freezing-Solution* gemischt, in ein 2 ml Kryo-Röhrchen überführt und in einer Einfrierbox bei -80 °C langsam heruntergekühlt. Die Einfrierbox, die Isopropanol enthält, bewirkt, dass sich das Stabilat pro Minute um 1 °C abkühlt. Anschließend wurde das bereits gefrorene Stabilat in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.2.4 Sorbitol- und Percoll-Synchronisation

Zur Synchronisation der Parasiten wurde üblicherweise Sorbitol-Synchronisation genutzt (Lambros & Vanderberg, 1979). Für das *Time-course-Experiment* wurde zusätzlich Percoll-Synchronisation durchgeführt.

Sorbitol führt bei Parasiten mit entwickelten anionenselektiven Kanälen (*plasmodial surface anion channel*) zur osmotischen Lyse. Bei Ringen sind diese Kanäle noch nicht ausgebildet, weshalb diese nach Sorbitol-Behandlung erhalten bleiben, wohingegen Trophozoiten und Schizonten zerstört werden. Zur Sorbitol-Synchronisation wurden 10 ml Kultur (Hk 5 %) in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und für 3 min bei 2.100 rpm (Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 5 ml vorgewärmte, 5 %-ige (w/v) Sorbitollösung wurde zugegeben, mit dem Zellpellet gemischt, für 8 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml Medium gewaschen und in eine neue Schale plattiert.

Die Percoll-Synchronisation wurde nach Moll *et al.* (2008) mit kleinen Veränderungen durchgeführt. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 30 ml Kultur gegeben und mit 14 ml 60 %-iger Percoll-Lösung unterschichtet. Nach Zentrifugation (Megafuge; 2.000 rpm; 15 min, ohne Bremse) wurden die Parasiten, die als brauner Ring sichtbar sind, vorsichtig abgenommen, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Medium gewaschen (2.000 rpm; 13 min; mit Bremse) und der Überstand verworfen. Die Parasiten wurden in eine 15 ml Schale mit 500 µl + 15 ml Medium überführt und die Reinvasion für 3 h gestartet. Die Schale wurde alle 30 min geschwenkt um eine gute Reinvasion zu gewährleisten. Nach 3 h wurde die Percoll-Behandlung wiederholt, wobei dieses Mal die iRBCs, die sich unten im Röhrchen absetzen, abgenommen und gewaschen wurden.





Anschließend wurde noch eine Sorbitol-Synchronisation vorgenommen, um etwaige überbleibende späte Stadien zu entfernen. Danach wurde die Kultur in eine sterile 96-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät.

### 3.2.5 Anreicherung von Trophozoit-Stadien

Magnetanreicherung wurde genutzt um Trophozoit-Stadien anzureichern und nicht-infizierte RBCs und Ring-Stadien zu entfernen (Paul *et al.*, 1981). Dabei wird der Magnetismus des Hämozoins, das nur späte Stadien (Trophozoiten und Schizonten) enthalten, genutzt. LC Säulen wurden über einen 3-Wege-Hahn mit einer Nadel verbunden und am Quadro MACS-System befestigt. Die Zellsuspension wurde auf die Säulen gegeben und Zellen ohne Hämozoin wurden mit Medium (ohne Albumax) oder PBS gewaschen. Anschließend wurden die Säulen vom Magnet gelöst und die Zellen mit Medium eluiert. Danach wurden die Säulen mit Wasser (ein Säulenvolumen) und 2 ml 70 %-igem und 1 ml 100 %-igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

### 3.2.6 *In vitro*-Bestimmung der EC<sub>50</sub> von *P. falciparum*

Die Ermittlung der halben maximal wirksamen Konzentration (EC<sub>50</sub>) von Malariamedikamenten oder anderen Wirkstoffen gegen *P. falciparum* wurde mit dem [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Inkorporationsassay (Desjardins *et al.*, 1979; Kasozi *et al.*, 2013) oder einem SYBR Green I-basierten Fluoreszenzassay (Ekland *et al.*, 2011) im 96-*well*-Format durchgeführt. Da diese Versuche den Umgang mit Radioaktivität beinhalten, wurden sie von einer erfahrenen technischen Angestellten mit entsprechender Umgangserlaubnis durchgeführt.

Der [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Assay arbeitet mit Hypoxanthin, einem Baustein der Nukleinsäuresynthese bei *Plasmodien*. Für den [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Assay wurden serielle Doppelverdünnungen (100 µl) der Substanzen in Hypoxanthin-freiem Medium in 96-*well*-Mikrotiterplatten durchgeführt. In die Platte wurden 100 µl der synchronisierten Ringe in Hypoxanthin-freiem Kompletmedium gegeben (0,15 % Parasitämie, 1,25 % Hämatokrit). Die Positionen, die als Negativkontrolle dienten, enthielten nur RBC, während die Positivkontrollen iRBC enthielten. Die Platten wurden für 48 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Danach wurde mit Tritium radioaktiv markiertes Hypoxanthin in einer Endkonzentration von 0,5 µCi/*Well* zugegeben und die Platte für 24 h weiter inkubiert. Die Platten wurden bei -80 °C für mindestens 24 h eingefroren und nach dem Auftauen auf Glasfaserfilter (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim) übertragen. Nach dem Trocknen wurde schließlich die Radioaktivität in Zählungen pro Minute (cpm) in jeder Vertiefung gemessen. Die cpm sind proportional zum Wachstum von *P. falciparum* im Vergleich zu RBC und iRBC.

Für den SYBR Green-I Assay wurden serielle Doppelverdünnungen (50 µl) der Substanzen in 96-*well*-Mikrotiterplatten durchgeführt (half-area, µClear-Boden). Synchronisierte Ringe in Kompletmedium (50 µl) wurden in jedes *Well* gegeben (0,15 % Parasitämie, 1,25 % Hämatokrit) und für 48 h (NF54*attB*) oder 44 h (3D7) bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 20 µl einer 5-fach konzentrierten SYBR Green-Lösung (10.000 x Stammlösung) in Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,16 % w/v Saponin und 1,6 % v/v Triton X-100) in die *Wells* gegeben und für 24 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz wurde in einem Plattenleser (ex 494 nm/em 530 nm; CLARIOstar, BMG Labtech) gemessen. Die Bestimmung der

EC<sub>50</sub>-Werte erfolgte durch den Auftrag der prozentualen Wachstumshemmung gegen die logarithmische Arzneimittelkonzentration mit variabler Steigung und sigmoidaler Funktion.

### 3.2.7 Ernte von Parasitenpellets mit Saponinlyse

Die Parasiten wurden wie beschrieben kultiviert und für die Herstellung von Zellextrakten mittels Saponinlyse von den Erythrozyten isoliert. Dazu wurde die Kultur in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 2.100 rpm bei RT für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit dem 20-fachen Volumen des Saponinlyse-Puffers resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, ehe das Parasitenpellet mit PBS gewaschen wurde. Am Ende wurde der Überstand erneut abgenommen und das Pellet bei -80 °C gelagert.

### 3.2.8 Herstellung von Parasiten-Zellextrakten

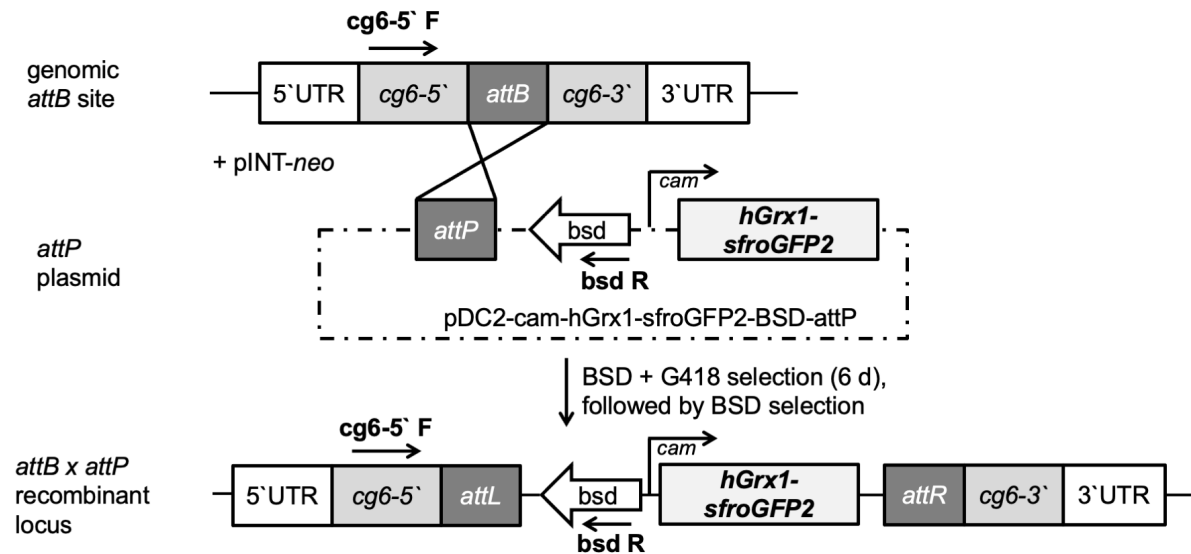
Zur Herstellung der Zellextrakte wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: die Lyse mittels M-PER™-Puffer oder die Lyse durch Frieren in flüssigem Stickstoff sowie das Tauen im handwarmen Wasserbad. Dazu wurde das Parasitenpellet in etwas Puffer mit Proteaseinhibitoren gelöst und anschließend für 2 min in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurde das Eppendorf Tube im lauwarmen Wasserbad aufgetaut, kräftig gevortext und danach kurz abzentrifugiert. Diese Schritte wurden drei Mal wiederholt, bevor das Gemisch in der Ultrazentrifuge bei 50.000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert wurde.

Bei der Lyse mit M-PER™-Puffer wurde der Puffer zum gefrorenen Pellet hinzugegeben, kräftig gemischt und gevortext. Dadurch wurde das Pellet aufgetaut und die Zellen lysiert. Es wurde für 15 min bei 4 °C (13.400 rpm; MiniSpin® Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Tube überführt.

### 3.2.9 *Plasmodium falciparum* Transfektion und stabile Integration

Die Redoxsonden wurden in *P. falciparum* NF54*attB*-Parasiten transfiziert und stabil in das Genom integriert. Dazu wurde die *attB/attP*-Methode nach Nkrumah *et al.* (2006) verwendet (Abbildung 12).

Bei dieser Methode vermittelt die Serin-Integrase der Mycobacteriophage Bxb1 die gerichtete Rekombination zwischen der *attP*-site im Plasmid und der *attB*-site im parasitären Genom (Adjalley *et al.*, 2010; Nkrumah *et al.*, 2006). NF54-Parasiten mit der *attB*-site und das pINT-Plasmid sowie das pDC2-Plasmid wurden von Prof. David Fidock von der Columbia University, New York, USA, zur Verfügung gestellt. Die *attB*-site wurde in den Lokus des nicht essentiellen *cg6*-Gens integriert (Abbildung 12). Das pINT-Plasmid (neo<sup>R</sup>, Neomycin-Resistenz, vermittelt Resistenz gegenüber Geneticin) dient zur Expression der Integrase.



**Abbildung 12: Schema der stabilen Integration von *hGrx1-sfroGFP2* in *NF54attB*.** Die homologe Rekombination zwischen der *attP*-Site im pDC2-Plasmid und der *attB*-Site im parasitären Genom wird durch die Serin-Integrase der Mycobacteriophage Bxb1 vermittelt, die vom pINT-Plasmid exprimiert wird (adaptiert von Stan Gabryszewski).

Für jede Transfektion wurden 5 ml Kultur (vornehmlich Ring-Stadien, 5-8 % Parasitämie) bei 1.500 rpm für 3 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Parasiten-Pellet wurde mit dem gleichen Volumen sterilem Cytomix gewaschen und der Überstand entfernt. 50 µg der pINT-DNA wurden mit 50 µg DNA des pDC2-Vektors, welches das Zielgen enthielt, vermischt, mit Cytomix auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und bis zu Verwendung auf Eis platziert. Das verbleibende Pellet wurde mit Cytomix auf ein Volumen von 450 µl aufgefüllt und der DNA zugefügt. Unmittelbar danach folgte die Elektroporation (310 V, 950 µF, Kapazität ∞, Bio-Rad Gene Pulser). Die Zeitkonstante lag zwischen 10 und 15 ms. Sofort nach der Elektroporation wurden die Parasiten mit 1 ml Medium resuspendiert und in eine kleine Schale überführt. Einige Stunden später wurde die Kultur abzentrifugiert und gewaschen um lysierte Erythrozyten zu entfernen. Am nächsten Tag wurde mit der Zugabe der Selektionswirkstoffe Blasticidin [2,5 µg/ml] (BSD) und Geniticin [125 µg/ml] (G418) für 6 Tage begonnen. Das Medium wurde täglich gewechselt und an Tag 6 wurden 50 µl frische Erythrozyten zur Kultur hinzugefügt. Ab Tag 7 wurde ausschließlich BSD zur Selektion eingesetzt. Ab Tag 10-13 wurden die Parasiten wöchentlich 1:2 gesplitted, bis die ersten Parasiten im Giemsa-Ausstrich zu sehen waren (üblicherweise nach 3-4 Wochen). Um die erfolgreiche Integration der Sonde ins parasitäre Genom zu bestätigen, wurde das KAPA Biosystems Blood PCR Kit benutzt. Die Fluoreszenz wurde am Mikroskop überprüft. Monoklonale Parasitenlinien wurden durch limitierende Verdünnung erzeugt und einer Blut-PCR (Tabelle 6 und Tabelle 7) mit dem Primerpaar *cg6 5' + Bsd R* (Tabelle 8) unterzogen, um die Integration zu bestätigen.

**Tabelle 6: PCR-Mix zur Blut-PCR.**

Komponente	Volumen
Kapa Blood PCR Mix B	10 µl
Kultur	2 µl
Forward Primer (5 µM)	1 µl
Reverse Primer (5 µM)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O (autoklaviert)	6 µl
Gesamtvolumen	20 µl

**Tabelle 7: Blut-PCR zur Verifizierung der genomischen Integration.**

Temperaturprofil der Blut-PCR			
95 °C	10 min		Denaturierung
95 °C	30 s	} 35 Zyklen	Denaturierung
54 °C	45 s		Annealing
62 °C	60 s/1 kB		Elongation
62 °C	6 min		Finale Elongation
4 °C			Lagerung

**Tabelle 8: Primer zur Überprüfung der stabilen Integration.**

Primer	Nukleotidsequenz
Cg6 5' F	5'-GAAAATATTATTACAAAGGGTGAGG-3'
Bsd R	5'-ACGAATTCTTAGCTAATTCGCTTGTAAGA-3'

### 3.2.10 Herstellung monoklonaler Parasitenlinien

Um eine genomisch homogene Parasitenpopulation zu erhalten, wurden nach bestätigter Integration Klonierungsplatten hergestellt. Dazu wurde eine Kultur mit vorwiegend Ring-Stadien (2-5 % Parasitämie) auf 2,5 iRBC/ml und 1,25 iRBC/ml verdünnt und 200 µl davon wurden mit Zugabe von RBCs in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die folgende Formel wurde zur Berechnung der Anzahl der iRBC/ml verwendet (dabei wurde angenommen, dass 1 ml dichter RBC 10<sup>10</sup> RBC entspricht):

$$\text{iRBC/ml} = 1 \cdot 10^{10} \cdot \left(\frac{h}{100}\right) \cdot \left(\frac{p}{100}\right) \quad (h = \text{Hämatokrit}; p = \text{Parasitämie})$$

Zur Verdünnung wurde die Originalkultur gründlich resuspendiert und auf einen Hämatokrit von 1,8 % verdünnt. 6 µl davon wurden in ein 15 ml Röhrchen mit 12 ml Komplettmedium mit 1,8 % Erythrozyten übertragen. Aus dieser Zwischenverdünnung wurde das erforderliche Volumen berechnet um die Endkonzentrationen von 2,5 iRBC/ml und 1,25 iRBC/ml zu erreichen. Pro Platte wurden etwa 24 ml benötigt. Vor dem Ausplattieren von 200 µl in jedes Well wurde die Zellsuspension gründlich gemischt. Am 7. Tag nach Aussaat wurden vorsichtig 150 µl Medium entfernt, ohne dabei die Zellen aufzuwirbeln und anschließend durch 200 µl frisches Komplettmedium mit 0,4 % frischen RBCs ersetzt. Um Verschleppungen und Kreuzkontamination zu vermeiden, wurden für jeden Pipettierschritt saubere Spitzen verwendet. Am Tag 14 wurde der Medienwechsel wiederholt. Nach 20 Tagen wurden mit dem SYBR Green-Assay das Parasitenwachstum gemessen (Ekland *et al.*, 2011). 15 µl einer

3-fachen SYBR Green I-Lösung (10.000 x Stammlösung) in Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,16 % w/v Saponin und 1,6 % v/v Triton X-100) wurde in jede Vertiefung einer separaten 96-well-Platte (klar, half-area) gegeben und 30 µl der Kultur aus der Klonierungsplatte wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem Plattenleser (Infinite M200, Tecan) gemessen (485 nm Anregung, 535 nm Emissionsfilter). *Wells*, die Parasiten enthielten, hatten im Vergleich zu dem Hintergrundsignal von nicht parasitierten *Wells* höhere Signale. Da die Fluoreszenzintensität mit der Parasitämie korrelieren sollte, wurden beim späteren Aussuchen und Vermehren der Kultur *Wells* mit hohen Fluoreszenzsignalen vermieden, da diese vermutlich von Beginn an mehr als einen Parasiten pro *Well* enthielten. Anschließend wurde die Blut-PCR, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Wenn möglich, wurden acht positive Klone aus der Platte für die PCR ausgewählt und die genomische Integration der Konstrukte mittels Agarose-Gel-elektrophorese verifiziert. Nach Verifikation durch Blut-PCR wurden mindestens vier positive Klone am selben Tag in eine 2 ml Kultur (Hämatokrit 4 %) überführt und wie oben beschrieben kultiviert. Über die Zeit wurden die Parasiten auf 5 ml und schließlich auf 15 ml Kultur vermehrt, damit die Fluoreszenzsignale der Klone mittels CLSM verglichen werden konnten. Von den besten Klonen wurden Aliquots zur Lagerung in N<sub>2</sub> gesichert und mit diesen auch die Experimente durchgeführt.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Bio-Rad Protein Assay Kit, das auf der Bradford-Methode beruht, verwendet. Die Methode basiert auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische und aromatische Aminosäuren, wobei ein Farbumschlag von rot nach blau erfolgt und photometrisch bei 595 nm gemessen werden kann. Die Absorption ist dabei proportional zur Proteinmenge.

Als Referenz wurde eine Standardkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) von 0-20 µg/ml verwendet (Tabelle 9). 500 µl des Standards (oder der verdünnten Probe) wurden mit 125 µl Farbreagens gemischt, für 15 min bei RT inkubiert und dann im Photometer gemessen.

**Tabelle 9: Pipettierschema der Standardkurve für den Bradford-Assay.**

µl BSA [2 mg/ml]	µl H <sub>2</sub> O	c in Küvette [µg/ml]	µl BSA- Verdünnung/ Probe	µl H <sub>2</sub> O	µl Bradford- Reagens	Absorption
0	200	0	0	500	125	
10	190	1	5	495	125	
25	175	2,5	5	495	125	
50	150	5	5	495	125	
75	125	7,5	5	495	125	
100	100	10	5	495	125	
150	50	15	5	495	125	
200	0	20	5	495	125	
Probe				495	125	

### 3.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE nach Lämmli ist ein gängiges Verfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Das SDS denaturiert die Proteine und gibt ihnen eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Durch das im Probenpuffer enthaltene DTT wird die dreidimensionale Struktur der Proteine aufgefalteter. Bei der Gelelektrophorese wandern die negativ geladenen Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe zur positiv geladenen Anode (Laemmli, 1970). Für die SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit 1-fachem oder 4-fachem SDS-Probenpuffer gemischt und zur Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 5 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben in Taschen eines 12 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gels geladen und unter Verwendung von Elektrophoresepuffer in eine Bio-Rad Mini PROTEAN® II Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben liefen für etwa 45 min bei 200 V. Die Größe der Proteine wurde mit Hilfe eines ungefärbten Proteinmarkers bestätigt.

Falls kein Western Blot folgte, wurde das Gel mit dem wasserbasierten Coomassie Blue Färbesystem angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Das Gel wurde kurz mit Wasser bedeckt, für 40 s in der Mikrowelle bei 700 W erhitzt und für 2 min bei RT auf einer Wippe abgekühlt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Danach wurde das Gel mit Färbelösung bedeckt, erneut erhitzt und für 15 min bei RT auf einer Wippe inkubiert. Die Färbelösung wurde verworfen und das Gel zweimal gewaschen. Das Gel wurde wieder mit Wasser bedeckt, für 40 s in der Mikrowelle erhitzt und 10 min bei RT inkubiert.

### 3.3.3 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine wurde das *semi-dry* Western Blot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde es verwendet, um die Expression der Redox-Sonde über den Lebenszyklus von *P. falciparum* zu überprüfen und um glutathionylierte oder biotinylierte Proteine zu finden, wobei die Protokolle leicht unterschiedlich waren.

Nach Auftrennung der Proteine nach Größe mittels SDS-Page wurden die Proteine auf eine mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid- (PVDF) oder Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurden 5 Filterpapiere und das SDS-Gel im Kathodenpuffer eingeweicht, 3 Filterpapiere in Anodenpuffer I und zwei Filterpapiere und die Membran in Anodenpuffer II. Nach einigen Minuten Inkubation wurden die Filterpapiere, das Gel und die Membran zügig und ohne Luftblasen auf eine Kathoden-Graphitplatte aufgeschichtet. Das Übertragen (Blotten) der Proteine erfolgte für 30 min bei 13 V. Nach Umstellung der Methode in der Arbeitsgruppe wurden zwölf Filterpapiere, das Gel und die Membran in Transferpuffer eingeweicht und für 30 min bei 25 V geblottet. Um die Effizienz zu überprüfen und die Markerbanden sichtbar zu machen, wurde die Membran für 30 s mit Ponceau S gefärbt, dann mit 1 %-iger Essigsäure gewaschen, bis die Banden sichtbar waren. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBST gewaschen. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran mit 5 %-iger fettfreier Milch in TBST oder 3 %-iger BSA blockiert (1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C). Danach wurde die Membran dreimal mit TBST-Puffer für 5 min gewaschen und in TBST-Puffer mit dem ersten Antikörper für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST-Puffer (je 5 min) wurde der zweite Antikörper (Tabelle 10) hinzugegeben und die Membran wieder für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert.

Schließlich wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und mit dem Chemilumineszenzgemisch (2.5.6) für 1 min inkubiert. Abschließend wurde die Membran entweder unter geeigneten Dunkelkammerbedingungen einem Röntgenfilm ausgesetzt und der Film wurde mit einem Röntgenfilm-Belichtungsgerät entwickelt, oder alternativ wurde die Chemilumineszenz mit einem Intas ECL ChemoStar Imager detektiert.

**Tabelle 10: Antikörper und Verdünnungen.**

Identifikation von	Erster AK	Zweiter AK	Gelöst in	Positivkontrolle
GSH	1:250	$\alpha$ -Maus 1:10 000	5 % Milch	glutathionylierte OAT
Biotin	1:500	$\alpha$ -Maus 1:10 000	5 % Milch	biotinyliertes BSA
GFP	1:1000	$\alpha$ -Maus 1:10 000	3 % BSA	sfroGFP2

### 3.3.4 Bestimmung der Glutathionreduktase-Aktivität

Der GR-Assay wurde zur Bestimmung der GR-Aktivität verwendet. Dabei wird die NADPH-Abnahme gemessen, die aus der Reduktion von GSSG zu GSH resultiert (Carlberg, 1985):

Der Assay wurde in 500  $\mu$ l Ansätzen (Tabelle 11) am Photometer bei 340 nm und 25 °C über 1-3 min gemessen.

**Tabelle 11: Pipettierschema GR-Assay.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Finale Konzentration
GR-Puffer	462.5 – x	
NADPH (4 mM)	12.5	100 $\mu$ M
GR (verdünnt)	x	
Baseline		
GSSG (20 mM)	25	1 mM
Gesamtvolumen	500	

Die Volumenaktivität wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$VA \left[ \frac{U}{ml} \right] = \frac{\Delta A}{\Delta t * \epsilon * d} * \frac{V}{v} * D$$

$\Delta A/\Delta t$ : Änderung der Absorption über die Zeit [ $\text{min}^{-1}$ ],  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient [ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ],  $d$ : Lichtweg,  $V$ : Gesamtvolumen [ $\mu$ l],  $v$ : Volumen der Probe [ $\mu$ l],  $D$ : Verdünnungsfaktor

### 3.3.5 Bestimmung von Gesamtglutathion, reduziertem Glutathion und Thiolen im Parasitenlysat

Zur Bestimmung von Glutathion und Thiolen wurden 60 ml einer *P. falciparum* Kultur mit Trophozoiten bei einer Parasitämie von etwa 8-10 % geerntet und bei -80 °C eingefroren. Am Messtag wurde durch Frieren & Tauen ein Parasitenlysat hergestellt. Die gesamten Thiole und das reduzierte Glutathion wurden direkt im frischen Lysat bestimmt. Zur Messung der freien Thiole und des Gesamtglutathions wurde das Lysat mit dem 3-fachen Volumen mit Sulfosalicylsäure (5 %) gefällt.

Thiole wurden spektrophotometrisch auf der Grundlage ihrer Reaktion mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) bestimmt (Ellman 1959). Dazu wurde das Lysat mit 150 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) und 400  $\mu$ M DTNB gemischt und bei 412 nm bei RT direkt gemessen, wobei die Kontrollabsorptionswerte berücksichtigt wurden (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Pipettierschema des Ellman Assays.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Finale Konzentration
Kaliumphosphat-Puffer (150 mM, pH 8,0)	450	
Probe oder SSA-Überstand	25	100 $\mu$ M
DTNB (8 mM)	25	400 $\mu$ M

Gesamtglutathion wurde mit dem Glutathionreduktase-gekoppelten DTNB-GSH-Recycling-Assay gemessen (Anderson, 1985; Becker *et al.*, 1994; Schuh *et al.*, 2018; Tietze, 1969). Dazu wurden 10  $\mu$ l der gefällten Probe mit 490  $\mu$ l Puffer (143 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6,3 mM EDTA und 400  $\mu$ M NADPH, pH 7,5) gemischt. Nach Zugabe von 0,6 mM DTNB wurde die Mischung 10 min bei RT inkubiert, bevor humane GR (0,5 U/ml) zugegeben und der Anstieg der Absorption sofort für 30 s bei 412 nm und 25 °C gemessen wurde.



Reduziertes GSH wurde mit dem NDA-Assay quantifiziert. Einem Volumen gefällter Probe wurden zehn Volumen des frisch zubereiteten NDA-Derivatisierungsmixes (bestehend aus 1 ml einer 10 mM NDA-Lösung in DMSO, 7 ml 50 mM Tris (pH 10) und 1 ml 0,5 M NaOH) zugegeben. Die Fluoreszenz wurde nach 20 min bei ex 485 nm/em 520 nm zusammen mit einer Glutathion-Standardkurve in 96-well-Platten in einem Plattenleser (CLARIOstar, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen.

### 3.3.6 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose

Die zur heterologen Überexpression genutzten Vektoren enthielten am N-terminalen Ende eine eingefügte Sequenz, die für einen Hexahistidyl-Tag (6xHis-Tag) kodiert. Dieser ermöglicht durch seine Bindung an  $\text{Ni}^{2+}$  die Anreicherung eines gewünschten Proteins aus dem *E. coli*-Zelllysate über Metallaffinitätschromatographie. Das Säulenmaterial besteht aus Nickel-Nitrilotriessigsäure gekoppelt an Sepharose.



## 3.4 Biosensor Methoden

### 3.4.1 Heterologe Überexpression der Sensoren

Zur *in vitro* Charakterisierung und zum Vergleich von hGrx1-roGFP2, sfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2 wurden alle drei Redox-Sensoren mittels heterologer Überexpression in *E. coli* hergestellt. Rekombinantes hGrx1-roGFP2 wurde wie in Kasozi *et al.* (2013) produziert. SfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2 wurden wie folgt hergestellt: *E. coli* M15 [pREP4] Zellen (Kanamycin-Resistenz, Kan<sup>R</sup>) wurden transformiert mit sfroGFP2 in pQE30 (Carbenicillin-Resistenz, Cn<sup>R</sup>). Zur Produktion von hGrx1-sfroGFP2 wurden *E. coli* BL21 Zellen transformiert mit einem pET28 Vektor (Kan<sup>R</sup>). Für beide Expressionen wurde eine Vorkultur aus LB-Medium (mit 100 µg/ml Cn und/oder 50 µg/ml Kan) mit einer Kolonie angeimpft und für 6-7 h bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur in 50 ml LB-Medium (versetzt mit Antibiotika), überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen. Am Morgen wurden 500 ml LB-Medium mit Antibiotika und 10-15 ml Übernachtskultur versetzt und weiterhin bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression mit 1mM IPTG induziert und über Nacht bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Zellernte mittels Zentrifugation erfolgte bei 8.000 rpm für 15 min bei 4 °C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 4 ml Puffer pro 1 g Pellet in HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,5) resuspendiert und mit Protease-Inhibitoren (150 nM Pepstatin, 40 nM Cystatin und 100 µM PMSF) versetzt und dann bei -20 °C gelagert. Alle rekombinanten Proteine wurden über Hexahistidyl-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Material gereinigt. Die Proteine wurden mit 10 kDa oder 30 kDa Vivaspin-Säulen konzentriert und bei -20 °C in 1,5 ml Reagiergefäßen gelagert.

### 3.4.2 *In vitro* Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Zur Charakterisierung der Sonden und um Interaktionen des rekombinanten Proteins mit Wirkstoffen zu untersuchen, wurden die Wirkstoffe und DIA, DTT, GSH und GSSG im Standard-Reaktionspuffer (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,0) verdünnt und sofort verwendet. Zuvor wurde der Puffer 1 h bei RT entgast. Die gereinigten Proteine wurden mit 20 mM DTT für 30 min bei 4 °C reduziert, anschließend entsalzt (Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting Columns, Thermo Scientific, Waltham, USA) und mit Reaktionspuffer auf eine Endkonzentration von 1,25 µM verdünnt. Eine 5-fache Konzentration der Medikamente (10 µl) oder GSH/GSSG wurde mit 40 µl des 1,25 µM Proteins in einer 96-well-Mikrotiterplatte (schwarz, half-area, µClear<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Frickenhausen) gemischt. Die Fluoreszenzspektren von sfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2 wurden in einem Plattenleser (CLARIOstar, BMG Labtech, Ortenberg) mit einer Anregung von 350 bis 490 nm gemessen und die Emission wurde mit einem 1400-CLA-530-40 Filter detektiert. Als Referenzen wurden die Proteine mit 10 mM DTT vollständig reduziert oder mit 1 mM Diamid oxidiert. Zur Untersuchung der Equilibrierung der Sonde mit Glutathion wurden sfroGFP2, sfroGFP2 plus PfGrx1 (äquimolar, entsprechend 1 µM), hGrx1-sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 mit unterschiedlichen Konzentrationen von GSH (0,1, 2,5 und 5 mM) oder GSSG (5, 10, 20 und 50 µM) inkubiert. Nach 4 min und 4 h wurde das Redox-Ratio gemessen. Für die Inkubation mit GSH wurde dem Puffer zusätzlich 200 µM NADPH und 1 U/ml humane Glutathion-Reduktase zugesetzt, um eine Oxidation des GSH

durch den Luftsauerstoff zu vermeiden. Die Anregung erfolgte wieder bei 405 nm und 480 nm und die Emission wurde bei optimalen Einstellungen gemessen, wobei die Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit zwei technischen Wiederholungen für jede Konzentration analysiert wurden (Abbildung 16). Um eine direkte Wechselwirkung der Wirkstoffe mit dem neuen Redox-Sensor sfroGFP2 auszuschließen, wurde rekombinantes Protein mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen inkubiert und die Verhältnisse (405/475 nm) nach 5 min, 4 h und 24 h gemessen (Abbildung 20).

### 3.4.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für Experimente am konfokalen Mikroskop wurden magnetisch angereicherte *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten (Trophozoit-Stadium) mit vorgewärmter Ringerlösung (37 °C) gewaschen und auf poly-L-Lysin-beschichtete  $\mu$ -Slides VI (für Zeitverlaufsexperimente) oder flache  $\mu$ -Slides 18-well für Endpoint-Experimente (Ibidi, Martinsried, Deutschland) gegeben. Es wurde ein Leica Konfokalmikroskop TCS SP5 (Objektiv HCX PL APO 63,0 x 1,30 GLYC 37 °C UV) verwendet, welches sich in einer 37 °C Kammer befand. Die Argon-Laserleistung wurde auf 20 % eingestellt, gescannt wurde mit einer Frequenz von 400 Hz und einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln. Der Smart Gain betrug 950 V und der Smart Offset -0,9 %. Mit einem sequentiellen Scan wurden die Sonden bei 405 nm und 488 nm angeregt und Emissionen bei 500-550 nm detektiert. Die Laserintensität wurde für beide Zelllinien, NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>, so angepasst, dass der dynamische Bereich der Sonden gut genutzt wurde. Der dynamische Bereich wird ermittelt durch die Division des höchsten Ratios des DIA-Zeitverlaufs ( $R_{ox}$ ) durch das niedrigste Ratio des DTT-Zeitverlaufs ( $R_{red}$ ) (Morgan *et al.*, 2011). Für Zeitreihen wurden nach einer 15-sekündigen Basalmessung alle 5 s über einen Zeitverlauf von 3 min Bilder aufgenommen. Um die Effekte von DIA und DTT (Messung des dynamischen Bereichs) auf die Parasiten zu untersuchen, wurden 50  $\mu$ l Zellen mit 1 mM DIA und 10 mM DTT inkubiert und die Fluoreszenzsignale über einen Zeitverlauf von 3 min beobachtet.

Gleichzeitig mit den anderen Bildern wurden immer Bilder zur Überprüfung der Autofluoreszenz aufgenommen (Ex 405 nm/Em 430-450 nm), aber es wurde kein störendes Fluoreszenzsignal detektiert. Zur Analyse wurde die Leica LAS AF Lite Software verwendet und anschließend mit Excel die Ratios (405/488 nm) der Fluoreszenzsignale berechnet. Die Grafiken wurden mit GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) erstellt. Zur Analyse wurden ausschließlich Parasiten ausgewählt, die sowohl bei 405 als auch bei 488 nm Anregung Fluoreszenzsignale zeigten und eine intakte Wirtszelle hatten. Bei allen Experimenten wurden unbehandelte Parasiten als Kontrollen und bei Endpunktexperimenten auch vollständig oxidierte (2-minütige Inkubation mit DIA) und vollständig reduzierte (2-minütige Inkubation mit DTT) Parasiten gemessen. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt. Für den Zeitverlauf wurden mindestens drei Parasiten ausgewertet, was zu mindestens neun experimentellen Werten pro Datenpunkt führte. Die Endpunktexperimente umfassten mindestens zehn Parasiten, was zu mindestens 30 experimentellen Werten pro Inkubation führte. Der Kontrast der gezeigten konfokalen Bilder wurde leicht erhöht (für alle gleich), um die Visualisierung mit dem bloßen Auge zu erleichtern.

### 3.4.4 Plattenleser-Messungen

Für die 4 h und 24 h Experimente wurden die Zellen gewaschen und nach der Inkubation in vorgewärmter Ringerlösung (37 °C) zu einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  iRBC/ $\mu$ l verdünnt. 10  $\mu$ l Zellen ( $1 \times 10^6$  iRBCs) wurden in jede Vertiefung einer 384-well-Platte (schwarz, flacher Boden, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert und mit einem CLARIOstar-Plattenlesegerät bei Anregungswellenlängen von 405 nm und 475 nm (Emission 510 nm) gemessen. Zur Untersuchung der Kurzzeiteffekte von DIA und DTT (Messungen des dynamischen Bereichs) auf die Parasiten wurden 10  $\mu$ l Zellen ( $1 \times 10^6$  Trophozoiten) mit 1 mM DIA und 10 mM DTT inkubiert und die Fluoreszenzsignale über einen Zeitverlauf von 3 min beobachtet. Endpunktmessungen wurden mit 10  $\mu$ l Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Trophozoiten) in einer 384-well-Platte durchgeführt. Der *Gain* der Anregungswellenlängen 405 nm und 475 nm wurde so eingestellt, dass sie dem vollen dynamischen Bereich der Redox-Sonden entsprachen. 475 nm statt 488 nm wurde aufgrund der verfügbaren Filter des verwendeten Plattenlesegerätes gewählt, sowie um sicherzustellen, dass die Anregungswellenlänge die Emission nicht negativ beeinflusst. Zur Auswertung wurde die Ratio der Emissionen nach Anregung bei 405 nm und 475 nm berechnet.

Die Grafiken wurden mit der GraphPad Prism 6 Software (San Diego, CA, USA) erstellt. Für die statistische Analyse wurden Einweg-ANOVAs mit 95 % Konfidenzintervallen (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ) mit dem Dunnett's Multiple Comparison Test durchgeführt.

### 3.4.5 Berechnung des Grades der Oxidation und des Glutathionredoxpotentials

Der Oxidationsgrad (*OxD*) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{OxD}_{\text{roGFP2}} = \frac{R - R_{\text{red}}}{\frac{I_{488\text{ox}}}{I_{488\text{red}}} (R_{\text{ox}} - R) + (R - R_{\text{red}})}$$

Wobei *R* das Ratio der Emission nach Excitation bei 405/488 nm ist;  $R_{\text{red}}$  das Ratio des mit 10 mM DTT voll reduzierten roGFP2;  $R_{\text{ox}}$  das Ratio des mit 1 mM DIA voll oxidierten roGFP2;  $I_{488\text{ox}}$  die Fluoreszenzintensität der oxidierten Sonde bei 488 nm; und  $I_{488\text{red}}$  die Fluoreszenzintensität der reduzierten Sonde bei 488 nm ist.

Die Berechnung des Glutathionredoxpotential erfolgte nach folgender Formel (Schwarzländer *et al.*, 2008):

$$E_{\text{roGFP2}}^{\text{pH}} = E'_{\text{roGFP2}} - \frac{2,303 RT}{zF} \log_{10} \frac{(1 - \text{OxD}_{\text{roGFP2}})}{\text{OxD}_{\text{roGFP2}}}$$

*R* = Gaskonstante ( $8,315 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ); *T* = absolute Temperatur (310,45 K); *z* = Nummer der transferierten Elektronen (2); *F* = Faraday-Konstante ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ ).

Um das *Midpoint Redox Potential* an den pH-Wert anzupassen, wurde folgende Gleichung verwendet:

$$E'_{\text{roGFP2}}^{\text{pH}} = E'_{\text{roGFP2}} - \frac{2,303 RT}{zF} (\text{pH} - 7)$$

Nach Dooley *et al.* (2004) ist das konsentrierte *Midpoint Potential* von roGFP2 -280 mV. Der pH-Wert des Zytosols von *P. falciparum* wurde mit pHluorin gemessen und liegt bei pH 7,16 (Mohring *et al.*, 2017). Dieser Wert wurde zur Berechnung angenommen.

### 3.4.6 Expression von sfroGFP2 im asexuellen Lebenszyklus

Der asexuelle Lebenszyklus der NF54<sup>[sfroGFP]</sup>-Parasiten dauert etwa 48 h. Um die Expression der Sonde über den asexuellen Zyklus zu verfolgen, wurde eine Kultur mit etwa 8 % Parasitämie mittels Percoll-Gradient eng synchronisiert, gefolgt von Sorbitol-Synchronisierung. Der Percoll-Gradient wurde mit kleinen Veränderungen nach Moll *et al.* (2008) durchgeführt (siehe 3.2.4). Dadurch wurden Schizonten isoliert und konnten für drei Stunden reinvadieren. Im Anschluss wurde der Percoll-Gradient wiederholt und dieses Mal die Ringe isoliert und direkt danach noch eine Sorbitol-Synchronisierung durchgeführt um eventuell verbliebene Schizonten zu entfernen. Dadurch konnte das Zeitfenster der Parasiten auf drei Stunden eingeeengt werden. Die ersten Proben wurden direkt nach dem Sorbitol (t=0) und danach alle fünf Stunden (5 h, 10 h, 15 h, 20 h, 25 h, 30 h, 35 h, 40 h, 45 h, 50 h) entnommen. Es wurden Blutausstriche angefertigt und mit Giemsa gefärbt und Proben für den Western Blot entnommen und vorbereitet. Dazu wurden 15 µl infizierte Erythrozyten in 400 µl Saponinlyse-Puffer resuspendiert und für 3 min inkubiert und invertiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert (13.400 rpm 3 min, RT, Minispin) und das Pellet mit 20 µl M-PER™-Puffer gelöst und 5 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. 15 µl des Überstandes wurden mit 5 µl 4-fach-Lämmli-Probenpuffer + DTT gemischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Alle Proben wurden bei -20 °C bis zur Gelelektrophorese gelagert. Bei der SDS-Page wurden die Proben der Parasitenlysate, sowie 3,5 µg rekombinantes sfroGFP2 auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf Nitrocellulose transferiert. Die Membran wurde mit 3 % BSA in Trispuffer mit 0,05 % Tween 20 für 1 h blockiert und gewaschen, bevor der α-GFP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in BSA für 1 h dazugegeben wurde. Nach erneutem Waschen wurde der sekundäre Antikörper (α-Maus IgG Antikörper; Verdünnung 1:10.000) für eine Stunde mit der Membran unter Schütteln inkubiert. Die Antikörper wurden in 3 % BSA in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20 verdünnt. Zusätzlich zu den Western Blots wurden von 20-50 h alle 5 h Bilder am Konfokalmikroskop aufgenommen. Dafür wurde die Parasitenkultur einmal mit vorgewärmter (37 °C) Ringerlösung (122,5 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 11 mM D-Glucose, 25 mM Hepes, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen und in Ringerlösung resuspendiert.

### 3.4.7 Effekte von redox-aktiven Verbindungen und Malariamedikamenten auf die Redox-Homöostase

Die Effekte von Malariamedikamenten auf die Redox-Homöostase von *P. falciparum* wurden in Mittel- (4 h) und Langzeit-Inkubationsexperimenten (24 h) untersucht. Für die 4 h-Experimente wurden Trophozoiten (26-30 h nach Invasion; 6-8 % Parasitämie) von NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup> magnetisch angereichert und mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend für mindestens 1 h im Inkubator zur Erholung gelagert ( $2 \times 10^5$  Trophozoiten/µl). Die Parasiten wurden bei einer Konzentration des 100-fachen EC<sub>50</sub>-Wertes für 4 h unter

Zellkulturbedingungen behandelt und anschließend wurden die freien Thiolgruppen mit 2 mM N-Ethylmaleimid (NEM) für 15 min bei 37 °C blockiert.

Für 24 h Experimente wurden 5 ml einer Kultur mit Ringstadien (6-10 h nach der Invasion; 6-8 % Parasitämie) mit einer Konzentration von 10-fach  $EC_{50}$  inkubiert. Vor der magnetischen Anreicherung wurden die freien Thiole mit 2 mM NEM blockiert. Nachdem die Zellen gewaschen wurden, wurden sie in Ringerlösung resuspendiert.

Alle Experimente beinhalteten als Kontrolle unbehandelte Parasiten sowie vollständig oxidierte und vollständig reduzierte Parasiten (2-minütige Inkubation mit 1 mM DIA bzw. 10 mM DTT vor der Blockierung mit NEM). Jedes Experiment wurde dreimal mit frisch vorbereiteten Parasiten durchgeführt.

### 3.4.8 Kristallisation von sfroGFP2

Die Funktion eines Proteins wird durch seine dreidimensionale Struktur bestimmt, weshalb die Kenntnis dieser ihre detaillierte Charakterisierung wesentlich erleichtert (Chayen & Saridakis, 2008). Um die Unterschiede von sfroGFP2 zum bekannten roGFP2 besser zu untersuchen, wurde sfroGFP2 kristallisiert und mit Röntgenkristallographie untersucht.

SfroGFP wurde wie bereits in 3.4.1 beschrieben hergestellt. Danach wurde eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt um die Reinheit des Proteins zu erhöhen. Zur Proteinkristallisation wurde die Probe auf 30 mg/ml konzentriert, bevor die Screens unter Verwendung des Pipettierroboters (Honey Bee 961) getestet wurden um nach passenden Kristallisationsbedingungen zu suchen. Mit dieser so gefundenen Bedingung wurden dann die Kristalle gezüchtet. Es wurden 0,2  $\mu$ l Proteinlösung (in 300 mM NaCl und 0,05 M Hepes (pH 7,5)) mit 0,2  $\mu$ l Reservoir-Lösung (46 % ETOH, 0,25 % v/v Dichlormethan) gemischt und Kristalle bei 22 °C mittels Dampfdiffusionstechnik gezüchtet (*sitting drops*). Um die Kristalle vor Strahlenschäden zu schützen, werden sie bei 100° K gemessen. Da Proteinkristalle zu etwa 50 % aus Lösungsmittel bestehen, welches bei diesen tiefen Temperaturen gefrieren würde, müssen die Kristalle vor der Messung im Kristallisationspuffer (*mother liquor*) plus einem Gefrierschutz, in diesem Fall 15 % Glycerin, getränkt werden. Die Beugungsdaten wurden an der X10SA (Detektor: Pilatus) *Swiss Light Source* in Villigen (Schweiz) bei 100 K gesammelt und mit XDS verarbeitet (Kabsch, 2010). Die Struktur wurde durch molekularen Ersatz gelöst. Das Suchmodell wurde mittels Homologiemodellierung mit SWISS-MODEL generiert (Waterhouse *et al.*, 2018). Als Vorlage für die Modellierung wurde die Struktur von *Aequorea victoria* GFP (Protein Data Bank (PDB) code 1qyo) genutzt, das eine Sequenzidentität von 94 % mit sfroGFP2 teilt. Um die Güte des Modells zu beurteilen wird der  $R_{\text{free}}$  verwendet, dafür wurden 6 % aller Reflexe nicht für die Berechnung der Elektronendichte verwendet. Schon die erste Verfeinerung mit der molekularen Ersatzlösung ergab einen  $R_{\text{free}}$ -Wert von 25 %. Mit Hilfe der ersten Elektronendichte wurde das Strukturmodell verbessert und damit eine neue Dichte berechnet. In iterativen Zyklen von und computergestützter Verfeinerung und manuellem Modellbau wurde das Modell verbessert bis zu einem endgültigen  $R_{\text{free}}$ -Wert von 15,6 %. Das PHENIX-Programmpaket (Adams *et al.*, 2010) wurde für den Molekularen Ersatz und zur Strukturverfeinerung verwendet. Das interaktive Grafikprogramm Coot (Emsley *et al.*, 2010)

diente zur manuellen Modellkorrektur. Grafiken der Modelle wurden mit dem Chimera-Paket von UCSF erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Die Proteinkristallisationsexperimente erfolgten unter Hilfe von Michaela Stumpf und Kim Heimsch. Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Dr. Karin Fritz-Wolf am Max-Planck-Institut in Heidelberg durchgeführt.

## 3.5 SILAC-Methoden

### 3.5.1 Etablierung der Stress-Bedingungen

Für das SILAC-Experiment sollten gute Bedingungen gefunden werden, welche subletalen oxidativen Stress in den Parasiten auslösen, um anschließend analysieren zu können, ob dieser oxidative Stress zu einem geänderten Muster der glutathionylierten beziehungsweise sulfenylierten Proteine führt. Zur Bestimmung der optimalen Stress-Bedingungen wurden einige Vortests durchgeführt. Es wurden  $\alpha$ -GSH Western Blots nach Inkubationen von 3D7-Parasiten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukoseoxidase (30-200 mU/ml) durchgeführt. Es wurden Thiole im Zelllysat und Extrakt bestimmt und reduziertes Glutathion und Gesamtglutathion bestimmt (siehe 3.3.5).

### 3.5.2 Markierung und Ernte der Parasiten

3D7 *P. falciparum* Parasiten wurden bei einer Parasitämie von 0,5-8 % kontinuierlich, wie oben beschrieben, kultiviert. Zur Markierung der Parasiten mit schwerem Isoleucin wurden die Parasiten mittels Sorbitol auf ein Zeitfenster von etwa 5 h synchronisiert, bevor sie 24 h in Isoleucin-freiem Medium kultiviert wurden. Danach wurden sie für 3 x 48 h (drei komplette Lebenszyklen) mit dem gleichen Isoleucin-freiem Medium kultiviert, dem entweder 0,38 mM schweres Isoleucin (52,7 mg/ml;  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_1$ ,  $\geq 98$  % Isotop Reinheit, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) oder leichtes Isoleucin (50 mg/ml, Sigma Aldrich) zugesetzt waren. Dabei kommt es pro eingebautem Isoleucin-Molekül zu einem Massenshift von 7 Da. Vor der Ernte der Trophozoiten (Parasitämie bis zu 16 %) mittels Saponin-Lyse wurden die Parasiten für eine Stunde mit 100 mU/ml GOD inkubiert.

### 3.5.3 Isolierung von S-glutathionylierten Proteinen aus *P. falciparum* Zelllysat

Die Isolierung der S-glutathionylierten Proteine aus den SILAC-Zelllysaten wurde nach dem Protokoll von Kehr *et al.* (2011) durchgeführt. Im ersten Schritt werden die freien Cysteine mit NEM blockiert, welches frisch dem Lysepuffer zugefügt wird (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,0 + 50 mM NEM + cComplete). Zur Lyse wurde zum Pellet das doppelte Volumen des Lysepuffers zugesetzt, gut gemischt und gevortext und anschließend vier Zyklen „Frieren und Tauen“ durchgeführt, bevor für 30 min bei 50.000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert wurde. Direkt im Anschluss wurde die NEM-Reaktion gestoppt, indem mit Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Scientific) entsalzt und der Puffer gewechselt wurde (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0). Als nächstes wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt und jeweils die „leichte“ Kontrolle mit der „schweren“ Probe und die „leichte“ Probe mit der „schweren“ Kontrolle bei gleicher Proteinmenge vereinigt. Bei drei biologischen Replikaten

erhielt man so 6 Proben. Diese wurden nun in drei Teile aufgeteilt und unterschiedlichen Protokollen unterzogen: 1. „normaler“ *Pulldown*, 2. *Pulldown* ohne Deglutathionylierungsschritt und 3. *Pulldown* ohne Biotinmaleimid-Markierung (siehe auch Tabelle 13). 12 der 18 Proben wurden mit 1 mM GSH, 1 mM NADPH, 4 U/ml hGR und 5  $\mu$ M Grx (CSC-Mutante) für 30 min bei RT inkubiert, um das an die Cysteine gebundene Glutathion zu entfernen.

**Tabelle 13: Aufteilung der Proben für den *Pulldown* der glutathionylierten Proteine.**

	<b>Kontrolle <i>heavy</i> + GOD-Stress <i>light</i></b>	<b>Kontrolle <i>light</i> + GOD-Stress <i>heavy</i></b>
<b>„normaler“ <i>Pulldown</i></b>	Probe 1, 7, 13	Probe 4, 10, 16
<b>Ohne Deglutathionylierung</b>	Probe 2, 8, 14	Probe 5, 11, 17
<b>Ohne Biotinmaleimid</b>	Probe 3, 9, 15	Probe 6, 12, 18

Alle 18 Proben wurden erneut umgepuffert (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,0) mit Zeba Spin Desalting Columns. Die durch die Deglutathionylierung neu entstandenen freien Cysteinreste wurden mit 5 mM Biotinmaleimid (30 min bei RT) bei 12 der 18 Proben blockiert, den anderen sechs Proben, die als Kontrolle dienen, wurde lediglich DMSO zugesetzt. Durch erneutes Entsalzen und Umpuffern (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0) wurde die Reaktion gestoppt und überschüssiges Biotinmaleimid entfernt. Zur Anreicherung der biotinylierten Proteine wurde SoftLink™ Soft Release Avidin Resin (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Vorbereitung der Beads wurden diese für 2 h bei RT unter Rotation in Säulchen inkubiert. Es folgten fünf Waschschrte mit zweifachem Säulenvolumen (500  $\mu$ l) zwischen denen jeweils eine 1 min bei 1000 g zentrifugiert wurde. Eluiert wurde in drei Schritten mit 5 mM Biotin im Probenpuffer. Dazu wurde das Säulenmaterial mit den gebundenen Proteinen jeweils für 5 min mit dem Puffer inkubiert und dann wieder zentrifugiert. Das Säulenmaterial wurde zwar regeneriert, aber für das Experiment wurde immer frisches Material verwendet um Verschleppungen/ Kontaminationen zu vermeiden. Es wurden  $\alpha$ -Biotin Western Blots zur Kontrolle durchgeführt, die drei Eluate wurden gepoolt und alle Proben (inklusive Waschschrte) bei -80 °C gelagert. Die 18 Eluate wurden dann auf Trocken- eis zur massenspektrometrischen Analyse an unseren Kooperationspartner, Prof. John R. Yates III am Scripps Research Institut in La Jolla, USA, gesendet.

### 3.5.4 Massenspektrometrische Analyse und Auswertung

Die weitere Prozessierung der Proben mit tryptischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse wurden von Prof. Claire Delahaunty am Scripps Research Institute, San Diego, Kalifornien, durchgeführt. Nach mehreren Vortests wurde entschieden auf eine vorherige Präzipitierung der Proben zu verzichten, um nicht zu viel Protein zu verlieren. Die Proben wurden mit TCEP vorreduziert und mit Iodacetamid (IAA) alkyliert. Die Proben wurden unter Druck auf eine Mikrokapillarsäule aus Quarzglas geladen, die mit einem starkem Partishpere-Kationenaustauscherharz (Whatman) gepackt war, gefolgt von Aqua C18-Harz (Phenomenex), bevor die Säule mit 5 % Acetonitril/0,1 % Ameisensäure (Puffer A) gewaschen wurde. Nach dem Waschen wurde eine Kapillare mit 100  $\mu$ m Innendurchmesser (i.d.) mit einer 5  $\mu$ m gezogenen Spitze, die mit 15 cm 3  $\mu$ m Aqua C18-Material (Phenomenex) gepackt war,

angeschlossen, und die gesamte Split-Säule wurde in eine Agilent 1100 quaternäre Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt und mittels einer neunstufigen Trennung analysiert. Die zur Trennung verwendeten Pufferlösungen waren: 5 % Acetonitril/0,1 % Ameisensäure (Puffer A); 80 % Acetonitril/0,1 % Ameisensäure (Puffer B); und 500 mM Ammoniumacetat/5 % Acetonitril/0,1 % Ameisensäure (Puffer C). Schritt 1 bestand aus einem 90-minütigen Gradienten von 0 % auf 100 % Puffer B. Die Schritte 2-9 hatten das folgende Profil: 10 min mit X% Puffer C, ein 15-minütiger Gradient von 0 % auf 5 % Puffer B und ein 95-minütiger Gradient von 15 % auf 100 % Puffer B. Die 10-minütigen Puffer-C-Prozentsätze (X) waren: 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % und 100 %, jeweils für die 9-Schritt-Analyse. Die von der Mikrokapillarsäule eluierten Peptide wurden durch Anlegen einer distalen Sprühspannung von 2,4 kV direkt in ein Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer (Thermo Fisher) gesprüht. Ein Zyklus von einem Full-Scan-Massenspektrum (400-1800 m/z), gefolgt von 15 datenabhängigen Tandem-MS-Spektren bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 35 % wurde während jedes Schritts der mehrdimensionalen Trennung kontinuierlich wiederholt. Die Anwendung von Massenspektrometer-Scanfunktionen und HPLC-Lösungsmittelgradienten wurde durch das XCalibur-Datensystem gesteuert.

### 3.5.5 Auswertung

Die Tandem-Massenspektrometrie-Daten wurden unter Verwendung von ProLuCID, DTASelect 2.0 und Census analysiert (Cociorva *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Park & Yates, 2010; Tabb *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2015). Die Rohdaten der Spektren wurden mit RawExtract 1.9.9 (<http://fields.scripps.edu/downloads.php>) (McDonald *et al.*, 2004) extrahiert und gegen die PlasmoDB-Datenbank durchsucht. Modifikationen am Cystein von +57,02146 (IAA) und +141,04261 (NEM gebunden an Sulfensäure) als Teil der Probenvorbereitung und + 451,1889 (Biotinmaleimid) wurden als mögliche Modifikation berücksichtigt. Die Validität der Peptid-/Spektrum-Übereinstimmungen wurde nach Wang *et al.* (2015) mit einer Konfidenz von 97 % als Mindestgrenzwert und einer Peptid-Delta-Massenbegrenzung von maximal 15 ppm bewertet, was zu einer *False Discovery Rate* von unter 1,5 % führt. Zur quantitativen Analyse der isotonenmarkierten Peptide wurde Census verwendet, wobei ein Ionenchromatogramm generiert wird und daraus die Peptidionenintensitätsverhältnisse berechnet werden.

## 3.6 Untersuchung der Interaktionspartner der PfCK1 und ihrer Veränderung durch (oxidativen) Stress (GFP-Pulldown)

### 3.6.1 Kultivierung und Ernte der Parasiten

Die Parasiten mit der GFP-getaggten CK1 wurden von Prof. Christian Doerig (Monash University, Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt und die Kultivierung wurde vor Ort im Labor durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte wie bereits oben beschrieben (3.2.1), wobei jedoch Kulturen von 150 ml (3,3 % Hämatokrit) in einem Erlenmeyerkolben von Hand begast wurden (Gasgemisch aus 5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % N<sub>2</sub>) und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert wurden. Zur Behandlung der Parasiten wurden 50 ml Medium abgenommen und die verbleibenden 100 ml mit den Wirkstoffen GOD (100mU/ml), ART (10x IC<sub>50</sub>), VI16832 (10x IC<sub>50</sub>) oder DMSO (für die Kontrolle) für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Ernte, wie oben beschrieben, durchgeführt, wobei am Ende ein



Proteaseinhibitor zugegeben wurde. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren und auf Trockeneis nach Deutschland versendet. Die Inkubation mit GOD wurde analog zum SILAC-Experiment gewählt.

### 3.6.2 Anreicherung der GFP-getaggtten CK1 und ihrer Interaktionspartner

Die Zellyse der Parasitenpellets wurde mit M-PER™-Puffer durchgeführt. Dazu wurden 200 µl M-PER™-Puffer und 8 µl cOmplete Protease-Inhibitor zu dem Pellet hinzugegeben und kräftig gemischt. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 4 °C und 13.400 rpm (MiniSpin® Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reagiergefäß überführt. Zur Anreicherung der GFP-getaggtten CK1 und ihrer Interaktionspartner wurde die GFP-Trap®\_A von ChromoTek nach Herstellerangaben bis Schritt 7 verwendet. Die Beads wurden fünfmal gewaschen, wobei bei den ersten drei Waschschritten cOmplete zugesetzt war. Bei dem vierten und fünften Waschgang wurde nur *dilution buffer* verwendet. Danach wurden die Proben zur MS-Analyse an die AG Linne (Universität Marburg) übergeben.

Um den Proteingehalt der Waschschriffe und die Proteinprofile der Elutionsschritte zu prüfen, wurde eine Silberfärbung eines SDS-Gels durchgeführt. Dazu wurde das Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.6.3 Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie wurde von der AG Linne an der Universität Marburg durchgeführt.

Für die *on-bead-Digestion* wurden die Beads zuerst dreimal mit 100 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonatlösung gewaschen. Danach wurden die Proben "on-bead" durch Zugabe von Trypsin (Serva) aufgeschlossen und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in frische Röhrchen überführt. Nach der Entsalzung wurden die Peptide mit Chromabond C18WP-Spinsäulen (Macherey-Nagel, Teil Nr. 730522) konzentriert. Danach wurden die Peptide in 25 µl Wasser mit 5 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure gelöst.

Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde mit einem Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer (ThermoScientific) durchgeführt. Ein Ultimate-NanoRSLC-HPLC-System (Dionex), das mit einer kundenspezifischen, mit 2,4 µm-Beads gefüllten 50cm x 75 µm C18 RP-Säule (Dr. Maisch) ausgestattet war, wurde über eine Proxeon-Nanosprayquelle online mit dem Massenspektrometer verbunden. 1-15 µl (je nach Peptidkonzentration und Probenkomplexität) des tryptischen Verdau wurden auf eine 300 µm ID x 1 cm C18 PepMap Vorkonzentrationssäule (Thermo Scientific) injiziert. Automatisches *Trapping* und Entsalzen der Probe wurde bei einer Flussrate von 6 µl/min unter Verwendung von Lösungsmittel A (Wasser/0,05 % Ameisensäure als Lösungsmittel) durchgeführt.

Die Trennung der tryptisch-verdauten Peptide wurde mit dem folgenden Gradienten aus Lösungsmittel A und Lösungsmittel B (80 % Acetonitril/0,045 % Ameisensäure) bei einer Flussrate von 300 nl/min erreicht: Halten von 4 % B für fünf Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten auf 45 % B innerhalb von 30 min und einem linearen Anstieg auf 95 % Lösungsmittel B in weiteren 5 min. Die Säule war mit einem Nanoemitter aus rostfreiem Stahl (Proxeon, Dänemark) verbunden und das Elutionsmittel wurde unter Verwendung eines Potentials von 2300 V direkt auf die beheizte Kapillare des Massenspektrometers gesprüht.

Ein Übersichtsscan mit einer Auflösung von 60000 innerhalb des Orbitrap-Massenanalysators wurde mit mindestens drei datenabhängigen MS/MS-Scans mit dynamischem Ausschluss für 30 s kombiniert, entweder unter Verwendung von CID mit der linearen *Ion-Trap* oder unter Verwendung von HCD, kombiniert mit Orbitrap-Detektion bei einer Auflösung von 7500.

Details zur MS-Analyse sind verfügbar unter:

<https://www.uni-marburg.de/de/fb15/fachbereich/infrastruktur/servicelabors/massenspektrometrie-und-elementaranalytik/bioanalytik/methodentexte-zum-einfuegen-in-publikationen-und-abschlussarbeiten>

#### **3.6.4 Auswertung**

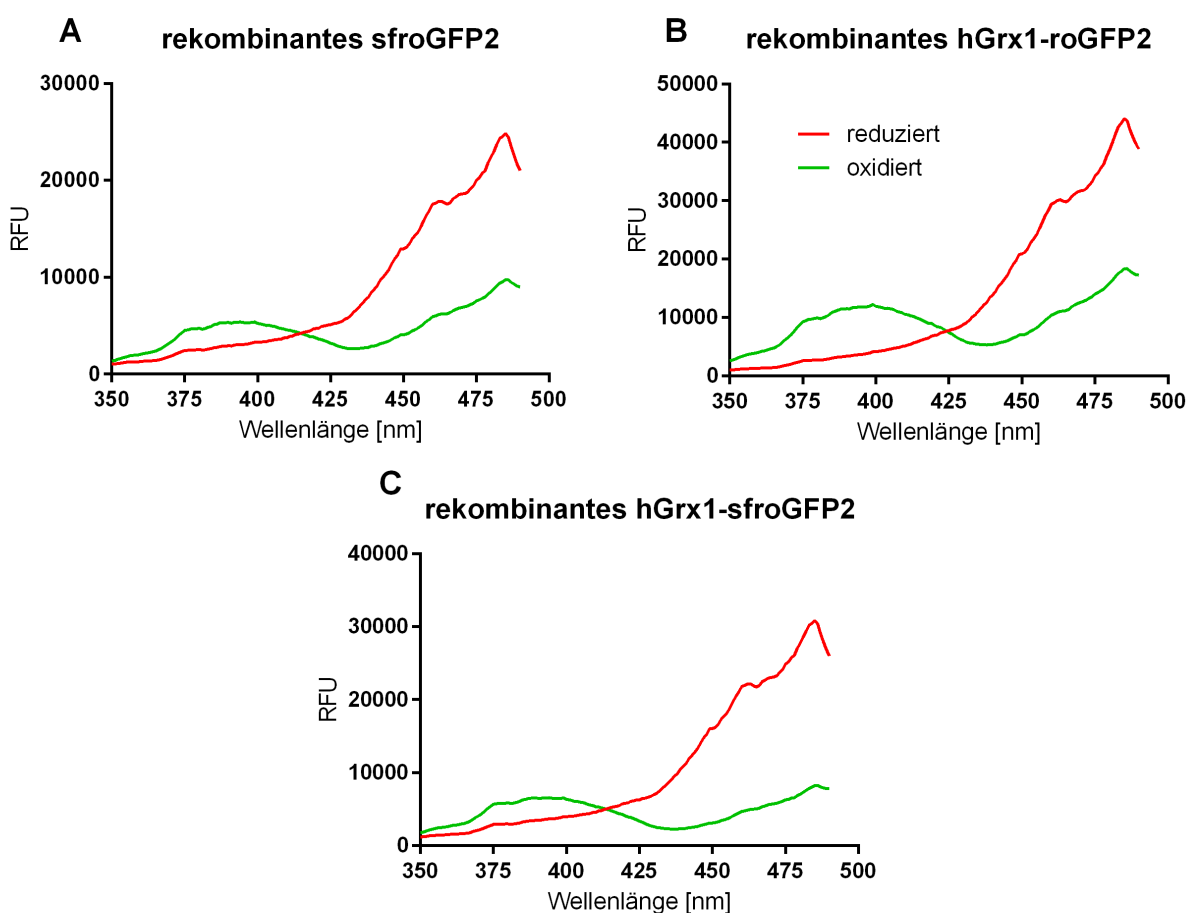
Die Datenanalyse wurde mit Proteome Discoverer 2.2 (ThermoScientific) mit der Suchmaschine SEQUEST oder MaxQuant mit der Suchmaschine Andromeda durchgeführt. Es wurden Uniprot-Datenbanken und PlasmoDB (Release 50beta) verwendet. Die Software PEAKS (Bioinformatics Solutions Inc.) wurde verwendet, um die hoch- bzw. herunterregulierten Proteine zu identifizieren und die Heatmap zu erstellen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 sfroGFP2 als Redox-Sonde in *P. falciparum*

#### 4.1.1 *In vitro*-Vergleich der rekombinanten Proteine

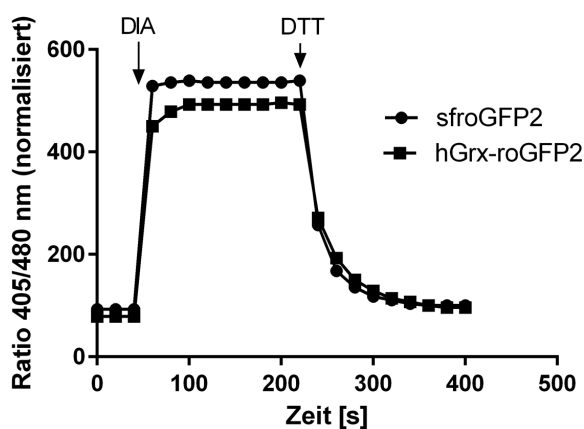
Bevor Experimente mit der neuen Redox-Sonde sfroGFP2 *in cellulo* durchgeführt wurden, wurden die Eigenschaften des rekombinanten Proteins *in vitro* getestet und mit der bereits etablierten Sonde hGrx1-roGFP2 verglichen. Zum Vergleich der Spektren wurden mittels heterologer Überexpression die rekombinanten Proteine hGrx1-roGFP2, sfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2 hergestellt und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Abbildung 13 zeigt die Spektren der drei Proteine bei vollständiger Reduktion mittels 10 mM DTT und vollständiger Oxidation mit 1 mM DIA.



**Abbildung 13: Spektren der rekombinanten Proteine hGrx1-roGFP2, sfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2.** Die Abbildung zeigt die Exzitatioenspektren der rekombinanten Proteine bei vollständiger Reduktion mit 10 mM DTT (rot) und vollständiger Oxidation mit 1 mM DIA (grün) nach Anregung bei 350-490 nm.

Es zeigten sich zwei Exzitatioens-Maxima bei etwa 400 nm und zwischen 475-490 nm bei allen drei Proteinen, wobei das Maximum bei 400 nm bei hGrx1-roGFP2 am prominentesten war. Durch Oxidation stieg der Peak bei 400 nm, wohingegen bei Reduktion die Fluoreszenz bei 400 nm abfiel, bei 488 nm aber deutlich anstieg. Der isosbestische Punkt lag bei der roGFP2-

basierten Sonde bei etwa 425 nm. Bei den sfroGFP2-basierten Sonden verschob er sich etwas nach links und lag bei etwa 415 nm.

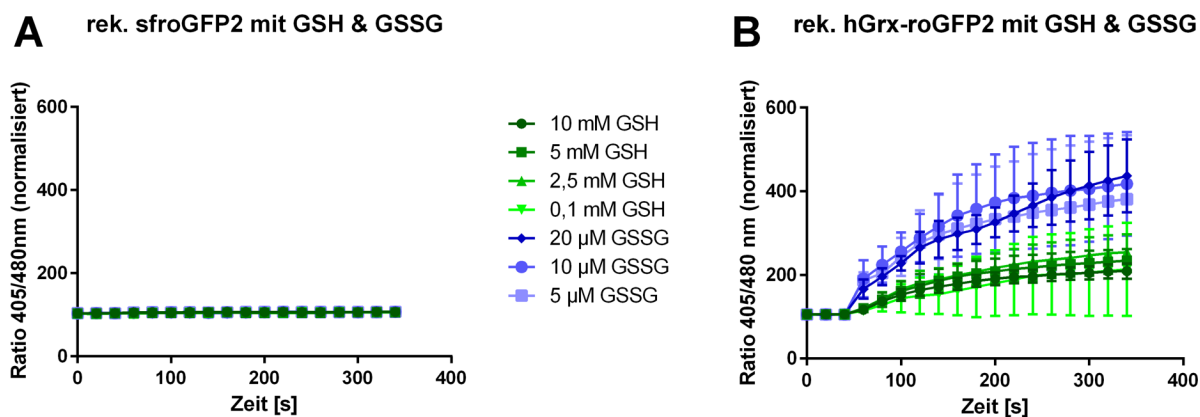


**Abbildung 14: Dynamische Veränderung des Ratios durch Oxidations- und Reduktionsmittel.** Die beiden rekombinanten Proteine sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 wurden mit DTT vorreduziert und dann entsalzt. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M wurden die Proteine für 60 s basal gemessen, bevor sie mit 1 mM DIA vollständig oxidiert wurden. Durch Zugabe von 10 mM DTT wurde die Sonde wieder reduziert.

Abbildung 14 zeigt vergleichend in *real-time*, wie die rekombinanten Proteine durch DIA oxidiert und durch DTT anschließend wieder reduziert wurden. Die beiden rekombinanten Proteine sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 wurden mit DTT vorreduziert und dann entsalzt. Mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M wurden die Proteine für eine Minute basal gemessen, die Zugabe von 1 mM DIA oxidierte beide Proteine innerhalb von Sekunden vollständig. Eine Zugabe von 10 mM DTT führte zur Reduktion und zeigt die Reversibilität der Oxidation der Sonde.

#### 4.1.2 Interaktion der Sonden mit Glutathion und Glutaredoxin

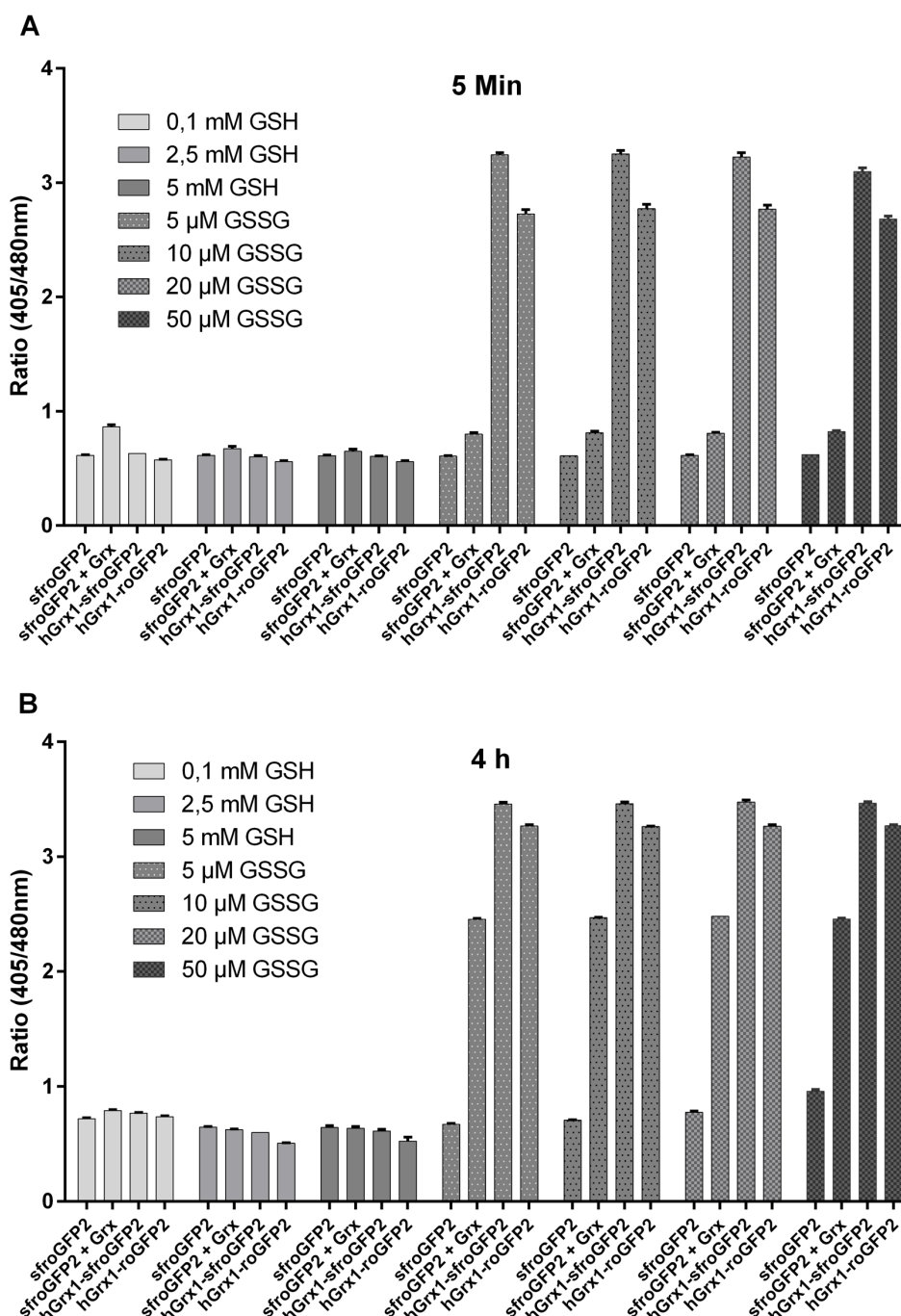
Es ist bekannt, dass die roGFP-Sensoren in Anwesenheit von Grx 100.000-fach schneller Oxidation durch GSSG vermitteln (Gutscher *et al.*, 2008). Liegt kein Grx vor, dauert dieser Prozess sehr lange. Dies konnte auch hier durch die Inkubation von sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 mit verschiedenen Konzentrationen von GSH (0,1 mM bis 10 mM) und GSSG (5  $\mu$ M bis 20  $\mu$ M) nochmals gezeigt werden. Es wurde erst eine Minute basal gemessen, bevor der Anstieg des Oxidationslevels für 5 min nach Zugabe von GSH oder GSSG gemessen wurde. Abbildung 15 zeigt, dass hGrx1-roGFP2 (Abbildung 15 A) im Unterschied zu sfroGFP2 (Abbildung 15 B) innerhalb der dreiminütigen Messung durch GSSG effizient oxidiert wurde. In geringerem Maße fand auch eine Oxidation durch GSH statt.



**Abbildung 15: Inkubation von sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 mit GSH und GSSG.** Das Maß an Oxidation der rekombinanten Proteine wurde erst für 1 min ohne Zugabe von Glutathion gemessen, bevor nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von GSH (0,1 mM bis 10 mM) und GSSG (5 µM bis 20 µM) der Anstieg der Oxidation für 5 min gemessen wurde.

Um die Fähigkeit der sfroGFP2-Sonde zur Äquilibration mit GSH und GSSG zu verifizieren, wurde das rekombinante Protein mit reduziertem und oxidiertem Glutathion in Abwesenheit oder Anwesenheit einer äquimolaren Konzentration (1 µM) von PfGrx1 inkubiert. Das Redox-Ratio wurde nach 5 min und 4 h Inkubation gemessen (Abbildung 16). Zum direkten Vergleich wurden hGrx1-sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 parallel getestet.

Für die Inkubation mit GSH wurden dem Puffer 200 µM NADPH und 1 U/ml hGR zugesetzt, um eine Oxidation des GSH über den Verlauf der Zeit zu vermeiden. Die Emission wurde nach Anregung bei 405 nm und 480 nm in einem Plattenleser mit optimalen Leseinstellungen gemessen. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit zwei technischen Replikaten wurden für jede Konzentration analysiert. Die Inkubation mit GSH (0,1, 2,5 und 5 mM) zeigte eine konstante und vergleichbare Reduktion der Sonden über die Zeit. GSSG (5, 10, 20 und 50 µM) hatte einen deutlichen zeitabhängigen oxidativen Effekt auf alle Sonden. Dieser Effekt war stärker ausgeprägt, wenn Grx in der Inkubationsmischung vorhanden war. Wenn Grx direkt an die Sonde gebunden war, reagierten die Sonden schneller und die oxidative Wirkung von GSSG zeigte sich schon nach 5 min deutlich (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Äquilibrierung der Sonden mit GSH und GSSG in An- und Abwesenheit von Grx.** Die Oxidationslevel wurden nach 5 min (A) und 4 h (B) bestimmt. SfroGFP2 wird in Abwesenheit von Grx kaum durch GSSG oxidiert. Die Sonden mit direkt gekoppeltem Grx reagieren schon nach 5 min sehr stark. SfroGFP2 mit zugesetztem Grx zeigt eine leichte Oxidation, die nach 4 h stärker ist als nach 5 min (Schuh *et al.*, 2018).

#### 4.1.3 Transfer der Redox-Messungen auf den Plattenleser

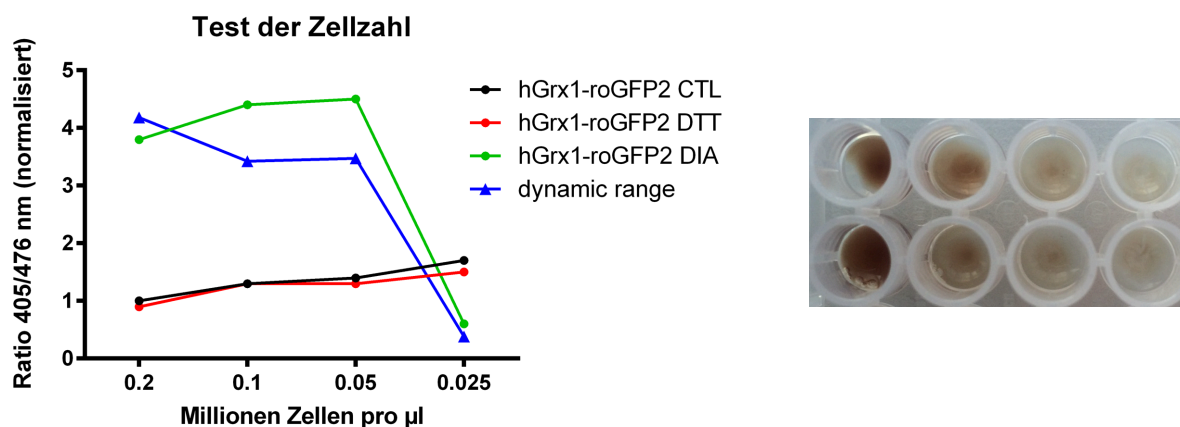
Der Transfer der Messungen mit den genetisch kodierten Redox-Sonden vom konfokalen Mikroskop auf den Plattenleser wurde gemeinsam mit Franziska Mohring (Bestimmung der Zellzahl und Vergleich unterschiedlicher Plattenleser) und Mahsa Rahbari (insbesondere der Vergleich CLSM vs. Plattenleser) durchgeführt, weshalb sich Teile dieser Ergebnisse in ähnlicher Form auch schon in deren Dissertationen finden, wobei ich im Besonderen an der

Etablierung am Plattenleser mit Testen unterschiedlicher Geräte und geeigneter Settings beteiligt war.

Die Messungen mit den Redox-Sonden am konfokalen Mikroskop sind in der Durchführung und besonders hinsichtlich der Bildauswertung sehr aufwändig und zeitintensiv. Außerdem sind Plattenleser günstiger, leichter zu handhaben und weiter verbreitet als konfokale Mikroskope, die so ausgestattet sind, dass dort mit transgenen *P. falciparum*-Parasiten unter S2-Bedingungen gearbeitet werden kann. Aus diesen Gründen sollte die Methode auf dem Plattenleser etabliert werden. Durch die stabile Integration der Redox-Sonden wurden die Fluoreszenzsignale deutlich stärker als nach episomaler Transfektion. Außerdem verlieren die stabil transfizierten Parasiten ihre Fluoreszenz nicht mehr nach wenigen Wochen und alle Parasiten zeigen Fluoreszenz. Diese Eigenschaften ermöglichten den Transfer der Methode auf den Plattenleser.

In einem ersten Schritt wurde nach geeigneten Zelldichten gesucht, die sich zur Messung in der Mikrotiterplatte (384-well-Platte) eignen. Dies hat den enormen Vorteil, dass viel weniger Material benötigt wird. Es zeigte sich, dass Zellzahlen von mehr als 100.000 Zellen pro  $\mu\text{l}$  geeignet waren (Abbildung 17).

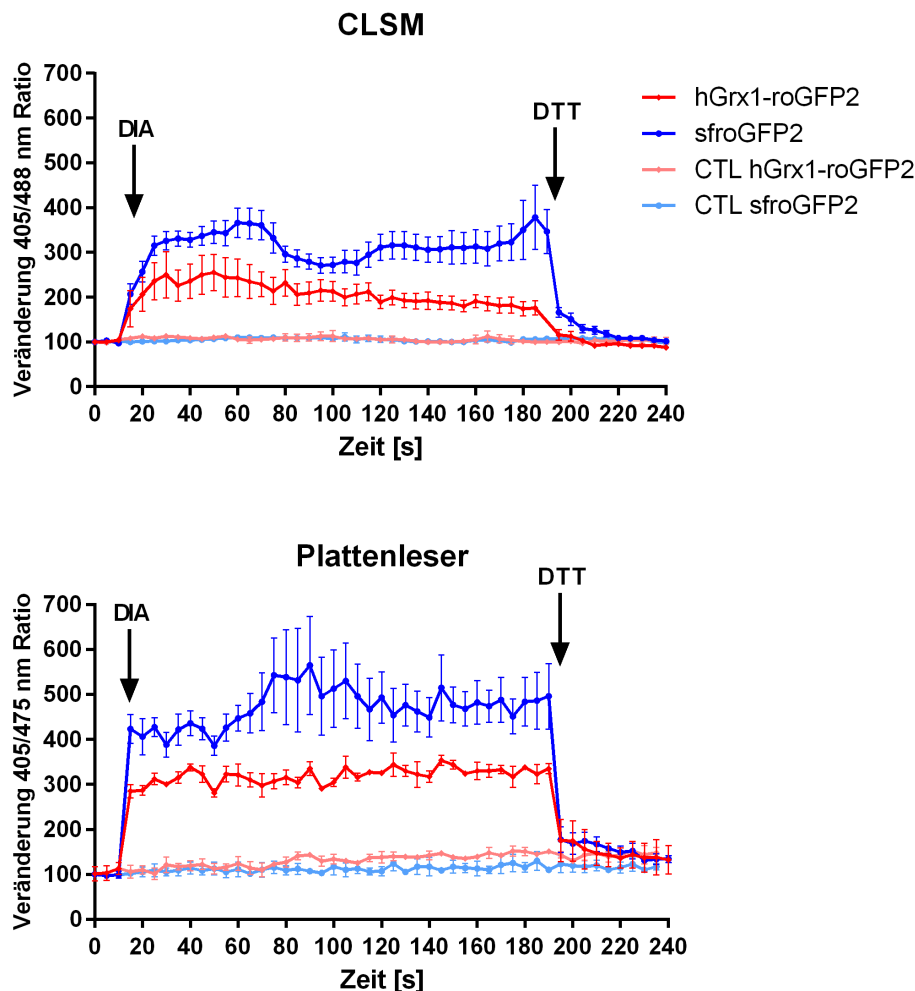
Nach der Anreicherung der NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>-Parasiten am MACS-Magneten (siehe 3.2.5) und 2-stündiger Ruhe im Inkubator wurden die Zellen mit vorgewärmter Ringerlösung gewaschen und resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Messungen ab Zellzahlen größer 50.000 Zellen pro  $\mu\text{l}$  waren möglich, jedoch wurde in den folgenden Experimenten eine höhere Zelldichte verwendet, da die Zellsuspension durch die Zugabe von DIA und DTT oder anderen Wirkstoffen wieder verdünnt wurde.



**Abbildung 17: Test der Zellzahlen bei Messungen in Mikrotiterplatten (384-well) am Plattenleser.** Das Bild rechts zeigt, wie die entsprechende Zelldichte in einer Vorverdünnungsplatte aussieht.

Im nächsten Schritt wurden die Fluoreszenzsignale von CLSM und Plattenleser-Detektion systematisch verglichen. Dazu wurden magnetisch angereicherte Trophozoiten der Linien NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfrroGFP2]</sup> mit 1 mM DIA versetzt und 3 min mit CLSM (Abbildung 18 A) oder einem Plattenlesegerät (Abbildung 18 B) überwacht. Die Reduktionskapazität nach der Oxidation mit DIA wurde durch eine Inkubation mit 10 mM DTT untersucht. Um die Vergleich-

barkeit gut darzustellen, wurde der initiale Wert auf 100 gesetzt und alle weiteren Messpunkte der Zeitverläufe darauf normalisiert.

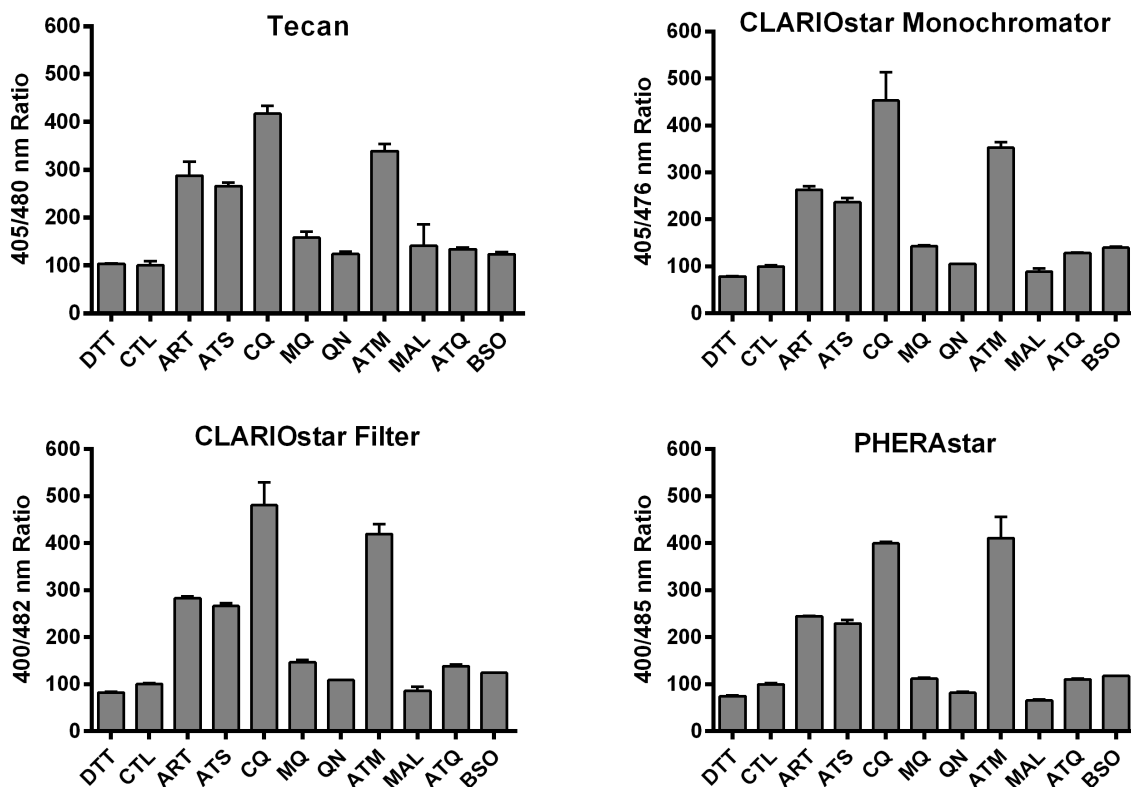


**Abbildung 18: Real-time Imaging des dynamischen Bereichs von  $NF54attB^{[hGrx1-roGFP2]}$  und  $NF54attB^{[sfroGFP2]}$  mit CLSM und Plattenleser** (Schuh *et al.*, 2018). Nach 15 s Überwachung des basalen Oxidationslevels wurde den mit hGrx1-roGFP2 oder sfroGFP2 transfizierten Parasiten 1 mM DIA zugefügt und dann 3 min lang überwacht, bevor 10 mM DTT hinzugefügt wurden. Die ratiometrischen Messungen wurden entweder mit dem CLSM (A) oder einem Plattenlesegerät (B) durchgeführt. Die Fluoreszenzverhältnisse von 405/488 nm und 405/475 nm, die mit dem CLSM bzw. dem Plattenleser gemessen wurden, wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die CLSM-Daten (Mittelwert  $\pm$  SEM) setzten sich aus den Werten von 9 Trophozoiten zusammen, die in drei unabhängigen Experimenten analysiert wurden. Die Daten des Plattenlesers zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten. Abbildung 18 B findet sich auch in der Dissertation von Mahsa Rahbari, 2018.

Die Sensoren reagierten in beiden Parasitenstämmen dynamisch auf Oxidation durch DIA und anschließende Reduktion mittels DTT. Der Anstieg ist bei Messungen am konfokalen Mikroskop etwas flacher, da hier zum Mischen nach DIA-Zugabe nicht resuspendiert werden konnte um die beobachteten Zellen nicht zu verschieben. Davon abgesehen waren die Profile der CLSM- und Plattenleser-Messungen vergleichbar. Die für die sfroGFP2-Sonde beobachtete höhere DIA-Empfindlichkeit zeigte recht hohe Standardabweichungen und wurde nicht in allen Experimenten beobachtet. Bei der CLSM kam es durch das „Schwimmen“ der Zellen immer



wieder zu Unschärfe, die dann manuell nachjustiert werden musste. Außerdem konnte man sehen, wie die Zellen durch *Photobleaching* geschädigt wurden. Die Kontroll-Parasiten ohne Behandlung zeigten ein stabiles Redox-Ratio über die 4-minütige Messzeit, das lediglich gegen Ende am Plattenleser leicht anstieg.



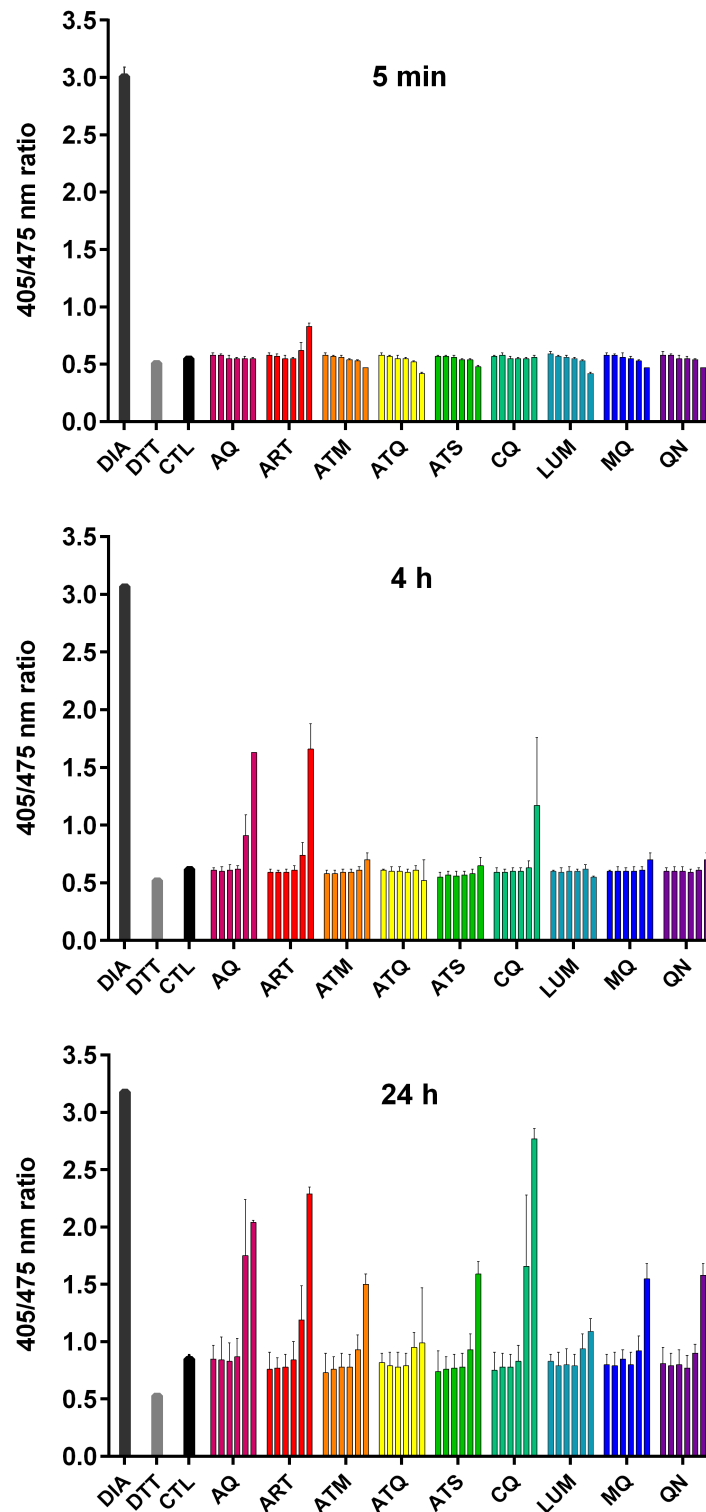
**Abbildung 19: Vergleich verschiedener Plattenleser zur Messung des Redox-Status mit genetisch kodierten Sonden in NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>.** Die Zellen wurden für 24 h mit Wirkstoffen inkubiert. Bevor der Redox-Status gemessen wurde, wurden die Thiole mit NEM blockiert. Dieselbe 384-well-Platte wurde direkt nacheinander in allen vier Geräten mit drei technischen Replikaten gemessen. Die Abbildung zum CLARIOstar mit Monochromator findet sich auch in der Dissertation von Franziska Mohring, 2015.

Zur Etablierung der Methode wurden unterschiedliche Plattenleser getestet und verglichen (Abbildung 19). Für das vergleichende Experiment wurden NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten für 24 h mit Wirkstoffen gegen Malaria inkubiert. Da zu diesem Zeitpunkt die  $EC_{50}$ -Werte noch nicht vorlagen, wurden folgende Konzentrationen verwendet: 400 nM ART, ATS, ATM, ATQ, MAL, CQ und MQ, 4  $\mu$ M QN und 80  $\mu$ M BSO. Es wurde jeweils eine kleine Schale (7,5 ml Kultur mit 3,3 % Parasitämie) mit Ringstadien für 24 h mit den Malariamedikamenten und BSO inkubiert und dann mit 2 mM NEM blockiert. Die Inkubation mit DIA und DTT erfolgte für 5 min vor der Blockierung. Nach Anreicherung der Trophozoiten wurden die Parasiten mit Ringerlösung gewaschen, resuspendiert und bei ausreichender Zelldichte in eine 384-well-Platte überführt. Dieselbe Platte wurde dann zügig nacheinander an allen Geräten getestet. Am wenigsten sensitiv zeigte sich der Tecan Infinite M200. Der CLARIOstar zeigte sowohl mit Filter als auch mit Monochromator eine gute Sensitivität, vergleichbar mit der des PHERAstars. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte jeweils auf die Kontrolle normalisiert. Der Fokus des Experiments lag hierbei nicht auf den Wirkungen der Medikamente, sondern auf der

Vergleichbarkeit der Plattenleser, die Unterschiede in der Sensitivität zeigten und sich in den absoluten Fluoreszenzwerten unterschieden.

#### **4.1.4 Interaktionen von Wirkstoffen mit rekombinantem sfroGFP2**

Bevor mittels der Redoxsensoren Effekte auf das oxidative Gleichgewicht der Zelle untersucht werden können, muss ein direkter Effekt der Wirkstoffe auf die Sonden ausgeschlossen werden. Die untersuchten Wirkstoffe gegen Malaria waren ART, ATM, ATS, die Quinoline CQ, MQ, AQ, QN sowie LUM und ATQ. Die Oxidation von rekombinantem sfroGFP2 wurde bei Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 1 mM nach 5 min, 4 h und 24 h Inkubation im Plattenleser untersucht. Keiner dieser Wirkstoffe oxidierte den Sensor bis zu einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Nur nach langen Inkubationen mit physiologisch irrelevanten Konzentrationen zeigten sich direkte oxidative Effekte. Der Anstieg des Ratios nach 24 h bei niedrigen *Drug*-Konzentrationen entspricht dem des Anstiegs der Kontrolle, der über die Zeit durch den Luftsauerstoff entsteht. Abbildung 20 zeigt die Konzentrationen und die Effekte nach 5 min, 4 h und 24 h Inkubation bei Raumtemperatur.



**Abbildung 20: Effekte von Malariamedikamenten auf rekombinantes sfroGFP2.** Das rekombinante sfroGFP2 wurde mit 20 mM DTT für 45 min bei 4 °C reduziert. Anschließend wurde das DTT über ein Entsalzungssäulchen entfernt. Die Veränderungen der Ratios wurden im Plattenleser nach 5 min, 4 h und 24 h Inkubation bei RT gemessen. Die Wirkstoffe sind in steigenden Konzentrationen dargestellt (10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM und 1 mM). Zum Vergleich wurde das rekombinante Protein mit 1 mM DIA vollständig oxidiert und mit 10 mM DTT vollständig reduziert (Schuh *et al.*, 2018).

#### 4.1.6 *In cellulo*-Vergleich von hGrx1-roGFP2 und sfroGFP2

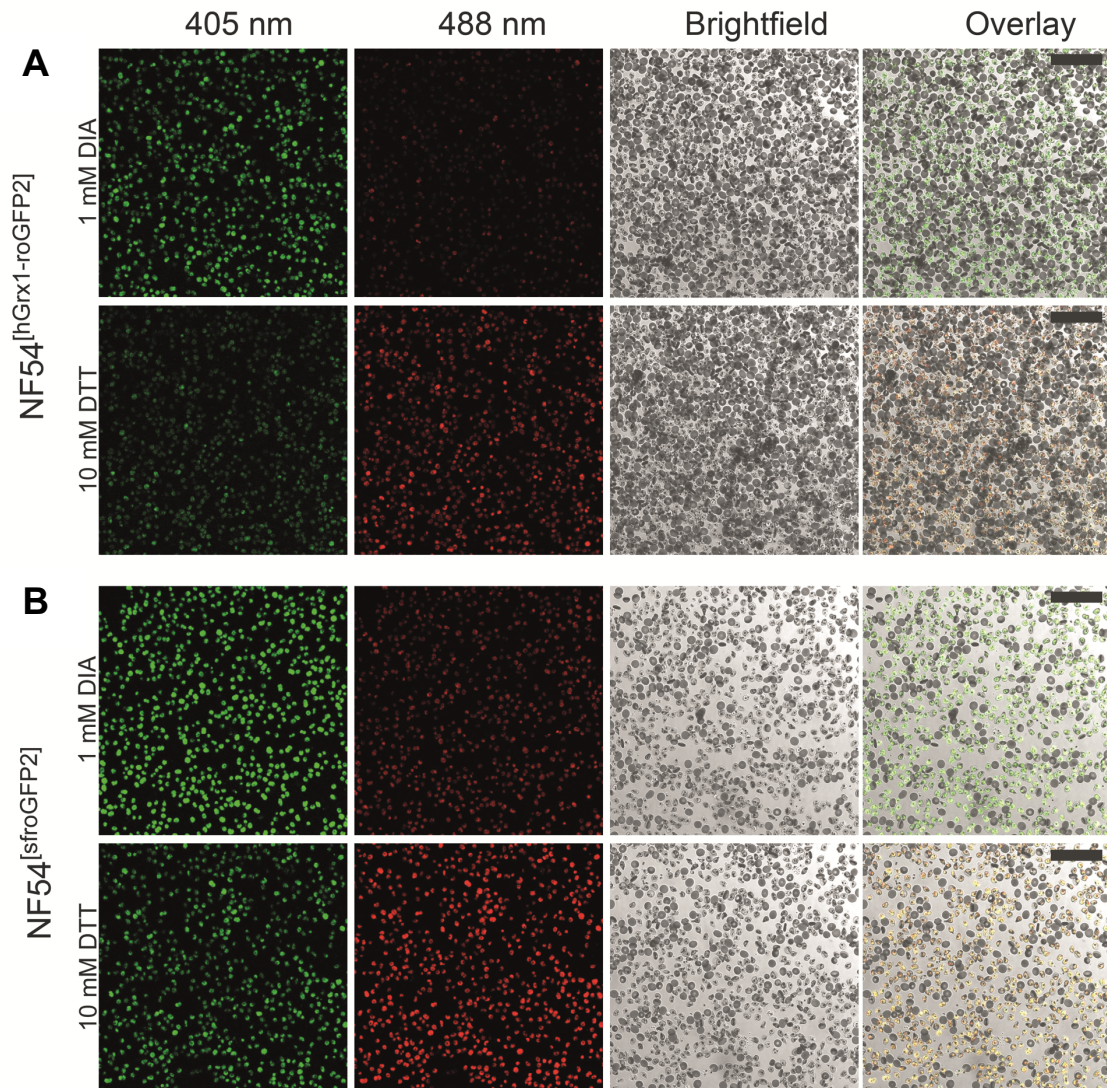
Zum direkten Vergleich von NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>- und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten wurden drei unabhängige Experimente mit den gleichen Mikroskopeinstellungen (Laser: 405 nm 10 %, 488 nm 6 %) an angereicherten Trophozoiten durchgeführt und hinsichtlich ihrer *Dynamic Range*, ihres Redoxstatus, des Glutathionredoxpotentials und ihrer Fluoreszenz untersucht. Zur Kalibrierung der Sonde wurde bei jeder Messung ein Teil der Zellen mit 1 mM DIA für vollständige Oxidation und mit 10 mM DTT für vollständige Reduktion inkubiert.

**Tabelle 14: Vergleich des  $E_{GSH}$  im Zytosol von NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>.**

	NF54 <sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>	NF54 <sup>[sfroGFP2]</sup>
<b>R<sub>basal</sub> MW</b>	0,65 ± 0,11	0,70 ± 0,12
<b>R<sub>basal</sub> Range</b>	0,38 – 0,85	0,47 – 0,95
<b>R<sub>ox</sub> MW</b>	2,19 ± 0,11	2,51 ± 0,004
<b>R<sub>ox</sub> Range</b>	1,76 – 2,79	1,95 – 3,33
<b>R<sub>red</sub> MW</b>	0,52 ± 0,01	0,55 ± 0,12
<b>R<sub>red</sub> Range</b>	0,40 – 0,62	0,34 – 0,76
<b>Dynamic range (R<sub>ox</sub>/R<sub>red</sub>)</b>	4,23	4,56
<b>I<sub>488ox</sub></b>	26,84	49,77
<b>I<sub>488red</sub></b>	81,86	113,71
<b>I<sub>488ox</sub>/I<sub>488red</sub></b>	0,33	0,44
<b>OxD</b>	20,8 %	15,9 %
<b>Glutathionredoxpotential</b>	-304 mV	-303 mV

R = Ratio (405 nm/488nm); I = Fluoreszenzintensität; OxD = Grad der Oxidation. Drei unabhängige Replikate mit je elf Parasiten wurden zur Berechnung verwendet.

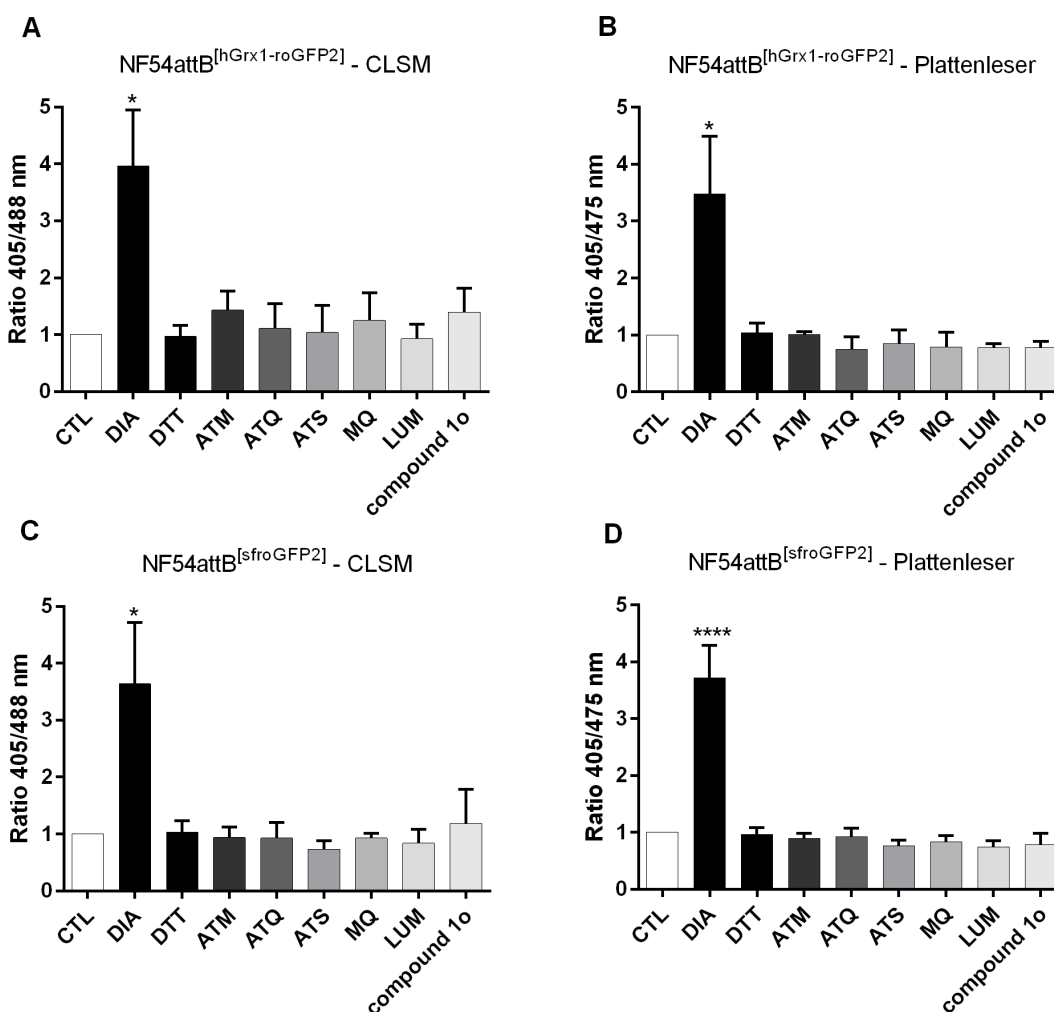
Wie in Tabelle 14 gezeigt, lagen die Ratios der einzelnen Trophozoiten basal zwischen 0,38 und 0,85 für NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und zwischen 0,47 und 0,95 für NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>. Ihre Mittelwerte waren mit 0,65 und 0,70 ähnlich. Die Parasiten, welche die sfroGFP2-Sonde exprimierten, zeigten dabei höhere Fluoreszenzintensitäten (I<sub>488ox</sub>: 49,77 und I<sub>488red</sub>: 113,71) als jene, welche hGrx1-roGFP2 exprimieren (I<sub>488ox</sub>: 26,84 und I<sub>488red</sub>: 81,86). Jedoch war der dynamische Bereich bei sfroGFP2 mit 4,56 nur leicht höher als für hGrx1-roGFP2 mit 4,23. Unbehandelte Zellen zeigen mit einem OxD von 20,8 % für hGrx1-roGFP2 etwas höhere Oxidationslevel als für sfroGFP2 mit einem OxD von 15,9 %, wohingegen das zytosolische Glutathion-Redoxpotential mit -304 mV und -303 mV vergleichbar ist. Darüber hinaus zeigten beiden stabil transfizierten Parasitenlinien eine Expression der Sensoren in allen Zellen und höhere Fluoreszenzintensitäten als transient transfizierte Zellen.



**Abbildung 21: Stabil transfizierte *P. falciparum* NF54attB-Parasiten, die hGrx1-roGFP2 (A) oder sfroGFP2 (B) exprimieren.** Die Parasiten wurden mit 1 mM DIA oxidiert oder mit 10 mM DTT reduziert. Der schwarze Balken entspricht 50 μm (Schuh *et al.*, 2018).

In Abbildung 21 sind Bilder von Parasiten, die entweder hGrx1-roGFP2 (A) oder sfroGFP2 (B) exprimieren, dargestellt. Die Bilder wurden zur Vergleichbarkeit bei identischen Mikroskop-einstellungen aufgenommen. NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten zeigen dabei eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität. Diese ist auch quantifizierbar (Tabelle 14). 100 % der stabil transfizierten Parasiten zeigten Fluoreszenz. Die Zellen, die keine Fluoreszenz im *Overlay* zeigten, sind nicht infizierte Erythrozyten.

#### 4.1.7 Effekte von Wirkstoffen auf NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>

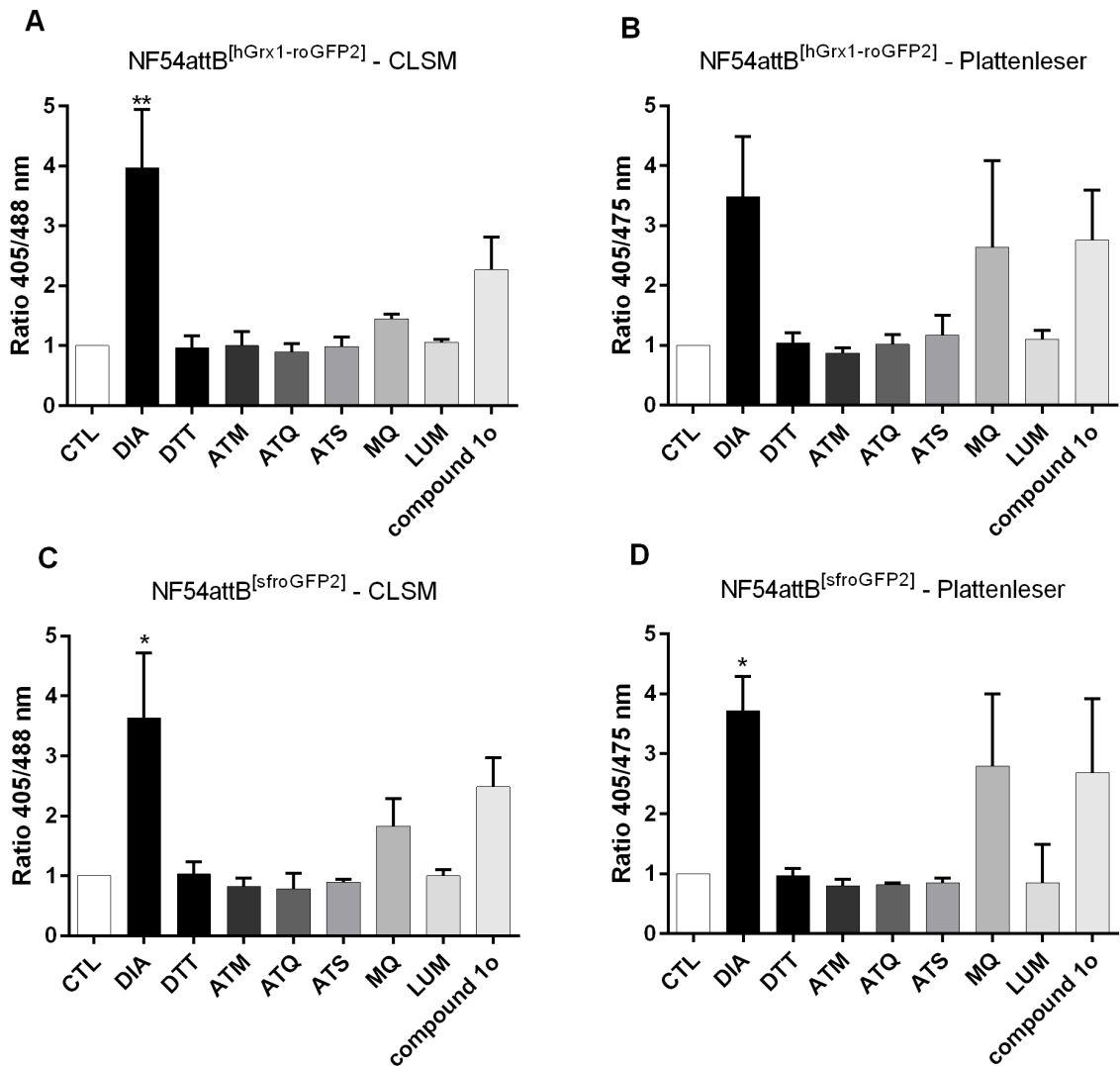


**Abbildung 22: Änderungen des Redox-Ratios durch Malariamedikamente und redoxaktive Verbindungen in *P. falciparum* NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>- und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten nach 4-stündiger Inkubation.** Durch 4 h Inkubation mit 100-facher EC<sub>50</sub>-Medikamentenkonzentration zeigte sich bei den transgenen Parasiten NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup> weder mit dem CLSM (A, C) noch mit dem Plattenleser (B, D) ein Einfluss auf das Fluoreszenzverhältnis der Redox-Sensoren. Die Kontrolle mit 1 mM DIA führte zu einem signifikanten Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses bei beiden Sonden und Detektionsmethoden. Für die konfokale Mikroskopie wurden 10-20 Trophozoiten pro Experiment analysiert. Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes ( $\pm$  SEM) werden für drei unabhängige Experimente gezeigt. Für die statistische Analyse der Signifikanz (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ) wurde ein One-Way ANOVA-Test mit 95 % Konfidenzintervallen mit dem Dunnett's Multiple Comparison Test angewandt (Schuh *et al.*, 2018).

Ein Anwendungsgebiet der Redox-Sonden ist die Testung oxidativer Effekte von klinisch eingesetzten Malariamedikamenten und Redox-Wirkstoffen. Um oxidative Effekte auf die Redox-Sonden hGrx1-roGFP2 und sfroGFP2 in *P. falciparum* zu untersuchen, wurden Versuche mit 4 h und 24 h Inkubationszeit mit den stabil transfizierten NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>- und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten am konfokalen Mikroskop und am Plattenleser durchgeführt. Als Kontrollen für vollständige Reduktion und Oxidation wurden magnetisch angereicherte Trophozoiten für 2 min mit 1 mM DIA bzw. 10 mM DTT inkubiert und anschließend mit 2 mM NEM blockiert. Eine 1 mM DIA-Behandlung führte zu einer signifikanten Erhöhung des

Fluoreszenzverhältnisses sowohl der NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> (Abbildung 22A, B) als auch der NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten (Abbildung 22 C, D), sowohl bei Messungen mittels CLSM als auch im Plattenleser. Für die 4 h-Inkubation wurden 26-30 h alte Trophozoiten mit 100x EC<sub>50</sub> von ATM, ATQ, ATS, MQ, LUM oder Compound 1o inkubiert und anschließend mit 2 mM NEM blockiert. Compound 1o ist ein kürzlich beschriebenes antiplasmodiales Arylmethylamino-Steroid, das zumindest teilweise auf der Basis eines Redox-Mechanismus, wie in Krieg *et al.* (2017) beschrieben, wirken könnte. Die EC<sub>50</sub>-Werte wurden im erwarteten nanomolaren Bereich bestätigt und sind publiziert (Schuh *et al.*, 2018). Keines der getesteten Medikamente zeigte nach 4 h Inkubation eine signifikante Wirkung auf die Redox-Ratios im CLSM bzw. Plattenleser.

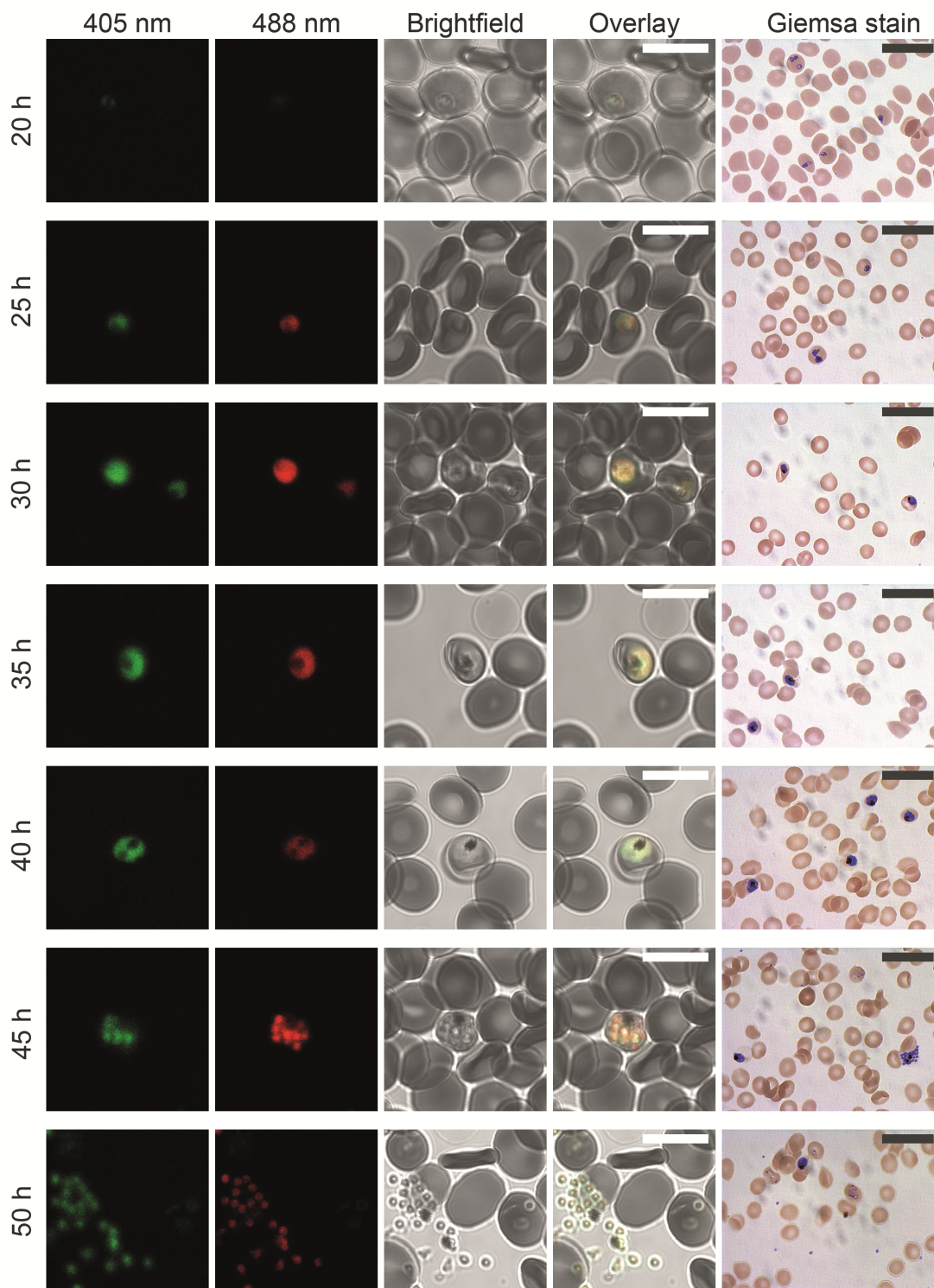
Für die Langzeit-Expositionsexperimente wurden Parasiten im Ringstadium mit 10-facher EC<sub>50</sub> Wirkstoffkonzentration für 24 h inkubiert (Abbildung 23). Vor der Anreicherung mit dem Magneten wurden die Cysteine mit 2 mM NEM blockiert. MQ und Compound 1o zeigten oxidative Effekte bei beiden Sonden, die am Plattenleser stärker ausgeprägt waren, jedoch auch eine höhere Varianz zeigten. NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> zeigte für MQ eine 1,5-fache Erhöhung des Fluoreszenzverhältnisses mit dem CLSM und eine 2,6-fache Erhöhung am Plattenlesegerät (Abbildung 23 A, B). Interessanterweise wurde NF54<sup>[sfroGFP2]</sup> stärker oxidiert als NF54<sup>[hGrx-roGFP2]</sup> mit einem 1,8-fachen (CLSM) und 2,8-fachen Anstieg (Plattenleser) des Ratios (Abbildung 23 C, D). Trotz der sichtbaren Erhöhung des Redox-Ratios zeigten die Daten keine statistische Signifikanz (NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>: MQ p = 0,62, Compound 1o p = 0,56; NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>: MQ p = 0,29, Compound 1o p = 0,35). ATM, ATQ, ATS und LUM zeigten keinen Einfluss auf die Erhöhung des Fluoreszenzverhältnisses für beide Linien nach 24 h Inkubation und Detektion mittels CLSM und Plattenleser (Abbildung 23 A-D). Die Kontrollbehandlung mit DIA (1 mM) führte zur Erhöhung des Fluoreszenz-Ratios bei beiden Linien und Detektionsmethoden.



**Abbildung 23: Änderungen des Redox-Ratios durch Malaria-medikamente und redoxaktive Verbindungen von *P. falciparum* NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten nach 24-stündiger Inkubation.** Nach 24-stündiger Inkubation mit 10-facher EC<sub>50</sub>-Konzentration der Wirkstoffe zeigten sich erhöhte Fluoreszenzratios der Redox-Sensoren für MQ und Compound 1o nach Detektion mittels CLSM (A, C) und Plattenleser (B, D). DIA führte zu einem Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses bei beiden Sonden und Detektionsmethoden. Bei der CLSM wurden Daten von 10-20 Trophozoiten pro Experiment analysiert. Es sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes ( $\pm$  SEM) drei unabhängiger Experimente gezeigt. Für die statistische Analyse der Signifikanz wurde ein One-Way ANOVA-Test mit 95 % Konfidenzintervallen mit dem Dunnett's Multiple Comparison Test angewendet (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,005$ ) (Schuh *et al.*, 2018).



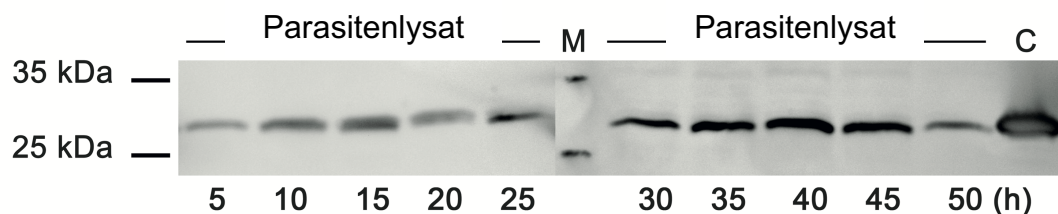
#### 4.1.8 Expression von sfroGFP2 über den Lebenszyklus



**Abbildung 24: SfroGFP2 Fluoreszenzsignale im Verlauf des asexuellen Lebenszyklus von *P. falciparum* NF54attB-Parasiten** (Schuh *et al.*, 2018). 405 nm, 488 nm und Durchlichtbilder wurden am konfokalen Mikroskop aufgenommen. Die weiße Skalierung entspricht 10  $\mu$ m. Die Bilder der Giemsa-gefärbten Blutausstriche wurden mit einem Zeiss Axiophot mit einem 100/1.3 Öl Plan-NEOFLUAR Objektiv aufgenommen. Der schwarze Balken entspricht 20  $\mu$ m.

Mittels Percoll- und Sorbitolsynchronisation wurden die Parasiten auf ein Zeitfenster von 3-4 h eingeeengt, um ihre Fluoreszenz und die Expression von sfroGFP2 über den asexuellen

Lebenszyklus zu verfolgen und zu sehen, zu welchem Zeitpunkt Messungen möglich sind (Abbildung 24). Etwa 20 h nach Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten entwickeln sich die Ringe zu Trophozoiten und das Fluoreszenzsignal wurde ausreichend sichtbar um Messungen möglich zu machen. Basierend auf den *Time Course*-Experimenten war eine Messung mit Trophozoiten-Stadien zwischen 25 h und 35 h nach Invasion am besten möglich. 40 h nach Invasion befanden sich die meisten Parasiten noch im späten Trophozoiten-Stadium, es zeigten sich aber auch schon erste Schizonten. Fünf Stunden später waren die ersten Schizonten schon rupturiert und die Merozoiten hatten neue Erythrozyten reinvadiert und kleine Ringe wurden sichtbar. Nach 50 h konnte man beobachten, dass die Ringe größer wurden. Es waren jedoch auch noch Schizonten und Merozoiten sichtbar. Innerhalb dieses Experiments konnten wir zum ersten Mal Fluoreszenz-Signale in Merozoiten sehen. Quantitative Messungen waren allerdings nicht möglich, weil die Signalstärke sehr schwach war und schon eine leichte Veränderung der Z-Ebene am Mikroskop die Ergebnisse veränderte. Ebenso war die Fluoreszenz in den Ringstadien zu schwach für zuverlässige Messungen am Mikroskop.

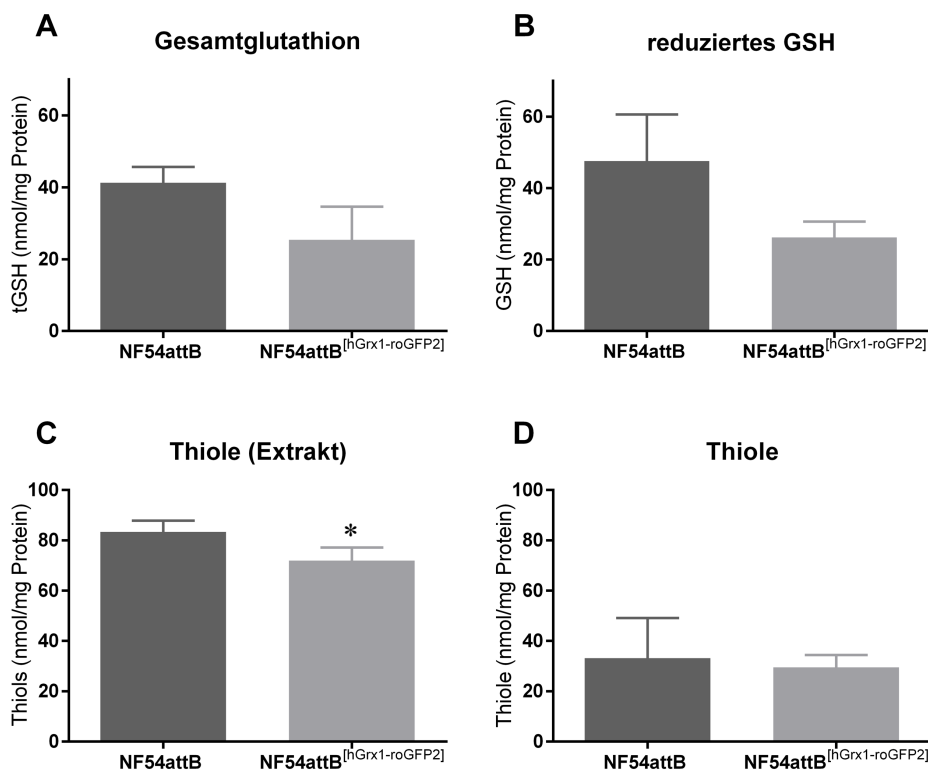


**Abbildung 25: Western Blot der sroGFP2 Expression 5 bis 50 h nach Invasion bei NF54<sup>[sroGFP2]</sup>-Parasiten.** Für jede Probe wurden 15 µl infizierte Erythrozyten (Startparasitämie 2,5 %) entnommen und mittels Saponinlyse isoliert. Die Proben wurden alle 5 h nach Invasion bis 50 h entnommen. Alle Proben wurden gleichzeitig parallel weiterverarbeitet und geblottet. Die 26 kDa Bande von sroGFP2 ist bei allen Zeitpunkten klar sichtbar. Späte Trophozoit-Stadien (35-45 h) zeigten starke Signale, wohingegen das Signal nach 50 h (wenn hauptsächlich Ringe und Merozoiten sichtbar sind) schwächer war. Als Kontrolle (C) diente rekombinantes sroGFP2, der Marker ist mit M gekennzeichnet (Schuh *et al.*, 2018).

Parallel zu den Messungen am Mikroskop wurden alle 5 h Proben für Western Blot entnommen um die Expressionslevel der Sonde über den Zyklus zu verfolgen (Abbildung 25). Wie beschrieben, zeigten die Ringstadien unter dem Mikroskop nur eine kaum sichtbare Fluoreszenz, wohingegen im Western Blot bereit 5 h nach Invasion Signale sichtbar waren. Die Bandenstärke nahm bis 45 h nach Invasion sichtbar zu und fiel dann am Ende des Zyklus, als vorwiegend wieder Ringe und Merozoiten vorlagen, wieder ab.

#### 4.1.9 Stabile Integration

Um den Einfluss der Sonde auf die Glutathion- und Thiolmenge in den Zellen zu prüfen, wurden Gesamtglutathion, reduziertes Glutathion, Thiole im frischen Zellextrakt und nach SSA-Fällung in NF54*attB*-Parasiten ohne Transfektion und mit stabil integrierter Sonde (NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>) gemessen und verglichen. Die beiden Zelllinien wurden unabhängig voneinander kultiviert und behandelt, geerntet und dann bei -80 °C bis zu den Messungen gelagert. Die Daten enthalten drei biologische Replikate. Für die biochemischen Assays wurden alle Proben gleichzeitig aufgetaut und prozessiert um systematische Fehler auszuschließen und eine optimale Vergleichbarkeit zu erlangen.

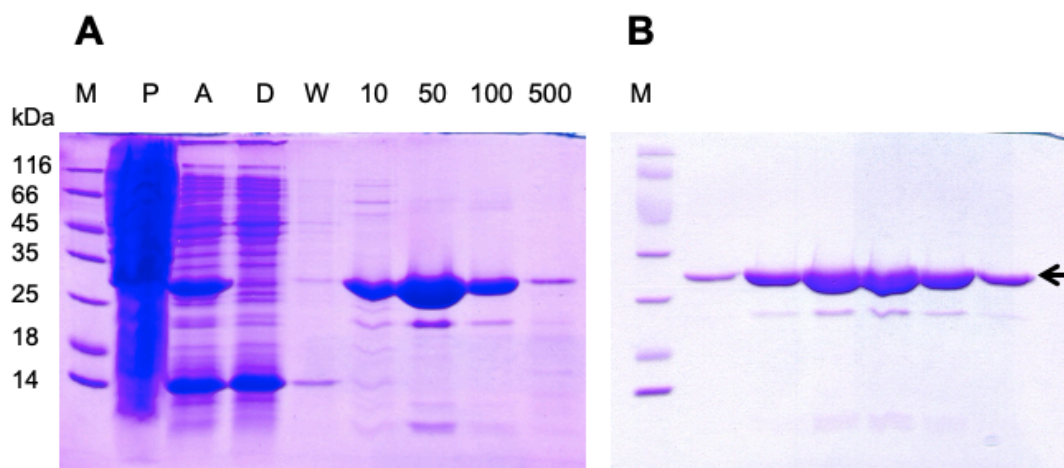


**Abbildung 26: Glutathion und Thiole in transfizierten und nicht-transfizierten NF54attB-Parasiten.** Es wurden je drei biologische Replikate vom nicht-transfizierten und transfizierten NF54attB-Stamm zur Bestimmung von tGSH, GSH und Thiolen in Extrakt und Zellsäts verwendet

Abbildung 26 A und B zeigen, dass das Glutathion reduziert vorlag, wobei die Menge bei den transfizierten Zellen niedriger war. Bei den Thiolen war dieser Unterschied weniger ausgeprägt (Abbildung 26 C und D). Statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test (95 % Konfidenzintervall) getestet. Für tGSH, GSH und die Thiole nach SSA-Fällung waren die Unterschiede zwischen den transfizierten und nicht-transfizierten Zellen nicht signifikant (tGSH:  $p=0,06$ ; GSH:  $p=0,05$ ; Thiole:  $p=0,72$ ). Die Unterschiede zwischen der Thiolmenge im Extrakt zeigte statistische Signifikanz ( $p=0,05$ ).

#### 4.1.10 Kristallisation von sfroGFP2

Um genaueren Einblick in die Veränderungen des Redox-Sensors durch das Einfügen der Mutationen in sfroGFP2 zu bekommen, sollte das Protein kristallisiert werden. Dazu wurde rekombinantes sfroGFP2 durch heterologe Überexpression in M15-*E. coli*-Zellen frisch hergestellt und über Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 27). Die beiden Elutionsfraktionen bei 50 mM und 100 mM Imidazol wurden vereint und anschließend über die Größenausschlusschromatographie noch weiter gereinigt (Abbildung 27). Im Anschluss wurde die Konzentration über Vivaspin-Säulen (10 kDa) auf etwa 30 mg/ml angereichert.

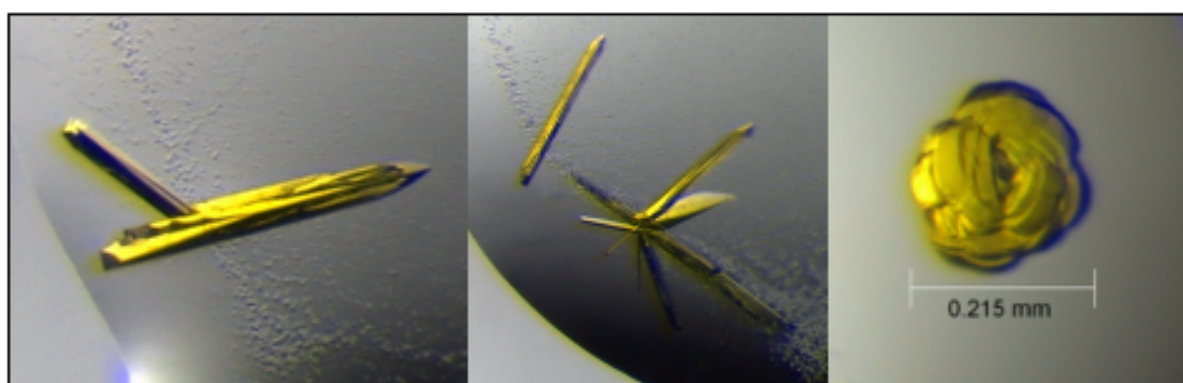


**Abbildung 27: Reinigung von sfroGFP2 für die Kristallisation.** SfroGFP2 wurde über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA gereinigt. Die saubersten und ergiebigsten Fraktionen (50 und 100 mM) wurden gepoolt (A) und über Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt und zur Kontrolle noch einmal auf ein SDS-Gel aufgetragen (B). Alle abgebildeten Fraktionen wurden gepoolt und über Vivaspin-Säulchen konzentriert. M=Marker; P=Pellet; A=Auftrag; D=Durchlauf; W=Waschschrift.

Mit technischer Unterstützung wurden dann verschiedene vorgefertigte Screens am Pipettierroboter Honey Bee 961 durchgeführt. Im *sitting drop*-Verfahren konnten auf diese Weise Kristalle gezüchtet werden. Durch die Färbung des fluoreszierenden Proteins waren diese gut sichtbar und konnten einfach von Salzkristallen unterschieden werden (Abbildung 28).

Die Kristalle beugten bis zu einer Auflösung von 1,1 Å und entsprachen der orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  mit einem Monomer in der asymmetrischen Einheit. Die Lösung der Struktur erfolgte durch molekularen Ersatz. Durch Homologiemodellierung, bei der die Struktur von avGFP als Vorlage diente (95 % Übereinstimmung), wurde ein endgültiger  $R_{\text{free}}$ -Wert von 15,6 % erreicht.

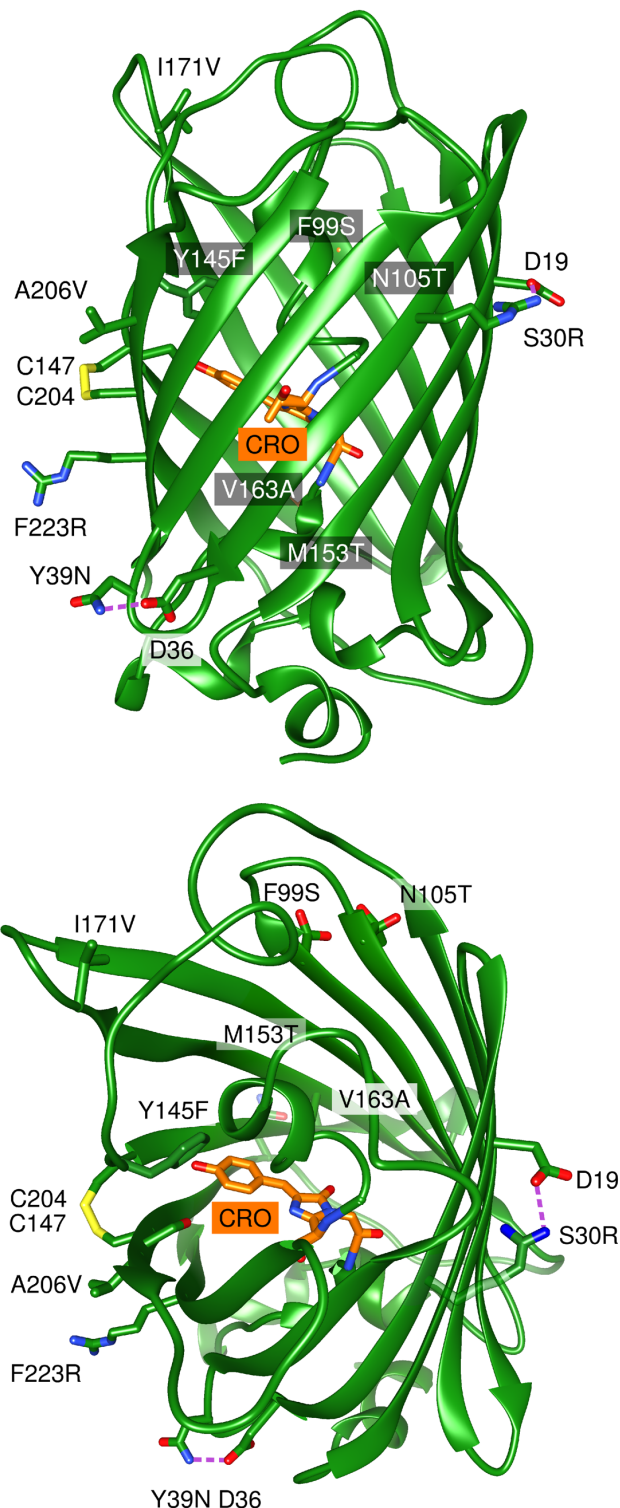
Das sfroGFP-Monomer (238 AS) nimmt die kanonische GFP-Faltung an, die aus einem elfsträngigen  $\beta$ -Barrel mit einer inneren  $\alpha$ -Helix besteht und das kovalent gebundene Chromophor, ein 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin-5-on, enthält.



**Abbildung 28: Kristalle von sfroGFP2.** Native Kristalle von sfroGFP2, generiert im *sitting drop*-Verfahren.

Die beiden Cysteine (C147, C204), die zur Messung des Oxidationsstatus der Zelle verwendet werden, bildeten in allen Strukturen eine Disulfidbrücke. Da die Kristalle unter weißem Licht

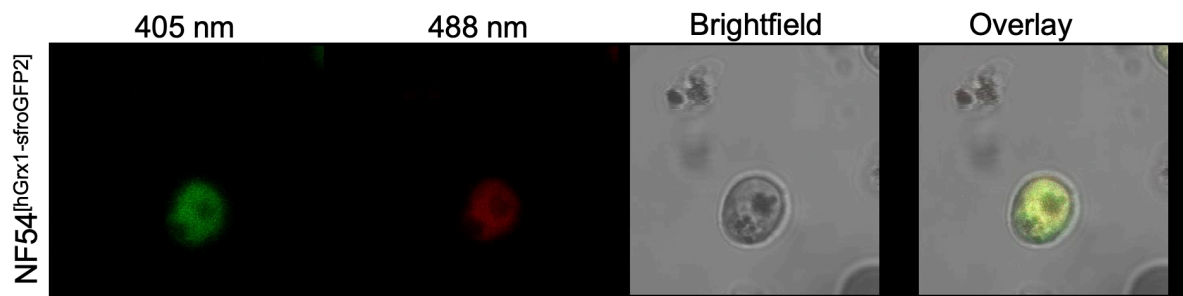
gezüchtet wurden war der Rest an E222 decarboxyliert. Abbildung 29 zeigt die Kristallstruktur von sfroGFP2 von vorne (Abbildung 29 oben) und von oben (Abbildung 29 unten). Das Chromophor (in Orange dargestellt) liegt zentral in der Mitte des elfsträngigen  $\beta$ -Barrels.



**Abbildung 29: Kristallstruktur von sfroGFP2.** Das Chromophor des Proteins ist in der Abbildung in Orange dargestellt und mit CRO markiert. Zusätzlich wurden die Cysteine C147 und C204, die der Sonde ihre Redoxsensitivität verleihen, in Gelb markiert. Die weiteren im Vergleich zum roGFP2 veränderten Aminosäuren sind ebenfalls gekennzeichnet.

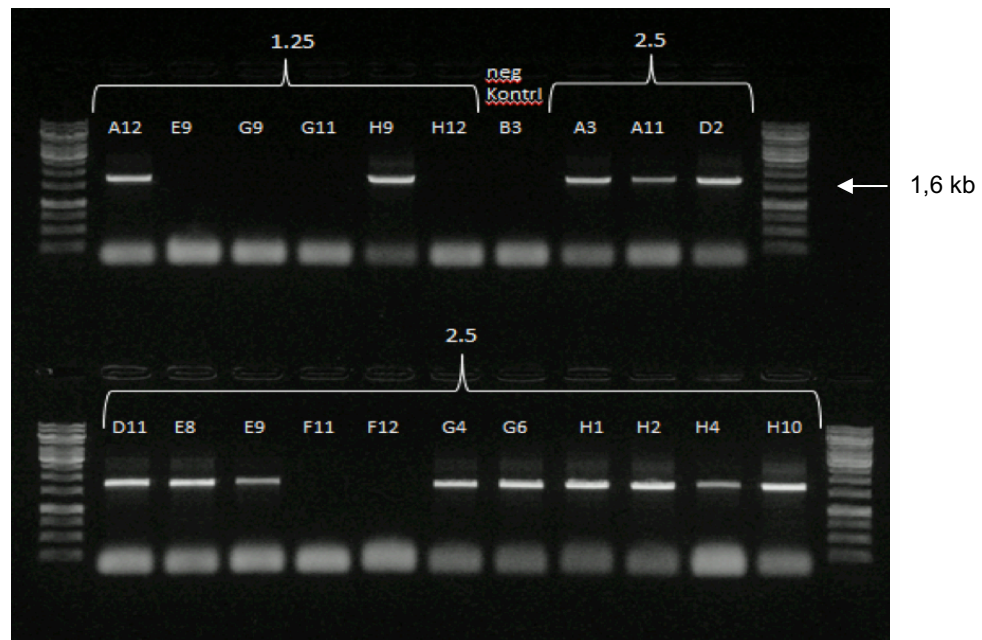
#### 4.1.11 hGrx1-sfroGFP2

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, wird die Äquilibrierung der Sonden mit GSH und GSSG stark durch die An- und Abwesenheit von Grx bestimmt. Wenn Grx über einen Linker direkt mit der Sonde gekoppelt war, war die Äquilibrierung noch besser. Deshalb sollte zur weiteren Optimierung der Messungen des intrazellulären Glutathionredoxpotentials die neu beschriebene Sonde sfroGFP2 mit hGrx1 fusioniert werden. Dazu wurde das gewünschte Konstrukt entwickelt und in einen pET28-Vektor integriert (General Biosystems). Für die Herstellung des rekombinanten Proteins wurden der pET28-Vektor und *E. coli* BL21 Zellen genutzt. Für die Transfektion von NF54*attB*-Parasiten wurde die Sonde in den pDC2-Vektor kloniert und über das *attB/attP*-System stabil in die Parasiten integriert. Nach erfolgreicher Transfektion und Überprüfung der Fluoreszenz der Parasiten, der sogenannten *bulk culture*, am konfokalen Mikroskop (Abbildung 30), wurden Klonierungsplatten, wie in 3.2.10 beschrieben, angesetzt.



**Abbildung 30: Überprüfung der Fluoreszenz von NF54<sup>[hGrx1-sfroGFP2]</sup>.** Mittels CLSM wurde das Fluoreszenzsignal für beide Anregungswellenlängen (405 und 488 nm) überprüft und die Emissionen bei 500-550 nm detektiert.

Nach drei Wochen wurde die Fluoreszenz mittels SYBR-Green-Assay am Plattenleser überprüft, wobei sehr stark fluoreszierende *Wells* ausgeschlossen wurden, da dort anzunehmen ist, dass bei der Aussaat mehr als ein Parasit enthalten war und somit keine monoklonalen Parasitenlinien vorliegen. Aus einigen der positiven *Wells* wurde dann eine kleine Menge Kultur entnommen und eine Blut-PCR zur Verifizierung der stabilen Integration durchgeführt. Hierfür wurde ein *Forward Primer* für den nicht essentiellen *cg6-5'* Locus und ein *Reverse Primer* für den BSD-Locus der NF54*attB*-Parasiten genutzt (Tabelle 8). Bei Parasiten, bei denen die stabile Integration erfolgreich war, wurde ein 1,6 kb großes PCR-Produkt generiert (Abbildung 31). Einige dieser verifizierten Parasiten wurden dann in Kultur genommen und anschließend Stabilate eingefroren.

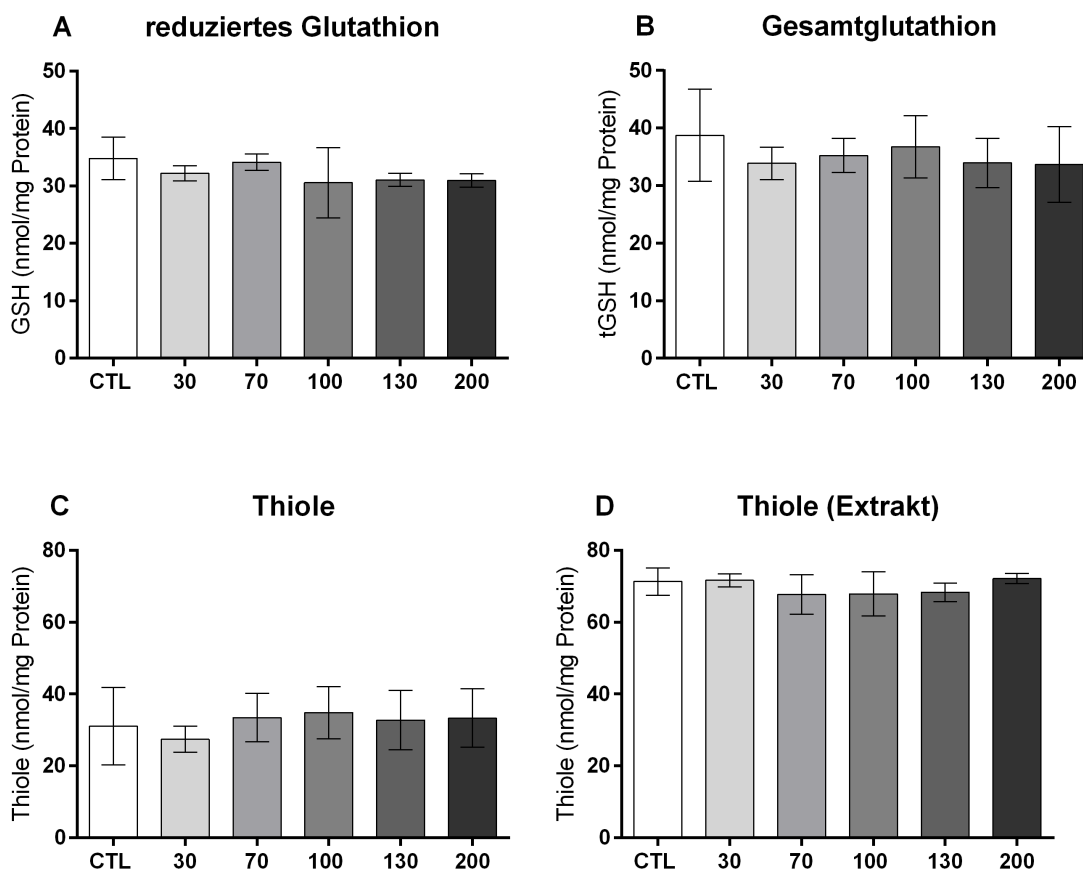


**Abbildung 31: Verifizierung der stabilen Integration von hGrx1-sfroGFP2 in NF54attB-Parasiten über PCR.** Die Blut-PCR wurde mit einem Kapa Blood PCR-Kit durchgeführt. Bei erfolgreicher stabiler Integration erscheint ein 1,6 kb großes PCR-Produkt im Agarosegel.

## 4.2 SILAC

### 4.2.1 Etablierung der Bedingungen für oxidativen Stress

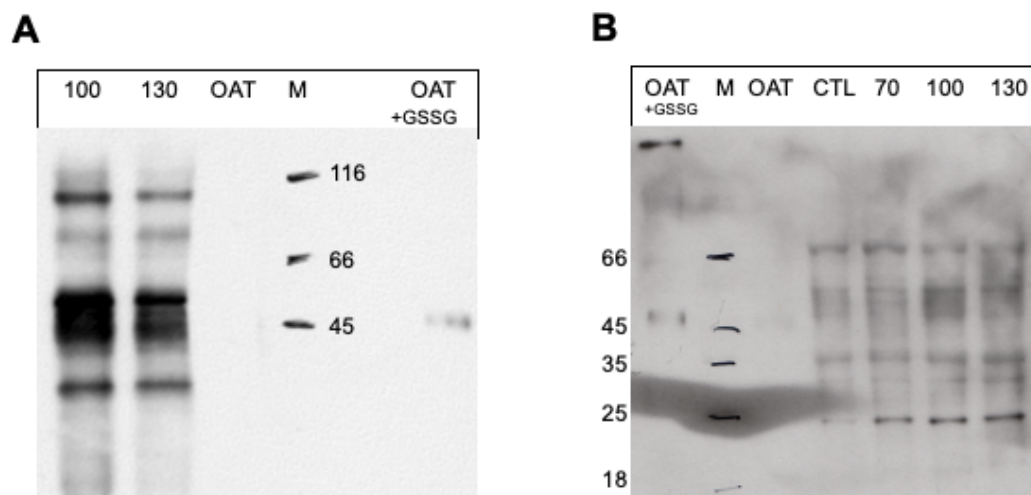
Ziel des SILAC-Experiments war zu untersuchen, ob oxidativer Stress zu einer Veränderung des Glutathionierungsmusters im Proteom des Malariaerregers führt. In einem parallelen Projekt sollte die Veränderung der Sulfenylierung von Proteinen untersucht werden. Dazu sollten geeignete Stressbedingungen gefunden werden.



**Abbildung 32: Test der Glukose-Oxidase-Stressbedingungen.** Konzentrationen von 30-200 mU/ml Vollkultur mit einer Stunde Inkubationszeit wurden als Stressbedingungen getestet.

Um in Zellkultur einen länger anhaltenden subletalen Stresslevel zu induzieren, wurde das Glukose-Glukoseoxidase-System gewählt. Es wurden Glukose-Oxidase-Konzentrationen von 30-200 mU/ml Vollkultur mit einer Stunde Inkubationszeit getestet. Abbildung 32 zeigt die Effekte der einstündigen Inkubation mit Glukose-Oxidase von 30, 70, 100, 130 und 200 mU/ml Vollkultur auf reduziertem Glutathion und Gesamtglutathion, die Thiole im Zelllysat und im Zellextrakt nach Fällung mit SSA. Keine der Konzentrationen führte hier zu einer deutlichen Veränderung. Die Menge an Thiolen im Extrakt und nach SSA-Fällung und an (reduziertem) Glutathion ist ähnlich der gemessenen Werte im NF54*attB* (Abbildung 26). Auch hier liegt das Glutathion deutlich reduziert vor.





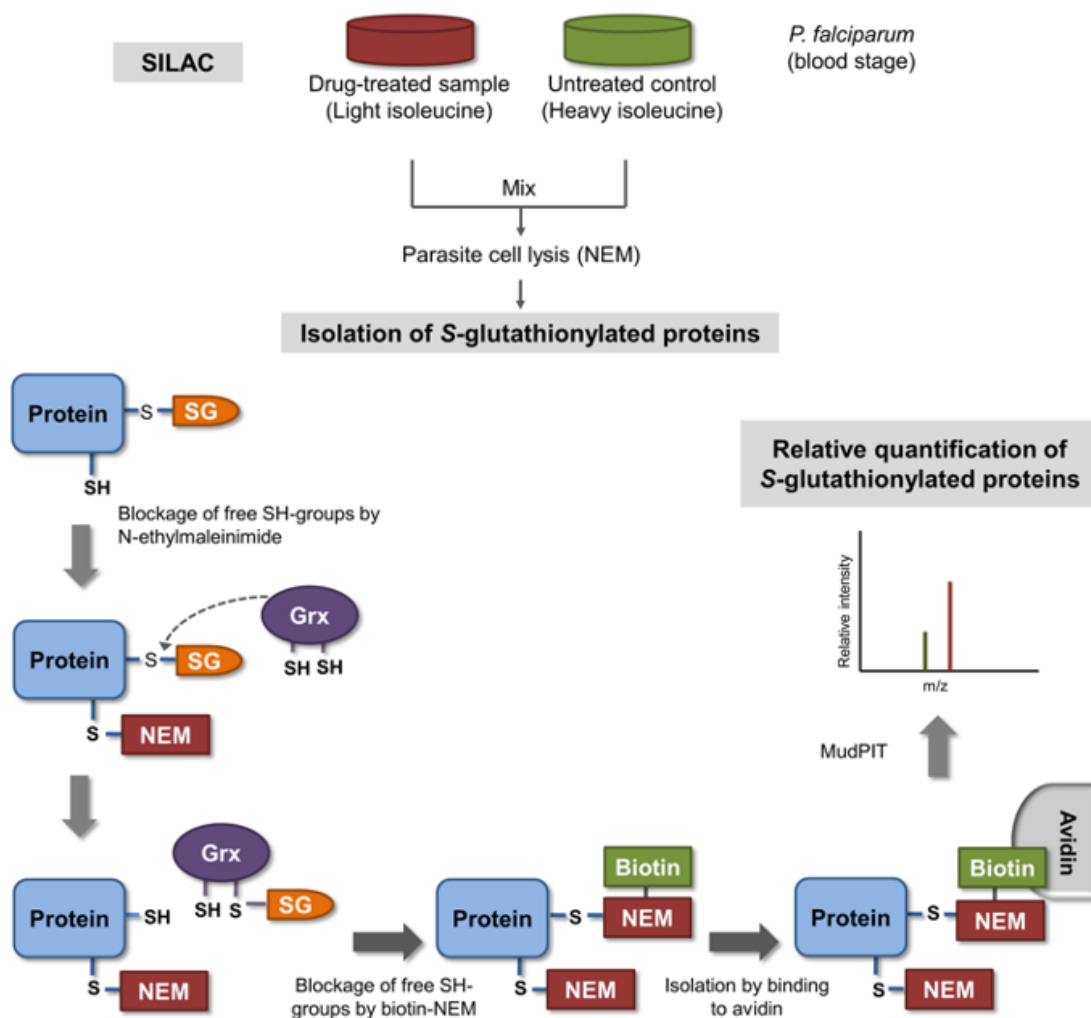
**Abbildung 33:  $\alpha$ -GSH Western Blot mit Nachweis der glutathionylierten Proteine im Parasiten-Zelllysate zur Testung einer geeigneten Glukose-Oxidase-Konzentration zur Induktion von oxidativem Stress.** 3D7-Parasiten wurden mit Konzentrationen von 70-130 mU/ml GOD für eine Stunde inkubiert und geerntet. Als Negativ-Kontrolle diente rekombinante OAT (46 kDa), die in glutathionylierter Form als Positiv-Kontrolle diente.

Um Effekte der Behandlung auf die Glutathionylierung zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von 70-130 mU/ml im  $\alpha$ -GSH Western Blot getestet (Abbildung 33). Dazu wurden 3D7-Parasiten im Trophozoit-Stadium mit den jeweiligen Konzentrationen an Glukose-Oxidase als Vollkultur (5% Hämatokrit) für eine Stunde inkubiert und dann geerntet. Als Kontrolle diente rekombinante Ornithin-Aminotransferase (OAT) die mit 4 mM GSSG bei 37 °C für 10 min glutathionyliert wurde. Nach mehreren Optimierungen gelang ein Blot, bei dem zu sehen ist, dass durch steigende Konzentrationen an GOD die Signalstärke zunimmt (Abbildung 33 B), und damit mehr glutathionylierte Proteine vorhanden sein sollten. Die glutathionylierte OAT, die als Kontrolle diente, zeigt eine leichte Bande bei 46 kDa. Mikroskopisch wurde die intakte Morphologie überwacht. Es sollte eine Konzentration gewählt werden, die einen Effekt auf das Glutathionylierungsmuster bewirkt, jedoch auch nicht mehr „Stress“ als nötig auslöst. Aufgrund dieser Vortests wurde für das SILAC-Experiment daher eine Konzentration von 100 mU/ml GOD verwendet, da hier eine sichtbare Veränderung der Glutathionylierung beobachtet werden konnte, die sich bei 130 mU/ml GOD nicht mehr sichtbar erhöhte. Parallel zur Glutathionylierung wurde der konzentrationsabhängige Effekt auf die Sulfenylierung gemessen (Dissertation Susanne Schipper). Zusätzliche Vortests für die Sulfenylierung ergaben, dass auch dafür eine Konzentration von 100 mU/ml GOD ausreichend war und zur Vergleichbarkeit der Experimente sollte, wenn möglich, die gleiche Stressbedingung gewählt werden.

#### 4.2.2 *Pulldown* der glutathionylierten Proteine

In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe wurden die Protein-S-Glutathionylierung in *P. falciparum* bereits untersucht und es konnten 321 Proteine mit bekannter Funktion und 172 S-glutathionylierte, hypothetische Proteine identifiziert werden (Kehr *et al.*, 2011). Die Untersuchung der Protein-S-Glutathionylierung ist interessant, da sie als „Thiol-Schalter“ die Funktion von Proteinen (reversibel) regulieren kann (Dalle-Donne *et al.*, 2007; Shelton *et al.*, 2005). Die Ergebnisse von Kehr *et al.* (2011) zeigen das Glutathionylierungsmuster unter

physiologischen, ungestressten Bedingungen. Ziel des hier beschriebenen SILAC-Experiments war es nun zu prüfen, ob/welchen Einfluss oxidativer Stress auf das Glutathionierungsprofil hat und zusätzlich die genauen Modifizierungsstellen an den Proteinen zu identifizieren. Basierend auf dem Grundprotokoll für den *Pulldown* glutathionierter Proteine aus Malariaparasiten wurden für dieses SILAC-Experiment Anpassungen vorgenommen (3.5.3). In der Arbeit von Kehr *et al.* wurde für das Hauptexperiment *PfGrx1* verwendet. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Experiment mit der *PfGrx1*<sup>C32S</sup>-Mutante durchgeführt, die im Gegensatz zum Wildtyp nur die Deglutathionierung katalysieren kann und deshalb hier eingesetzt wurde.

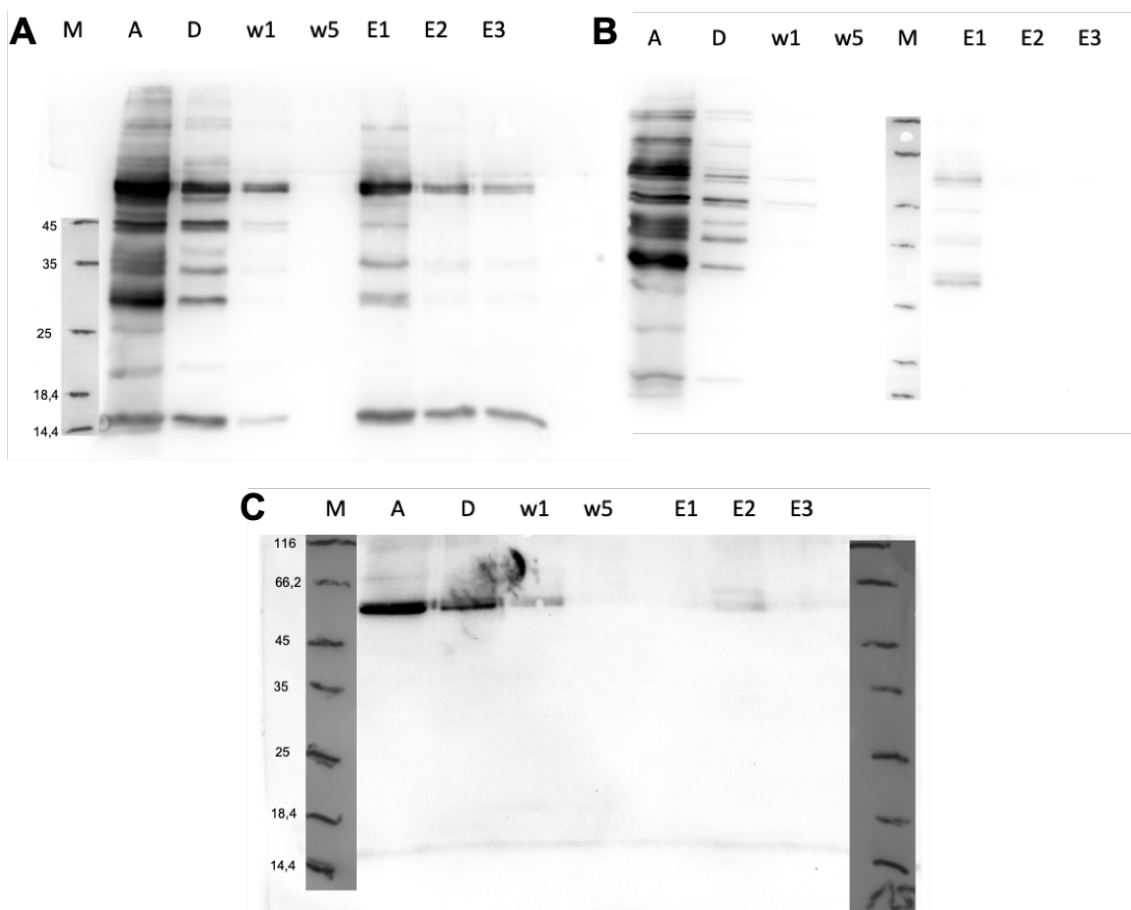


**Abbildung 34: Workflow der SILAC-Probenaufbereitung.** Nach Herstellung des Parasitenlysates wurden die *heavy* und *light* gelabelten Proben im Verhältnis 1:1 gemischt und die freien Cysteine mit NEM blockiert, bevor das Glutathion entfernt und die freien Glutathionierungsstellen mit Biotinmaleimid blockiert wurden. Nach Aufreinigung der glutathionierten Proteine über Avidin-Beads wurden diese mittels MS analysiert (AG Becker modifiziert nach Kehr *et al.*, 2011).

Zur Untersuchung der differentiellen Regulierung wurde immer eine mit leichtem Isoleucin-markierte (*light*) Kontrolle und eine mit schwerem Isoleucin-markierte (*heavy*) Probe oder eine *heavy* Kontrolle mit einer *light* Probe bei gleicher Proteinmenge nach Herstellung des Zelllysates gemischt. Durch dieses Vorgehen sollte auch gleichzeitig gezeigt werden, dass durch

das Labeln das Muster nicht beeinflusst wird. Abbildung 34 zeigt den Ablauf der Probenaufbereitung mit Biotin-Switch und *Pulldown* der markierten Proteine.

Da jeweils drei biologische Replikate vorlagen und in beide Richtungen gemischt wurde, waren es sechs Proben, die nach dem Zusammenführen von *heavy* und *light* jeweils gedrittelt wurden für den „normalen“ *Pulldown*, eine Kontrolle ohne Deglutathionierungsschritt und eine Kontrolle ohne Zugabe von Biotinmaleimid. Von allen 18 Proben wurden nach dem *Pulldown* Western Blots erstellt, bevor die jeweiligen Eluate 1-3 gepoolt und zur MS geschickt wurden.



**Abbildung 35: α-Biotin Western Blots der *Pulldowns*.** (A) „normaler“ *Pulldown* der glutathionylierten Proteine nach Markierung mit Biotinmaleimid und Anreicherung über Avidin-Beads. (B) *Pulldown* ohne Deglutathionierungsschritt. (C) *Pulldown* mit Deglutathionierungsschritt ohne Biotinmaleimid-Markierung.

Abbildung 35 zeigt exemplarisch jeweils einen Western Blot des „normalen“ *Pulldowns* (A), der Kontrolle, bei welcher der Deglutathionierungsschritt weggelassen wurde (B) und der Kontrolle, bei der im letzten Schritt kein Biotinmaleimid zur Kopplung an die freien SH-Gruppen zugefügt wurde (C). Es ist zu sehen, dass nach fünf Waschschrritten keine Proteine mehr gewaschen werden konnten, was auch durch eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bestätigt wurde. Nach Elution mit 5 mM Biotin lösten sich die zuvor durch den Biotin-Switch markierten Proteine von den Beads, wobei jeweils am meisten Protein in der ersten Elutionsfraktion war (A).

Die 18 Proben wurden zur massenspektrometrischen Analyse an unseren Kooperationspartner John Yates III am Scripps Research Institute in La Jolla, USA, geschickt. Tabelle 15

zeigt die Anzahl der plasmodialen Proteine, die in der MS für die verschiedenen Proben gefunden wurden. Zur Auswertung wurden nur Proteine aus *P. falciparum* herangezogen. Die häufigsten Kontaminanten waren Keratin (vermutlich durch Verunreinigung bei Probenverarbeitung) und erythrozytäre Proteine (durch Kontamination bei Zellernte). Die meisten Proteine wurden für den normalen *Pulldown* erwartet. Die Anzahl der gefundenen Proteine war mit 87 bis 447 sehr unterschiedlich, war jedoch ähnlich für Kontrolle *heavy* + GOD-Stress *light* und Kontrolle *light* + GOD-Stress *heavy*. Bei der Kontrolle ohne den Deglutathionierungsschritt sollten weniger Proteine durch Biotinmaleimid markiert und damit in der Probe enthalten sein. Dies war in den meisten Proben auch der Fall, jedoch gab es einen Ausreißer nach oben mit 485 Proteinen in der Probe, was an einer unzureichenden Blockierung mit NEM liegen könnte oder daran, dass beim Waschen unspezifische Proteine nicht entfernt wurden. Die Kontrollen ohne Markierung mit Biotinmaleimid enthalten Proteine die unspezifisch an das Säulenmaterial binden. In den sechs Proben reichte die Zahl von 7-76 Proteinen.

**Tabelle 15: Anzahl der Pf-Proteine nach *Pulldown* und MS-Analyse.**

<i>Pulldown</i>	Behandlung	Probennummer	Proteine (Anzahl)
„normaler“ <i>Pulldown</i>	Kontrolle <i>heavy</i> + GOD-Stress <i>light</i>	Probe 1	447
		Probe 7	103
		Probe 13	118
	Kontrolle <i>light</i> + GOD-Stress <i>heavy</i>	Probe 4	400
		Probe 10	153
		Probe 16	87
Ohne Deglutathionierung	Kontrolle <i>heavy</i> + GOD-Stress <i>light</i>	Probe 2	216
		Probe 8	82
		Probe 14	8
	Kontrolle <i>light</i> + GOD-Stress <i>heavy</i>	Probe 5	485
		Probe 11*	5
		Probe 17	210
Ohne Biotinmaleimid	Kontrolle <i>heavy</i> + GOD-Stress <i>light</i>	Probe 3	76
		Probe 9	33
		Probe 15	11
	Kontrolle <i>light</i> + GOD-Stress <i>heavy</i>	Probe 6	34
		Probe 12	34
		Probe 18	7

\*bei dieser Probe ist leider die Säule gebrochen, weshalb sie keine vollständigen Daten liefert

Hierbei ist jedoch anzumerken, dass in Tabelle 15 alle plasmodialen Proteine gezählt wurden und nicht ausschließlich diejenigen, für die eine Bindung von Biotinmaleimid an ein bestimmtes Cystein gefunden wurde und die damit sehr sicher vorher glutathionyliert waren. Insgesamt konnte bei 29 Proteinen eine Modifikation an einem bestimmten Cystein mit Biotinmaleimid und damit eine Glutathionierungsstelle in der MS gefunden werden.

Die detaillierte Auswertung des vorliegenden sehr umfangreichen Datensatzes ist aktuell noch nicht abgeschlossen. An dieser Stelle – und daher im Rahmen meiner Arbeit – können aber bereits die Proteine betrachtet werden, bei denen eine Modifikation des Cysteins durch Biotinmaleimid nachgewiesen wurde. Als interessantes, am Redoxstoffwechsel beteiligtes Protein, wurde das *P. falciparum* Thioredoxin 1 (*PfTrx1*) als deutlich hochreguliert (Peak Area Ratio 53,54, 58,70, 44,40 und 54,15) für die GOD-gestresste Behandlung (light) gefunden. Jedoch lag *PfTrx1* in zwei Proben auch mit einer Hochregulierung für die ungestresste Kontrolle vor (Peak Area Ratio 4,54 und 13,16). Als Glutathionierungsstelle wurde das C43 gefunden, an welches Biotinmaleimid gebunden war, das einen Massenshift von 451,1889 Da verursacht (IAPFYEEC(451.1889)SK). Als weiteres interessantes Protein des Redox-Stoffwechsels wurde das *PfGrx1* in vier von sechs Proben mit einer Biotinmaleimidmodifikation an C88 (IFINKDVVGGC(451.1889)DDLVK) gefunden, wobei eine Hoch- bzw. Herunterregulation nicht eindeutig nachzuweisen war.

Insgesamt konnte bei 29 Proteinen eine Modifikation an einem definierten Cystein mit Biotinmaleimid und damit eine sehr wahrscheinliche Glutathionierungsstelle in der MS nachgewiesen werden (Tabelle 16), wobei 5 der Proteine auch in der Kontrolle zu finden waren (grau markiert). Letzteres ist nicht außergewöhnlich, da die Glutathionierung eine reversible Redoxregulation darstellt und auch unter physiologischen Bedingungen auftreten kann. Interessant ist des Weiteren, dass beispielsweise die Serin-/Threonin-Kinase FIKK8 gleich an zwei Stellen (C441, C283) glutathionyliert werden kann.

Tabelle 16: Glutathionylierte Proteine mit ihrer *Modification Site*.

No.	PlasmoDB Accession No.	Annotation	Modifizierte/s Peptide	Cystein
1	PF3D7_0306300	Glutaredoxin 1 (GRX1)	IFINKDVVGGC(451.1889)DDLKVENDEGK IFINKDVVGGC(451.1889)DDLKVENDEGK IFINKDVVGGC(451.1889)DDLK	C88 C88 C88
2	PF3D7_0917900*	Heat shock protein 70	DLEAVC(451.1889)QPIIVK	C623
3	PF3D7_0110600	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K)	SITFNDINSGNINTNSC(451.1889)IMNNMIVTK	C589
4	PF3D7_0305300	Transporter, putative	DIPYC(451.1889)SFNNFQENEDK	C244
5	PF3D7_0307100*	40S ribosomal protein S12, putative	LITTLIC(451.1889)AEK	C76
6	PF3D7_0313000	Conserved Plasmodium protein, unknown function	DNGNIIIEDTNGLC(451.1889)K	C45
7	PF3D7_0317200	Cdc2-related protein kinase 4	NLDC(451.1889)VSINIVVNNINNNVINK	C411
8	PF3D7_0322000	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP19A)	RSVVITDC(451.1889)GEL	C168
9	PF3D7_0527500	Hsc70-interacting protein (HIP)	DFMVEETIEC(451.1889)PPLAPIVDEDLSEVLEEISNLK	C111
10	PF3D7_0604500	GYF domain-containing protein, putative	DC(451.1889)FDILNNQMR	C2109
11	PF3D7_0606600	Conserved Plasmodium protein, unknown function	FNEQYPIC(451.1889)VK	C1123
12	PF3D7_0613800	AP2 domain transcription factor, putative	IMNVNDIC(451.1889)NIYMVDK	C48
13	PF3D7_0708800	Heat shock protein 110 (HSP110c)	VQTC(451.1889)YTTPIETLLAQGSYSSK	C606
14	PF3D7_0805700	Serine/threonine protein kinase, FIKK family (FIKK8)	NMLSNQDIYNETENINDSTTEC(451.1889)TIVK STTEIFDNMNC(451.1889)IEYTDEYK	C441 C283
15	PF3D7_0818200*	14-3-3 protein (14-3-3I)	YISEFSC(451.1889)DEGKK KVEEELNNIC(451.1889)QDILNLLTK VEEELNNIC(451.1889)QDILNLLTK	C149 C109 C109
16	PF3D7_0931800	Proteasome subunit beta type-6, putative	INENLYVC(451.1889)R	C74
17	PF3D7_1015900	Enolase (ENO)	VNQIGSITEAIEAC(451.1889)LLSQK	C70
18	PF3D7_1023900	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 homolog, putative (CHD1)	NVILTELNIIVETC(451.1889)NEIVER	C2081
19	PF3D7_1028600	Conserved Plasmodium protein, unknown function	NNVEVFNIAEGEEC(451.1889)NLK	C43
20	PF3D7_1107300	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative (PAIP1)	NSYDDSILC(451.1889)NNR INMDNC(451.1889)NINNNYSNNNSSSNSR	C110 C125
21	PF3D7_1204300*	Eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF5A)	KYEDIC(451.1889)PTSHNMDVPVVK	C73
22	PF3D7_1224300*	Polyadenylate-binding protein 1, putative	FC(451.1889)FINYADAESAK	C234

No.	PlasmoDB Accession No.	Annotation	Modifizierte/s Peptid/e	Cystein
23	PF3D7_1237500	Conserved Plasmodium protein, unknown function	TGDIITNDDSLTNNLC(451.1889)IFK	C935
24	PF3D7_1318100	Ferredoxin	KIEC(451.1889)NEDEYILDASER	C114
25	PF3D7_1353800	Proteasome subunit alpha type-4, putative	C(451.1889)GVAGLNADANILINQSR	C74
26	PF3D7_1353900	Proteasome subunit alpha type-7, putative	DC(451.1889)IFLALK	C185
27	PF3D7_1361900	Proliferating cell nuclear antigen 1 (PCNA1)	LC(451.1889)GANESVVISSK	C83
28	PF3D7_1451100	Elongation factor 2	ETVTEESTITC(451.1889)LGK	C565
29	PF3D7_1457200	Thioredoxin 1 (TRX1)	RIAPFYEEC(451.1889)SK IAPFYEEC(451.1889)SK	C43 C43

\*Proteine wurden auch in der Kontrolle ohne Deglutathionylierungsschritt als mit Biotinmaleimide modifiziert gefunden

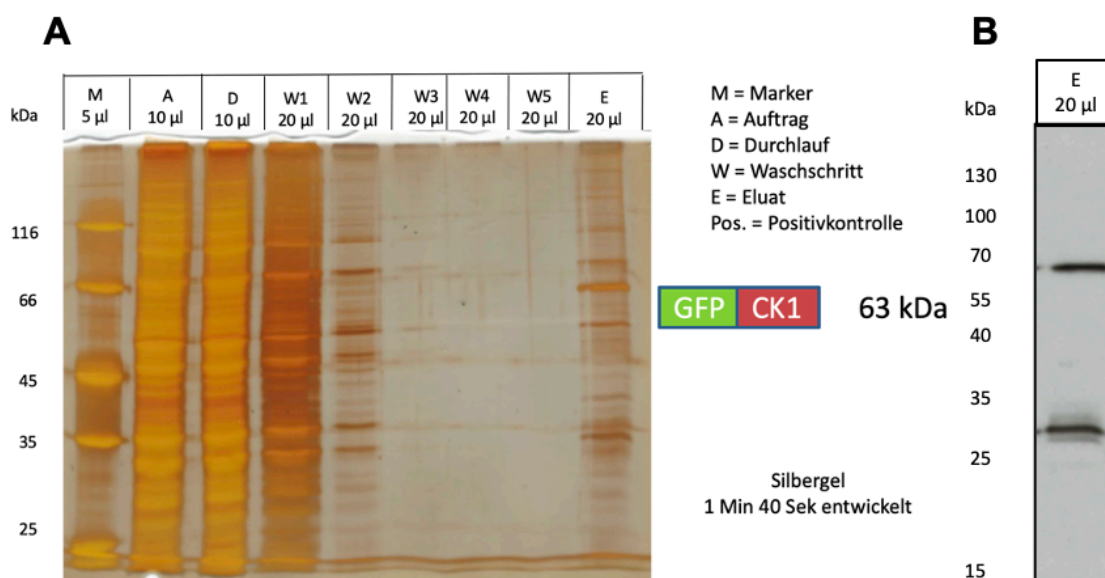
### 4.3 GFP-Pulldown der CK1 mit ihren Interaktionspartnern

#### 4.3.1 Stressbedingungen und Ernte der Parasiten

Zur Identifikation der Interaktionspartner der CK1 unter verschiedenen Stressbedingungen wurde ein *P. falciparum* 3D7-Stamm mit GFP-getaggtter CK1 verwendet (Dorin-Semblat *et al.*, 2015). Um pharmakologischen bzw. oxidativen Stress in den Parasiten auszulösen, wurden sie jeweils mit 10-facher  $IC_{50}$ -Konzentration von ART oder VI16832 bzw. mit 100 mU/ml Glukose-Oxidase (GOD) für eine Stunde vor der Ernte durch Saponinlyse inkubiert. Parallel wurde eine Kontrolle, zu der nur DMSO zugegeben wurde, vorbereitet. Es wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt. Die  $IC_{50}$ -Werte waren vorher im entsprechenden 3D7-Stamm gemessen worden und lagen bei 18 nM für ART und 1,3  $\mu$ M für VI16832.

#### 4.3.2 Etablierung des GFP-Pulldowns

Für den *Pulldown* der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner wurde ein kommerzielles Kit verwendet, dessen Protokoll für *P. falciparum* getestet und optimiert wurde. Während des Tests des Protokolls und dessen Optimierung wurden die Proteine mittels Silberfärbung eines SDS-Gels sichtbar gemacht (Abbildung 36 A). Dabei ist gut zu sehen, dass beim Waschen ungebundene Proteine entfernt wurden. Im Eluat waren die Proteine sichtbar, die zuvor an die Beads bzw. die PfCK1 gebunden hatten. Die mit GFP-fusionierte PfCK1 hat eine Größe von 63 kDa und war im Eluat als prominenteste Bande sichtbar. Die PfCK1 alleine ist 36 kDa groß und war ebenfalls im Eluat als Bande sichtbar. Abbildung 36 B zeigt einen  $\alpha$ -GFP Western Blot des Eluats. Die untere Bande zeigt nicht fusioniertes GFP mit dem Transit-Peptid leicht darüber und einem GFP-Degradierungsprodukt leicht darunter. Die obere Bande zeigt die mit dem GFP-Tag fusionierte CK1.



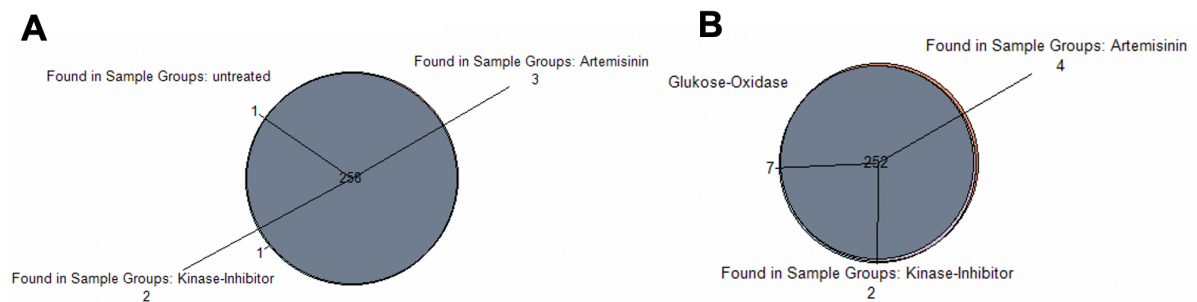
**Abbildung 36: Elutionsprofil der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner während des GFP-Pulldowns.** Es wurde eine Gelelektrophorese mit Proben der einzelnen Schritte des *Pulldowns* durchgeführt und die Proteine mit Silber-Färbung sichtbar gemacht (A). Der  $\alpha$ -GFP Western Blot des Eluats zeigt eine GFP-Bande bei ca. 27 kDa und bei ca. 63 kDa die Bande von GFP-CK1.



### 4.3.3 Massenspektrometrische Analyse der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner

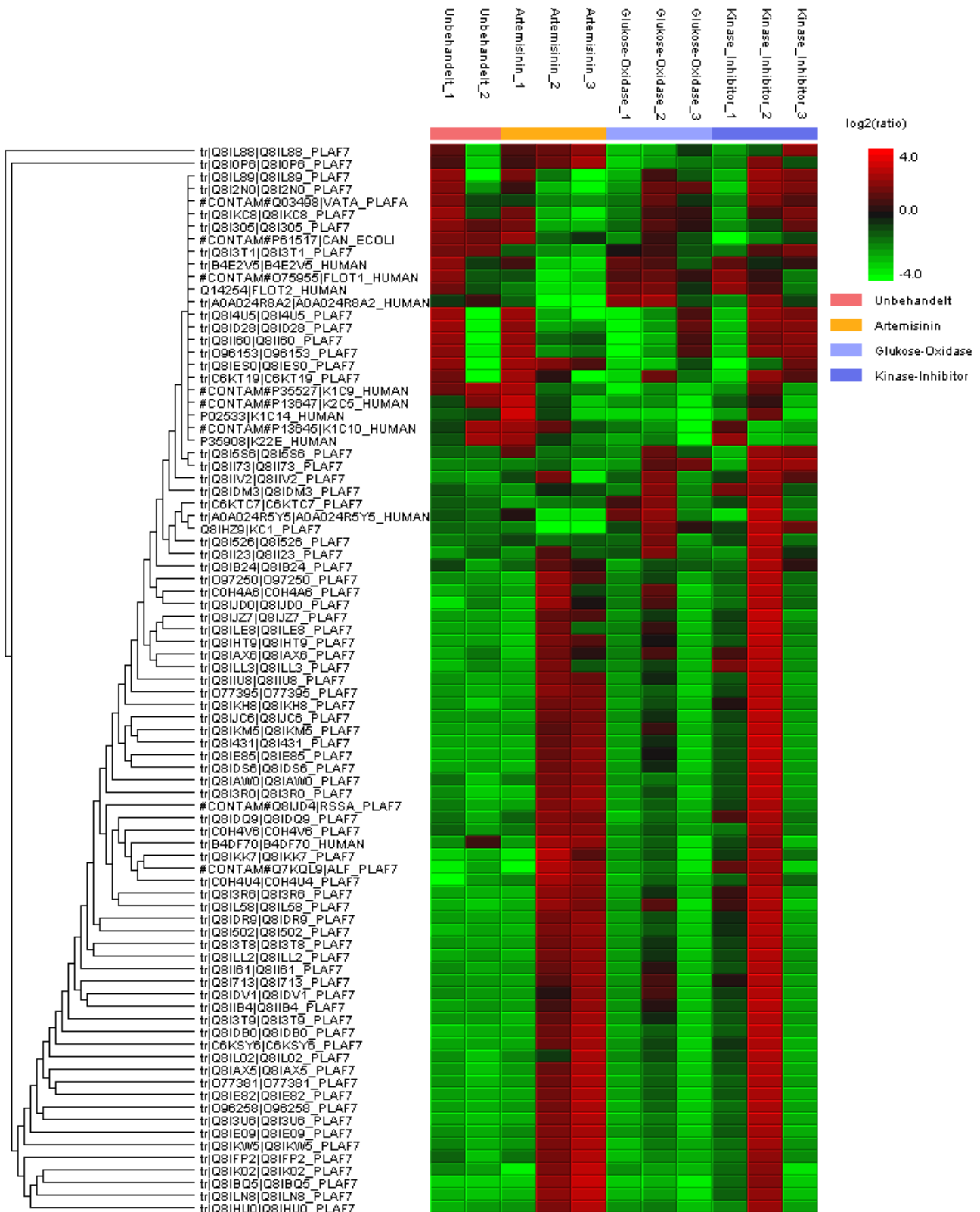
Die massenspektrometrische Analyse der Proben, die in biologischen Triplikaten vorlagen, wurde von der AG Linne an der Universität Marburg durchgeführt (3.6.3).

In allen zwölf Proben konnte die PfCK1 identifiziert werden. Für die unbehandelte Kontrolle konnten 259 Proteine gefunden werden, in den Proben mit ART wurden 263 Proteine identifiziert, für den Kinase-Inhibitor VI16832 261 Proteine und 252 Proteine für die Probe, die mit GOD behandelt wurde. Abbildung 37 zeigt Venn-Diagramme zum Vergleich der Schnittmenge der Proteine. Fast alle dieser Proteine wurden in allen Gruppen gefunden.



**Abbildung 37: Venn-Diagramme der Anzahl der (gemeinsamen) Proteine.** 258 (A) bzw. 252 (B) der 265 Proteine waren in allen Behandlungen und der Kontrolle zu finden.

Mit der Software PEAKS wurden die Proben verglichen und eine Heatmap erstellt (Abbildung 38). Die Heatmap zeigt die am stärksten differenziell hoch- bzw. herunterregulierten Proteine zwischen den unterschiedlichen Behandlungen. Bei der Label-freien Quantifizierung werden diejenigen Proteine, für die nennenswerte Änderungen detektiert wurden, in der Heatmap geclustert dargestellt, wenn sie einen ähnlichen Trend ausweisen. Bei den vorliegenden Proben waren die jeweils drei biologischen Replikate inhomogen, weshalb bei der unbehandelten Kontrolle die dritte, abweichende Probe zum Vergleich weggelassen wurde. Die deutlichste Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigt die Inkubation mit Artemisinin.



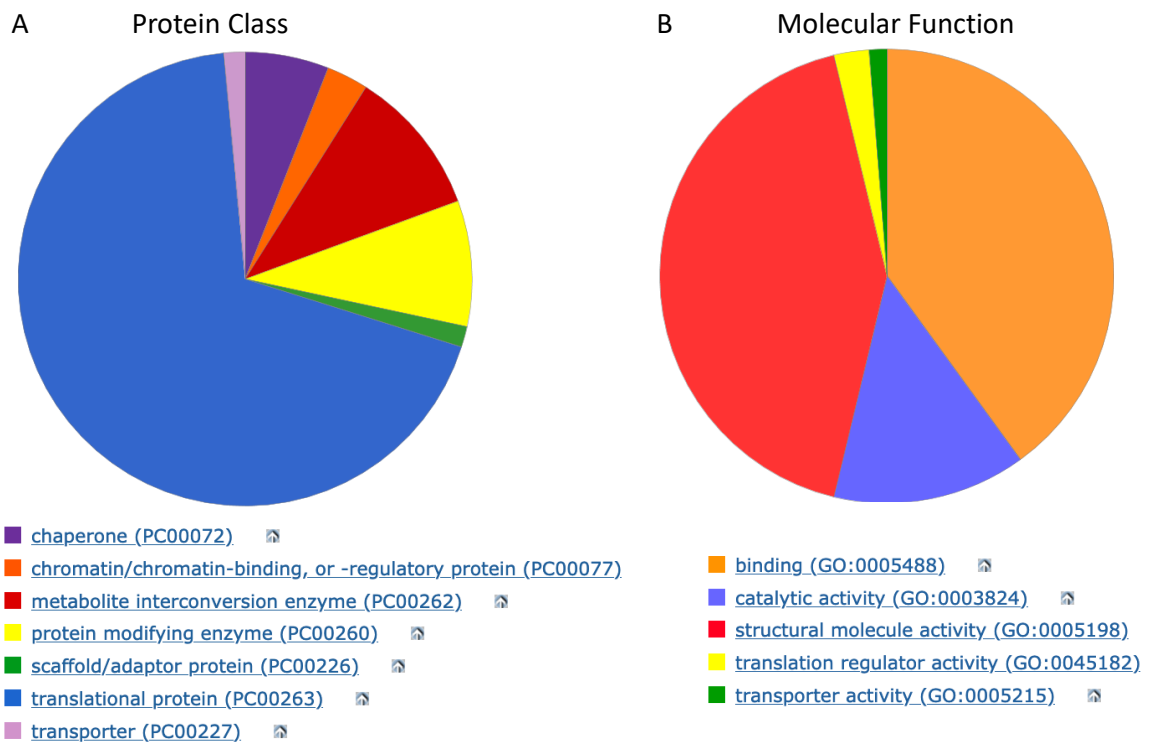
**Abbildung 38: Heatmap der hoch- bzw. herunterregulierten Proteine der mit ART, GOD und VI16832 behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.** Mit der PEAKS-Software wird die relative Proteinhäufigkeit über einen Satz von Proben gleichzeitig analysiert. Hochdifferentiell angereicherte Proteine nach *Pull-down* und Massenspektrometrie zwischen den Gruppen werden als Heatmap dargestellt. Die Farben repräsentieren das log<sub>2</sub>(Ratio).

Tabelle 17: Interaktionspartner der PfCK1 nach Co-IP.

PlasmoDB Accession No.	Annotation	Code
PF3D7_1437900	HSP40, subfamily A	Q8IL88_PLAF7
PF3D7_1357000	Elongation factor 1-alpha	Q8I0P6_PLAF7
PF3D7_1437700	Succinyl-CoA ligase, putative	Q8IL89_PLAF7
PF3D7_0927900	Phosphatidylserine decarboxylase	Q8I2N0_PLAF7
PF3D7_1471100	Exported protein 2	Q8IKC8_PLAF7
PF3D7_0914700	Major facilitator superfamily-related transporter, putative	Q8I305_PLAF7
PF3D7_1140000	Carbonic anhydrase 2	P61517(CAN_ECOLI)
PF3D7_1248900	26S protease regulatory subunit 8, putative	Q8I4U5_PLAF7
PF3D7_1368100	26S proteasome regulatory subunit RPN11	Q8ID28_PLAF7
PF3D7_1130400	26S protease regulatory subunit 6A, putative	Q8II60_PLAF7
PF3D7_0205900	26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative	O96153_PLAF7
PF3D7_1304500	Small heat shock protein, putative	Q8IES0_PLAF7
PF3D7_0617900	Histone H3 variant	C6KT19_PLAF7
PF3D7_1212700	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	Q8I5S6_PLAF7
PF3D7_1129000	Spermidine synthase	Q8II73_PLAF7
PF3D7_1105000	Histone H4	Q8IIV2_PLAF7
PF3D7_1347500	DNA/RNA-binding protein Alba 4	Q8IDM3_PLAF7
PF3D7_0629200	DnaJ protein, putative	C6KTC7_PLAF7
PF3D7_1136500	Casein kinase I	Q8IHZ9(KC1_PLAF7)
PF3D7_1239700	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 1	Q8I526_PLAF7
PF3D7_1134100	Protein disulfide isomerase	Q8II23_PLAF7
PF3D7_0818900	HSP 70	Q8IB24_PLAF7
PF3D7_0307200	60S ribosomal protein L7, putative	O97250_PLAF7
PF3D7_0415900	Ribosomal protein L15	C0H4A6_PLAF7
PF3D7_1027300	Peroxiredoxin	Q8IJD0_PLAF7
PF3D7_1004000	60S ribosomal protein L13, putative	Q8IJZ7_PLAF7
PF3D7_1431700	60S ribosomal protein L14, putative	Q8ILE8_PLAF7
PF3D7_1142600	60S ribosomal protein L35ae, putative	Q8IHT9_PLAF7
PF3D7_0814000	60S ribosomal protein L13	Q8IAX6_PLAF7
PF3D7_1424100	60S ribosomal protein L5, putative	Q8ILL3_PLAF7
PF3D7_1105400	40S ribosomal protein S4	Q8IIU8_PLAF7
PF3D7_0316800	40S ribosomal protein S15A, putative	O77395_PLAF7
PF3D7_1465900	40S ribosomal protein S3	Q8IKH8_PLAF7
PF3D7_1027800	60S ribosomal protein L3	Q8IJC6_PLAF7
PF3D7_1460700	60S ribosomal protein L27	Q8IKM5_PLAF7
PF3D7_0507100	60S ribosomal protein L4	Q8I431_PLAF7
PF3D7_1323100	60S ribosomal protein L6, putative	Q8IE85_PLAF7
PF3D7_1341200	60S ribosomal protein L18a	Q8IDS6_PLAF7
PF3D7_0812400	Importin subunit alpha	Q8IAW0_PLAF7
PF3D7_0520000	40S ribosomal protein S9, putative	Q8I3R0_PLAF7
PF3D7_1026800	40S ribosomal protein SA	Q8IJD4(RSSA_PLAF7)

PlasmoDB Accession No.	Annotation	Code
PF3D7_1343000	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	Q8IDQ9_PLAF7
PF3D7_0818200	14-3-3 protein	C0H4V6_PLAF7
PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q8IKK7_PLAF7
PF3D7_1444800	Fructose-bisphosphate aldolase	Q7KQL9(ALF_PLAF7)
PF3D7_0813300	NPL domain-containing protein	C0H4U4_PLAF7
PF3D7_0519400	40S ribosomal protein S24	Q8I3R6_PLAF7
PF3D7_1441200	60S ribosomal protein L1, putative	Q8IL58_PLAF7
PF3D7_1342000	40S ribosomal protein S6	Q8IDR9_PLAF7
PF3D7_1242700	40S ribosomal protein S17, putative	Q8I502_PLAF7
PF3D7_0517000	60S ribosomal protein L12, putative	Q8I3T8_PLAF7
PF3D7_1424400	60S ribosomal protein L7a	Q8ILL2_PLAF7
PF3D7_1130200	60S acidic ribosomal protein P0	Q8II61_PLAF7
PF3D7_1109900	60S ribosomal protein L36	Q8I713_PLAF7
PF3D7_1338200	60S ribosomal protein L6, putative	Q8IDV1_PLAF7
PF3D7_1124900	60S ribosomal protein L35, putative	Q8IIB4_PLAF7
PF3D7_0516900	60S ribosomal protein L2	Q8I3T9_PLAF7
PF3D7_1358800	40S ribosomal protein S15	Q8IDB0_PLAF7
PF3D7_0614500	60S ribosomal protein L19	C6KSY6_PLAF7
PF3D7_1447000	40S ribosomal protein S5	Q8IL02_PLAF7
PF3D7_0813900	40S ribosomal protein S16, putative	Q8IAX5_PLAF7
PF3D7_0317600	40S ribosomal protein S11, putative	O77381_PLAF7
PF3D7_1323400	60S ribosomal protein L23	Q8IE82_PLAF7
PF3D7_0217800	40S ribosomal protein S26	O96258_PLAF7
PF3D7_0516200	40S ribosomal protein S11	Q8I3U6_PLAF7
PF3D7_1331800	60S ribosomal protein L23, putative	Q8IE09_PLAF7
PF3D7_1451100	Elongation factor 2	Q8IKW5_PLAF7
PF3D7_0422400	40S ribosomal protein S19	Q8IFP2_PLAF7
PF3D7_1003500	40S ribosomal protein S20e, putative	Q8IK02_PLAF7
PF3D7_0719700	40S ribosomal protein S10, putative	Q8IBQ5_PLAF7
PF3D7_1421200	40S ribosomal protein S25	Q8ILN8_PLAF7
PF3D7_1142500	60S ribosomal protein L28	Q8IHU0_PLAF7

Tabelle 17 listet die in der Heatmap dargestellten Proteine auf, die durch die PEAKS-Software identifiziert wurden und deren Hoch- bzw. Herunterregulation in der Heatmap durch Farben dargestellt ist. Abbildung 39 zeigt die in Tabelle 17 gelisteten Proteine nach Proteinklasse und molekularer Funktion dargestellt. Die überwiegende Mehrheit, der in dieser Analyse identifizierten Proteine, ist an der Translation beteiligt. Auf Ebene der molekularen Funktion waren die meisten Proteine an der Aktivität eines Strukturmoleküls (*structural molecule activity*) und damit an der strukturellen Integrität eines Komplexes oder seines Aufbaus innerhalb oder außerhalb einer Zelle beteiligt, oder am *binding*.



**Abbildung 39: Klassifizierung der Proteine nach Proteinklasse und molekularer Funktion.** Die Analyse erfolgte mit pantherdb.org.

Es ist jedoch sehr wichtig zu betonen, dass es sich um eine *Label*-freie relative Quantifizierung der Proben zueinander handelt und die drei Replikate sehr inhomogen waren. Bei einem zusätzlichen Kontrollexperiment, bei welchem der *Pulldown* und die MS mit dem parentalen 3D7-Stamm ohne GFP-Tag durchgeführt wurden, wurde eine nennenswerte Anzahl von Proteinen gefunden, weshalb alle hier gezeigten Ergebnisse als vorläufig betrachtet werden sollten und sich nur vergleichend aufeinander beziehen. Weitere Experimente, die eine bessere Quantifizierbarkeit erlauben (mit entsprechenden Kontrollen), müssen durchgeführt werden, um klare Aussagen zu treffen.

## 5 DISKUSSION

Wie eingangs erläutert, ist die Bedrohung, die von Infektionskrankheiten ausgeht, aktuell so präsent und im Fokus der Öffentlichkeit wie schon lange nicht mehr. Die globalen Anstrengungen im Kampf gegen die Sars-CoV-2-Pandemie haben gezeigt, wie schnell und effizient Fortschritte in der Forschung gemacht werden können, wenn Kräfte gebündelt werden und ausreichend Ressourcen zur Verfügung stehen. Neben all der Aufmerksamkeit, die aktuell auf der Bekämpfung der Sars-CoV-2-Pandemie liegt, dürfen andere globale Gesundheitsprobleme, wie unter anderem die Malaria, nicht vernachlässigt werden. Obwohl die WHO schon 1955 das Ziel der Ausrottung der Malaria ausgerufen hatte (WHO, 2019a), stirbt dennoch immer noch jede zweite Minute ein Kind daran (WHO, 2019d). Die zunehmenden Resistenzen gegen häufig verwendete Malariamittel wie Artemisinin (ART) und Chloroquin (CQ) erfordern die Suche nach neuen Angriffspunkten für Medikamente (Blasco *et al.*, 2017). Möglicherweise gibt der aktuelle Erfolg bei der Impfstoffentwicklung nochmals einen starken An Schub zur Entwicklung weiterer Impfstoffe – unter anderem auch eines effizienten Impfstoffes gegen Malaria.

Während seines komplexen intraerythrozytären Lebenszyklus ist der Malariaerreger *P. falciparum* oxidativem Stress verschiedener Quellen ausgesetzt, weshalb der Parasit ein komplexes antioxidatives Abwehrsystem besitzt (Jortzik & Becker, 2012). Dieses zu studieren trägt nicht nur zum Verständnis der Biologie des Parasiten bei, sondern ist auch wichtig zur Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien und zum Verständnis von Resistenzbildung. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten der verbesserten Untersuchung des intrazellulären Glutathion-Redoxpotentials durch die Verwendung des neuen, genetisch kodierten, Fluoreszenz-basierten Redox-Sensor sfroGFP2 systematisch zu untersuchen und zu evaluieren. GSH-Level und das GSH-/GSSG-Verhältnis stellen geeignete Indikatoren für die zelluläre Redox-Homöostase und oxidativen Stress dar. Neben der Testung der neuen Sonde sollten auch die Vorteile der stabilen Integration der Redox-Sensoren in das parasitäre Genom untersucht und die Redox-Messungen mit den Sonden auf den Plattenleser übertragen werden. Um der Malaria-Community einen robusten und zuverlässigen *Plasmodium*-Stamm für vergleichbare Ergebnisse zur Verfügung zu stellen, wurden die Sonden hGrx1-roGFP2 und die optimierten sfroGFP2-Sonden in Blutstadien von NF54*attB*-Parasiten charakterisiert.

### 5.1 Stabile Transfektion und Transfer der Messungen auf den Plattenleser

Die *attB/attP*-Methode ist eine geeignete und effiziente Methode zum Einbringen von gewünschten Genen durch zielgerichtete Rekombination der *attP*-site im Plasmid und der *attB*-site im parasitären Genom (Nkrumah *et al.*, 2006). Im Vergleich zur episomalen Transfektion bietet sie eine Reihe von Vorteilen: Durch die stabile Integration bleibt das Zielgen dauerhaft vorhanden und geht nicht nach einigen Wochen durch Resistenzbildung gegenüber dem Selektionsmarker wieder verloren, da nach erfolgreicher stabiler Integration der Selektionsmarker nicht mehr zur Kultivierung benötigt wird. Die Möglichkeit der längeren Nutzung stabil

transfizierter Parasiten erlaubt außerdem die Herstellung monoklonaler Parasitenlinien. Im Gegensatz zu der bisher verwendeten episomalen Transfektion erleichtert die stabile Integration schnelle und zuverlässige Analysen, da alle Parasiten den Sensor exprimieren und die Fluoreszenz-Signale höher waren. Diese Vorteile ermöglichen die Messung von Redoxveränderungen in lebenden Parasitenpopulationen in Flüssigkultur mit einem Plattenlesegerät. Die roGFP2-basierten Sonden werden schon länger am konfokalen Mikroskop und an Plattenlesern in verschiedenen Organismen wie HeLa-Zellen, Hefe und Bakterien genutzt (Birk et al., 2013; Morgan et al., 2011; Schwarzländer et al., 2008; Van Der Heijden & Finlay, 2015). Auch bei *P. falciparum* erwiesen sich beide Methoden, Fluoreszenzmikroskopie und Plattenleser-Messungen mit den stabil exprimierten Sensoren als zuverlässige Werkzeuge mit vergleichbarer Empfindlichkeit gegenüber Oxidation/Reduktion in der dynamischen Bildung lebender Zellen. Bei *P. falciparum* wurde das  $E_{GSH}$  in der Vergangenheit mittels CLSM in episomal transfizierten Parasiten bestimmt (Kasozi et al., 2013; Mohring et al., 2017). Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwändig, da Bilder einzelner Parasiten aufgenommen und ausgewertet werden müssen, sodass für Versuche jeweils etwa nur zehn Parasiten pro Behandlung betrachtet wurden. Die Detektion mittels Plattenleser ist eine schnelle, einfache und häufig verfügbare Methode, mit der viele Behandlungen auf einmal verglichen werden können. Außerdem sind dynamische Messungen über längere Zeiträume durchführbar, was bei der CLSM aufgrund von *Photobleaching* nicht möglich ist. Für die Messungen am Plattenleser wird zwar eine größere Zellmenge benötigt, jedoch werden auch viele tausende Parasiten gleichzeitig gemessen und die Auswertung erfolgt direkt am Gerät. Außerdem wird der persönliche Einfluss durch die Auswahl geeigneter Parasiten minimiert und damit die Messung objektiviert. Schließlich führt die Analyse einer ganzen Zellpopulation – und nicht mehrerer Einzelzellen – zu einem robusten *Readout*. Zusätzlich ist die Methode am Plattenleser schneller erlernbar und vereinfacht die Durchführbarkeit komplexerer *in cellulo*-Studien. Nachteilig ist jedoch, dass morphologische Veränderungen der Zelle, z.B. aufgrund von Arzneimittelwirkungen, nicht erkannt werden können, weshalb sich ein gleichzeitiges Monitoring der Zellen am Mikroskop empfiehlt. Außerdem verliert man durch das gleichzeitige Messen einer ganzen Population Informationen zu den einzelnen Zellen.

Bei der Etablierung der Methode auf dem Plattenleser wurden verschiedene Parameter getestet. Dabei wurden drei Plattenleser direkt verglichen: Tecan Inifite M200, BMG Labtech CLARIOstar mit Filtern und Monochromator und BMG Labtech PHERAstar (mit Filtern). Abbildung 19 zeigt eine Vergleichsmessung mit Parasiten nach 24-stündiger Inkubation mit Malariamitteln. Die Plattenleser zeigten in dieser Messung vergleichbare Ergebnisse, jedoch waren PHERAstar und CLARIOstar sensitiver und zeigten höhere Fluoreszenzwerte. Neben dem Gerätevergleich wurden dabei auch das Setzen der *Gains* optimiert und verschiedene Mikrotiterplatten (96-well half-area und 384-well) getestet.

In vorausgegangenen Studien des Labors konnten Unterschiede in der Menge an Thiolen und reduziertem GSH zwischen episomal transfizierten und nicht-transfizierten 3D7-Parasiten festgestellt werden (Mohring et al., 2016). Es wurde vermutet, dass diese Veränderungen durch die für die Selektion verwendete Substanz, WR99210, verursacht wurden. Das Entfallen der Notwendigkeit von Selektionssubstanzen ist deshalb ein weiterer Vorteil der stabilen

Integration. Bei einer Überprüfung dieser Hypothese wurde die Gesamtmenge an Thiolen, freien Thiolen, Gesamtglutathion und GSH-Spiegel der transient transfizierten Parasiten 3D7<sup>[pARL1a(+)]</sup>, 3D7<sup>[hGrx1]</sup>, 3D7<sup>[roGFP2]</sup> und 3D7<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> bestimmt und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Parasiten festgestellt werden, die verschiedene Teile des Sensors oder den Transfektionsvektor pARL1a(+) allein trugen (Schuh *et al.*, 2018). Dies deutet darauf hin, dass es keinen direkten Einfluss der Redox-Sonde auf den Glutathion-Stoffwechsel im Parasiten gibt. In dieser Arbeit wurden leichte Unterschiede in der Menge an (freien) Thiolen, reduziertem Glutathion und Gesamtglutathion in NF54*attB*-Parasiten ohne Transfektion und mit stabil integrierter Sonde (NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>) festgestellt, die jedoch nur für die Thiole im frischen Zellextrakt signifikant war.

## 5.2 Charakterisierung und Etablierung der sfroGFP2 Redox-Sonde

### 5.2.1 Untersuchung der rekombinanten Proteine

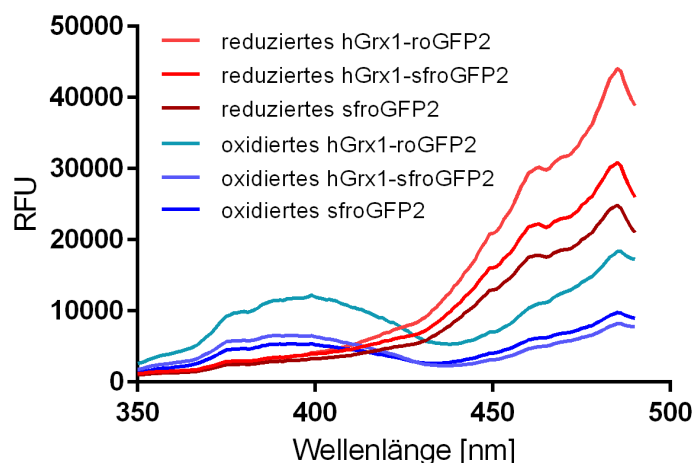
Um die derzeit verfügbaren Instrumente zur Untersuchung der Redox-Homöostase bei Malariaparasiten weiter zu verbessern, wurde in der vorliegenden Arbeit die sfroGFP2-Redox-Sonde evaluiert und auf verbesserte Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Zur Generierung der neuen Sonde, die im Labor von Prof. David Fidock erfolgte, wurden in roGFP2 der vollständige Satz der superfolderGFP-Mutationen (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V, A206V) sowie die *Cycle-3*-Mutationen (F99S, M153T, V163A) eingeführt (Pédelacq *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde die F223R-Mutation eingebracht, die auch in der roTurbo-Sonde enthalten ist (Dooley *et al.*, 2012). Zusammenfassend sind die beiden Unterschiede zwischen der von Dooley *et al.* beschriebenen roTurbo-Sonde und sfroGFP2 das Vorhandensein der Y145F-Mutation und der A206V-Mutation, die bei Dooley *et al.* (2012) eine A206K-Mutation ist.

Zur Charakterisierung der neuen sfroGFP2-Sonde wurde zuerst das rekombinante Protein untersucht und mit der bereits genutzten hGrx1-roGFP2-Sonde verglichen. Alle drei Proteine (hGrx1-roGFP2, sfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2) konnten mittels heterologer Überexpression in *E. coli* erfolgreich in ausreichender Menge produziert und über einen Hexahistidyl-Tag mittels Affinitätschromatographie mit Ni-NTA gereinigt werden. Die Proteine konnten bei -20 °C gelagert werden und wurden vor den Experimenten mit DTT reduziert und entsalzt, sodass die Proteine in reduzierter Form vorlagen.

Die Spektren von hGrx1-roGFP2, sfroGFP2 und hGrx1-sfroGFP2 zeigten die typischen Maxima unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen (Abbildung 13 und Abbildung 40). Hoseki *et al.* (2016), die ER-targeted roGFP-iL untersuchten, berichteten über unerwünschte spektrale Veränderungen durch die Einführung bestimmter Mutationen, vor allem durch die Y145F-Mutation im reduzierten Spektrum. Die Analyse der spektralen Eigenschaften, sowohl von sfroGFP2 als auch hGrx1-sfroGFP2, im direkten Vergleich mit rekombinantem hGrx1-roGFP2 zeigte keine der von Hoseki *et al.* beschriebenen problematischen spektralen Veränderungen. Vielmehr waren sowohl die oxidierten als auch die reduzierten Spektren mit den bekannten, zum Beispiel von Meyer und Dick beschriebenen, „normalen“ (hGrx1)-roGFP2-Sonden vergleichbar (Meyer & Dick, 2010) und es konnten keine nachteiligen Auswirkungen der zur Erzeugung von sfroGFP2 eingeführten Mutationen auf die spektralen



Eigenschaften der Sonde festgestellt werden. Entgegen den Beobachtungen in der Zelle waren jedoch bei den rekombinanten Proteinen die absoluten Fluoreszenzwerte für die sfroGFP2-basierten Sonden geringer als für hGrx1-roGFP2 (Abbildung 40). Eine mögliche Erklärung könnte eine Temperatur-Sensitivität der Proteine sein (persönliche Konversation mit Kim Heimsch, (Pédelacq *et al.*, 2006; Sample *et al.*, 2009)). Untersuchungen mit den Zellen, bei denen sfroGFP2 deutlich stärker leuchtete (siehe z.B. Tabelle 14 und Abbildung 21), wurden bei 37 °C durchgeführt, wohingegen Experimente mit dem rekombinanten Protein bei RT durchgeführt wurden. Dies wird nun in weiteren Experimenten untersucht.



**Abbildung 40: Vergleich der Spektren von hGrx1-roGFP2, hGrx1-sfroGFP2 und sfroGFP2 in oxidiertem und reduziertem Zustand.** In reduzierter Form liegen die Sonden deprotoniert vor und zeigen ein Maximum in der Nähe von 488 nm (rote Kurven). Durch Oxidation wird das Chromophor protoniert und kann bei 405 nm angeregt werden (blaue Kurven).

### 5.2.2 Interaktion der Sonden mit Glutathion und Glutaredoxin

Darüber hinaus wurde die Fähigkeit der sfroGFP2-Sonde mit GSH und GSSG in An- oder Abwesenheit von Grx zu äquilibrieren, verifiziert (Abbildung 15 und Abbildung 16). Die Zugabe von GSH oder GSSH zu sfroGFP2 hatte über einen kurzen Zeitraum (5 min) keinen Effekt auf das Redox-Ratio, da *in vitro* kein Grx vorhanden war, um schnell den Schluss der Disulfidbrücke zu vermitteln (Abbildung 15 A). Im Gegensatz dazu kann man bei hGrx1-roGFP2 unmittelbar nach Zugabe von GSSG einen Anstieg des Redox-Ratios beobachten (Abbildung 15 B). Der geringere Anstieg, der auch bei Zugabe von GSH zu sehen ist, lässt sich dadurch erklären, dass ein gewisser Anteil des GSH im Verlauf der Zeit zu GSSG oxidiert ist, welches die oxidativen Effekte hervorruft. Um dies detaillierter zu betrachten, wurde ein Experiment durchgeführt, bei welchem sfroGFP2, sfroGFP2+Grx, hGrx1-sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 parallel vergleichend mit einem *Readout* nach 5 min und 4 h getestet wurden. Um dabei sicherzustellen, dass das GSH reduziert vorliegt, wurde ein Back-Up-System mit humaner Glutathionreduktase und NADPH verwendet, um das GSH kontinuierlich reduziert zu halten. Die Inkubation mit GSH führte nicht zur Oxidation der Sonden und zeigte eine vergleichbare Reduktion für alle Sonden. Die Oxidation von sfroGFP2 durch GSSG war zeitabhängig und in Gegenwart von Grx stärker ausgeprägt. Die stärkste Oxidation wurde beobachtet, wenn Grx direkt mit der Sonde verbunden war (Abbildung 16). In *in cell*-Experimenten konnten wir bisher nicht beobachten, dass die Sonde ohne fest gekoppeltes Grx langsamer reagierte.

Möglicherweise ist die zytosolische Grx-Konzentration jedoch höher als 1  $\mu\text{M}$ , was eine schnellere Äquibrierung ermöglicht, sodass man vergleichbare oxidative Signale bei den Messungen mit sfroGFP2 und hGrx1-roGFP2 in den Zellen beobachten kann. Um sicherzustellen, dass die Verfügbarkeit von Grx bei den Messungen nicht limitierend ist, wurde die Sonde in einem nächsten Schritt mit hGrx1 gekoppelt und stabil in die NF54*attB*-Parasiten eingebracht. Daraus wurden monoklonale Linien hergestellt (Abbildung 31), welche für zukünftige Experimente verwendet werden sollten. Die höhere Fluoreszenzintensität in Kombination mit einer schnellen Äquibrierung bei hGrx1-sfroGFP2 kann auch geeignet sein, um Messungen des Redoxpotentials in subzellulären Kompartimenten ohne Grx zu ermöglichen.

### 5.2.3 *In cellulo* Vergleich von hGrx1-roGFP2 und sfroGFP2

Zum initialen Vergleich der beiden Linien NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup> wurden *real-time* Messungen des dynamischen Bereichs am Plattenleser und mittels CLSM durchgeführt (Abbildung 18). Erwartungsgemäß ließen sich beide Zelllinien durch die Zugabe von 1 mM DIA oxidieren und anschließend durch 10 mM DTT wieder reduzieren.

Im nächsten Schritt wurden für einen direkten Vergleich der *Dynamic Range*, des Redoxstatus, des  $E_{GSH}$  und der Fluoreszenz im Zytosol von NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup>- und NF54<sup>[sfroGFP2]</sup>-Parasiten drei unabhängige Experimente mit den gleichen Mikroskopeinstellungen an angereicherten Trophozoiten durchgeführt. Beide Stämme wiesen mit -304 mV für NF54<sup>[hGrx1-roGFP2]</sup> und -303 mV für NF54<sup>[sfroGFP2]</sup> nahezu das gleiche  $E_{GSH}$  auf, was mit den Ergebnissen bei Messungen an 3D7-Parasiten von Kasozi *et al.* (-314 mV) und Mohring *et al.* (-309 mV) vergleichbar ist (Kasozi *et al.*, 2013; Mohring *et al.*, 2017). In verschiedenen Publikationen wurden leicht abweichende Werte für das *Midpoint Potential* von roGFP2 beschrieben und diskutiert, abhängig von den verwendeten Methoden und dem Labor, in dem die Analysen durchgeführt wurden (Dooley *et al.*, 2004; Meyer & Dick, 2010). Es wurde daher vorgeschlagen, einen Konsenswert für  $E_0'$  von -280 mV zu verwenden, der auch für diese Berechnungen verwendet wurde. In dieser Arbeit wurde für die unbehandelten Zellen ein OxD von 15,9 % für sfroGFP2 und 20,8 % für hGrx1-roGFP2 bestimmt, was auf ein ähnliches *Midpoint Potential* hinweist. Außerdem zeigt es auf, dass die Sonden im Zytosol von *Plasmodium* weitestgehend reduziert vorliegen und zur Detektion oxidativer Effekte *in cellulo* genutzt werden können, wie es auch schon für andere Organismen berichtet wurde (Albrecht *et al.*, 2011; Ebersoll *et al.*, 2020; Gutscher *et al.*, 2008; Kostyuk *et al.*, 2020; Meyer *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2011; Van Der Heijden & Finlay, 2015).

Sowohl an den Bildern (Abbildung 21) als auch an den absoluten Fluoreszenzintensitäten (Tabelle 14) kann man die deutlich höhere Fluoreszenz von sfroGFP2 in den transfizierten Zellen erkennen, was die Sonde (idealerweise in Fusion mit Grx) zu einem wertvollen Kandidaten für zukünftige Studien an kleinen Organismen und subzellulären Kompartimenten macht. Diese höhere Fluoreszenz konnte, wie oben beschrieben, am rekombinanten Protein nicht festgestellt werden, was möglicherweise temperaturbedingt ist und weiterer Untersuchung bedarf. Für das superfolder GFP konnte gezeigt werden, dass es sich im Vergleich zum folding reporter GFP besser faltet und auch geeignet ist, mit Proteinen fusioniert zu werden (Pédelacq *et al.*, 2006).

Mögliche Gründe für die höhere Fluoreszenz in der Zelle könnten sein, dass das Protein besser gefaltet oder weniger abgebaut wird.

In einem *Time-Course-Experiment* wurden erstmals die Sondenfluoreszenz und -menge während des gesamten asexuellen Lebenszyklus von *P. falciparum* betrachtet. Dafür wurden von sehr eng synchronisierten Parasiten alle 5 h eine Probe für einen Western Blot entnommen (Abbildung 25) und zwischen 20-50 h nach Infektion wurden die Parasiten alle 5 h am Mikroskop betrachtet (Abbildung 24). Aufgrund der verbesserten Fluoreszenz des neuen Sensors konnten erstmals deutliche Fluoreszenzsignale für das Ring-Stadium und für Merozoiten detektiert werden. Allerdings waren diese für zuverlässige Messungen des Redox-Status in den verschiedenen Stadien leider zu schwach, da leichte Veränderungen in der Z-Ebene am Mikroskop schon einen Einfluss hatten. Außerdem war für Messungen am Plattenleser die Fluoreszenz in den Ring-Stadien und als Merozoiten zu gering. Mit den aktuellen Möglichkeiten ist der beste Zeitpunkt für eine Redox-Analyse mit den genetisch kodierten roGFP-Sensoren das Trophozoiten-Stadium 25-40 h nach Invasion. Der Western Blot (Abbildung 25) bestätigt diese Ergebnisse, da dort schön zu sehen war, dass in diesem Zeitfenster am meisten sfroGFP2 in den Zellen vorhanden war.

Bevor Messungen mit Wirkstoffen an den Zellen durchgeführt werden, sollte ausgeschlossen werden, dass die Wirkstoffe direkt mit der Sonde interagieren und dadurch die Messungen verfälschen. Für hGrx1-roGFP2 wurde das für einige Wirkstoffe bereits durchgeführt (Kasozi *et al.*, 2013; Mohring *et al.*, 2017). Obwohl durch die neu eingeführten Mutationen bei sfroGFP2 keine Veränderungen zu erwarten waren, wurde dies experimentell überprüft und bestätigt. Keiner der Wirkstoffe zeigte selbst nach 24 h Inkubation bei pharmakologisch relevanten Konzentrationen einen direkten oxidativen Effekt der Drugs auf den Sensor (Abbildung 20). Die Ergebnisse stimmen mit den bereits veröffentlichten Daten zu rekombinanten hGrx1-roGFP2 überein (Kasozi *et al.*, 2013; Mohring *et al.*, 2017). Die untersuchten Drugs eignen sich bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  für den Einsatz in Kurz- und Langzeitexperimenten in der Zellkultur. Dabei ist zusätzlich anzumerken, dass innerhalb der Parasiten die beobachteten moderaten Wechselwirkungen bei den hohen Konzentrationen wahrscheinlich noch weniger ausgeprägt sind, da mehrere Membranen durchlaufen werden müssen, die Verbindungen abgebaut werden und/oder das Medikament an zelluläre Proteine bindet.

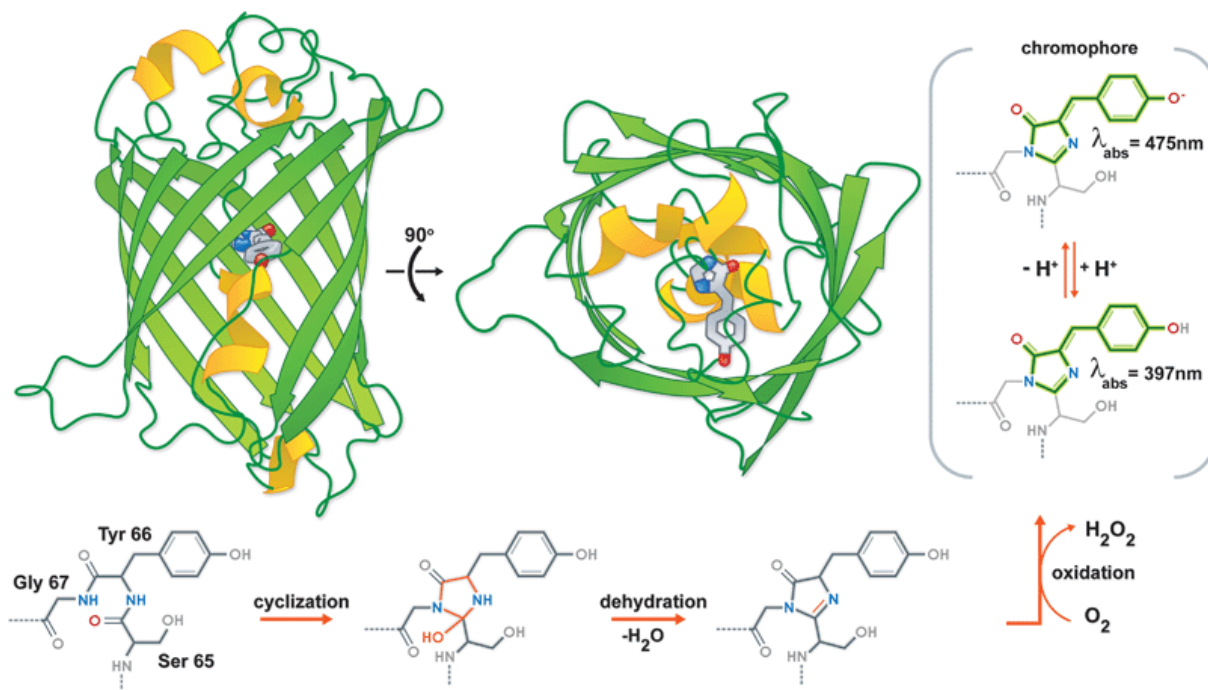
Bei der Untersuchung von Effekten von (antiplasmodialen) Wirkstoffen auf das Redox-Gleichgewicht wurden NF54*attB*-Parasiten, die stabil mit hGrx1-roGFP2 oder sfroGFP2 transfiziert waren, für 4 h (Abbildung 22) oder 24 h (Abbildung 23) inkubiert und dann mittels CLSM und Plattenleser gemessen. Nach vierstündiger Inkubation konnten keine signifikanten oxidativen Effekte durch die Wirkstoffe detektiert werden. Die Ergebnisse waren sowohl für die beiden Detektionsmethoden als auch für beide Sonden sehr ähnlich. Die verwendeten Wirkstoffe scheinen entweder in den verwendeten Konzentrationen im Trophozoiten-Stadium keinen messbaren oxidativen Stress zu produzieren, der von den antioxidativen Kapazitäten nicht abgepuffert werden kann, oder die Einwirkzeit war zu kurz. Nach 24-stündiger Inkubation konnte in den Trophozoiten ein Anstieg des GSH/GSSG-Ratios für MQ und Compound 10 detektiert werden. Der starke Anstieg des Redox-Verhältnisses nach 24-stündiger Inkubation

durch die kürzlich beschriebene Verbindung 1o, ein antiplasmodiales Arylmethylamino-Steroid, weist auf einen Redox-basierten Wirkmechanismus des Medikaments hin und stimmt mit den von Krieg *et al.* (2017) berichteten Daten mit transient transfizierten 3D7-Parasiten überein. Auch der synthetische Wirkstoff MQ zeigte nach 24 h eine oxidierende Wirkung. Hier war die Veränderung des Redox-Verhältnisses bei Detektion mittels Plattenleser, bei der eine ganze Zellpopulation gleichzeitig analysiert werden kann, stärker als bei Detektion mittels CLSM. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass die absolute Zellzahl (die durch die Malariamedikamente beeinträchtigt werden kann) im Plattenlesegerät hoch genug sein muss, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Es empfiehlt sich daher mindestens 1 Mio. Erythrozyten mit 60-80 % Parasitämie pro *Well* (nach magnetischer Anreicherung) zu verwenden und parallel eine Überwachung der Lebensfähigkeit und Morphologie der Parasiten am Mikroskop durchzuführen. Eine Erhöhung des Redox-Verhältnisses der hGrx1-roGFP2-Sonde nach 4 h und 24 h Inkubation mit MQ wurde bereits von Kasozi *et al.* (2013) für den Stamm *P. falciparum* 3D7 beschrieben. Da der Wirkmechanismus von MQ (einer Verbindung, die strukturell mit QN und CQ verwandt ist) noch nicht vollständig verstanden ist, wäre es interessant, die durch das Medikament induzierten Zeit-, Konzentrations-, Stamm- und Kompartiment-abhängigen Redox-Änderungen zu untersuchen. In der Arbeit von Kasozi *et al.* (2013) wurden stammspezifisch oxidierende Effekte von ATS auf *P. falciparum* 3D7- und Dd2-Parasiten, die episomal mit hGrx1-roGFP2 transfiziert waren, beobachtet. Diese Beobachtung konnte hier nach Inkubation mit ATS nicht gemacht werden und es kam nicht zu einer Erhöhung des zytosolischen Fluoreszenzverhältnisses der Sonden.

Für Hefe wurde beschrieben, dass der zytosolische GSH-Pool sehr konstant gehalten wird und relativ unabhängig von der GSSG-Menge in der Zelle ist (Morgan *et al.*, 2013). GSSG wird dabei von einem Transporter (Ycf1) in einer Vakuole verschoben, um das reduzierende Milieu im Zytosol aufrecht zu erhalten (Morgan *et al.*, 2013). Die Kompartimentierung des Redox-Systems mit seinen redoxaktiven Enzymen wurde von Kehr *et al.* (2010) für *P. falciparum* untersucht. Eine systematische Untersuchung der Ströme von GSSG liegt aber nicht vor und wäre sehr interessant. Möglicherweise existieren auch für *Plasmodium* ähnliche Mechanismen. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung sein, warum wenig oxidierende Effekte mit den Sonden im Zytosol gemessen werden konnten. Eine detaillierte Untersuchung, möglicherweise mit mehreren Sonden gleichzeitig in Organellen und Zytosol, wäre daher zukünftig sehr interessant.

#### 5.2.4 Kristallstruktur von sfroGFP2

Zur detaillierten Betrachtung der Struktur und der möglichen Veränderungen des Proteins durch die neu eingeführten Mutationen wurde sfroGFP2 kristallisiert. Die Kristallstrukturen von GFP (Ormö *et al.*, 1996), roGFP2 (Hanson *et al.*, 2004) und superfolder GFP (Pédelacq *et al.*, 2006) sind bereits bekannt und können zum Vergleich herangezogen werden. Über ein Roboter-assistiertes Screening konnten passende Bedingungen gefunden werden und die Kristalle waren durch ihre Gelbfärbung gut zu erkennen. Mit 1,1 Å war die Auflösung der orthorhombischen Kristalle sehr gut.



**Abbildung 41: Struktur von avGFP und des Chromophors.** Die AS Ser 65, Tyr 66 und Gly 67 bilden durch intramolekulare Zyklisierung unter Abspaltung von Wasser das Chromophor. Im deprotonierten Zustand liegt das Absorptionsmaximum bei 475 nm und im protonierten Zustand bei 397 nm (Frommer *et al.*, 2009).

Das zugrundeliegende wtGFP aus *Aequorea victoria* wurde bereits vielfach und detailliert in seinen Eigenschaften untersucht und beschrieben (zum Beispiel in Chatteraj, King, Bublitz, & Boxer, 1996; Henderson *et al.*, 2009; Remington, 2011; Shu *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2018). Es hat zwei Absorptionsbanden bei  $\sim 395\text{ nm}$  (A-band, neutral) und  $475\text{ nm}$  (B-band, Anion). Diese Banden entstehen durch das Gleichgewicht zwischen neutralen (Tyr des Chromophors hat OH-gruppe) und anionischen Chromophorformen (Tyr hat  $\text{O}^-$ ) (siehe auch Abbildung 41). Von dieser Eigenschaft profitieren die GFP-basierten ratiometrischen Redox-Sensoren, bei denen an zwei benachbarten  $\beta$ -Strängen auf der Außenseite des  $\beta$ -Barrels in der Nähe des Chromophors zwei Cysteine eingeführt wurden (Hanson *et al.*, 2004; Remington, 2011). Durch Oxidation wird zwischen diesen beiden Cysteinen eine Disulfidbrücke ausgebildet. Dies verändert leicht die Struktur des  $\beta$ -Barrels und reduziert die Zugänglichkeit des Chromophors, was zu einer Veränderung des Spektrums hin zu einer Blauverschiebung führt. Reduktions-Oxidations-sensitive GFPs (roGFPs) passen sich schnell dem lokalen Thiol-Disulfid-Gleichgewicht an, was sich in einer Änderung im Anregungsspektrum zeigt (Remington, 2011).

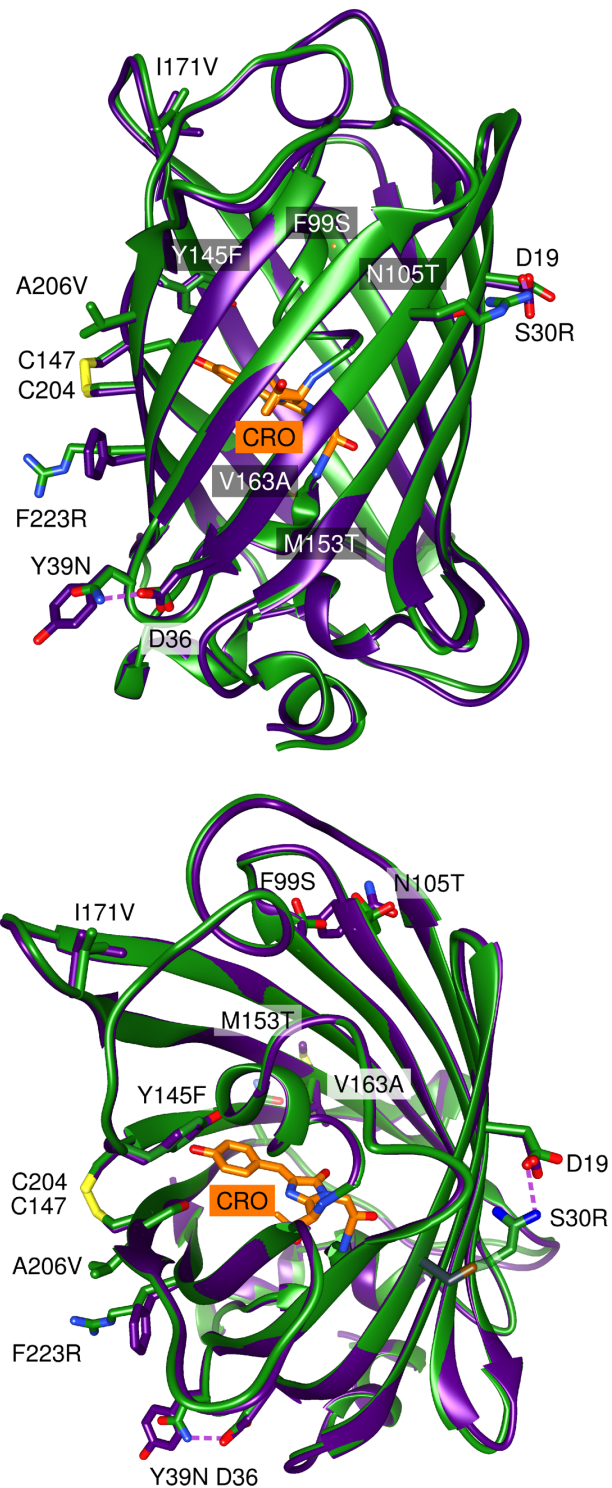
Abbildung 42 zeigt in einer überlagerten Ansicht die bereits bekannte Struktur von roGFP2 (in Violett dargestellt) und die neu gelöste Struktur von sroGFP2 (in Grün dargestellt). Beide Strukturen ähneln einander sehr und die meisten der veränderten AS liegen auf der Außenseite des elfsträngigen  $\beta$ -Barrels. Da die Tertiärstruktur bei der Bildung des Chromophors und seinen photophysikalischen Eigenschaften eine wichtige Rolle spielt, variiert diese auch unter weiteren Fluoreszenzproteinen wenig (Craggs, 2009). Tabelle 18 fasst die in sroGFP2 enthaltenen Mutationen und deren Herkunft zusammen.

**Tabelle 18: Übersicht der Mutationen in sfroGFP2.**

Klassifikation	Mutationen
roGFP2 Mutationen (Dooley <i>et al.</i> , 2004; Hanson <i>et al.</i> , 2004)	C48S, (F64L), S65T, S147C, Q204C
“superfolding” Mutationen, inklusive der folding-enhancing mit den enhanced-GFP und <i>Cycle-3</i> -GFP Mutationen (Pédelacq <i>et al.</i> , 2006)	S30R, Y39N, F64L & S65T ( <i>die bereits in roGFP2 enthalten sind</i> ), F99S, N105T, Y145F, M153T, V163A, I171V, A206V
roTurbo (Dooley <i>et al.</i> , 2012)	F223R (ohne A206K)
GFP-spezifische Mutationen, die in verschiedenen GFPs verbreitet sind	L68V, A72S, Q80R

Alle neu eingeführten Mutationen außer Y145F liegen auf der Außenseite der Faltblätter. Mögliche leichte Veränderungen in der Struktur könnten durch eine Wasserstoffbrücke zwischen S30R und D19 oder Y39N und D36 entstehen. Für das superfolder GFP wurde berichtet, dass die S30R-Mutation die Bildung eines ausgedehnten elektrostatischen Netzwerks unter Beteiligung der Aminosäurereste E115, R122, E17, R30 und E32 vermittelt. Durch Y39N-Mutation entsteht eine Wasserstoffbrücke zwischen einem Seitenkettensauerstoff von D36 und der NH<sub>2</sub>-Seitenkette von Asparagin, welche die Schleife zwischen zwei  $\beta$ -Strängen verändert (Pédelacq *et al.*, 2006) und das Protein stabilisiert und zu schneller Faltung führt (Jackson *et al.*, 2006; Pédelacq *et al.*, 2006). Durch den Austausch von Tyrosin zu Phenylalanin an der Position 145 in der Nähe des Chromophors fällt eine OH-Gruppe weg. Dies hat aber keinen erkennbaren Einfluss auf die Lage des Chromophors, könnte aber die Aggregation vermindern (Craggs, 2009; Jackson *et al.*, 2006). Um die Mutationen und deren Effekte isoliert und im Detail zu studieren, sollen Mutanten von sfroGFP2 mit zielgerichteter Veränderung einzelner AS hergestellt werden, deren Kristallstruktur dann möglicherweise weitere Einblicke liefert. Zusätzlich wäre eine Struktur von (sf)roGFP2 gekoppelt mit hGrx1 interessant zu untersuchen. Bisher gelang es aber nicht, dieses Protein in der Fusion zu kristallisieren.

Da der Kristall unter weißem Licht gezüchtet wurde, liegt das Glutamat an Position 222 decarboxyliert vor. Das Licht induziert dabei einen oxidativen Zustand während des *Excited-State Proton Transfer* (ESPT). Dabei nimmt das Chromophor ein Elektron des ionisierten E222-Rests auf, was zur Radikalbildung führt. Aufgrund der Instabilität wird das Glutamat dann schnell decarboxyliert. Diese Reaktion könnte aber auch bei der Röntgenstrukturanalyse erfolgen (Bell *et al.*, 2003; Craggs, 2009; Van Thor *et al.*, 2002).



**Abbildung 42: Vergleich der Strukturen von roGFP2 und sfroGFP2.** Die Abbildung zeigt die bereits bekannte Struktur von roGFP2 (in Violett dargestellt) im Overlay mit der neu gelösten Struktur von sfroGFP2 (in Grün dargestellt). Das Chromophor (CRO) ist in Orange dargestellt, die redox-sensitiven Cysteine C147 und C204 (in Gelb dargestellt) und die im sfroGFP2 veränderten AS wurden gelabelt. AS auf der Rückseite des  $\beta$ -Barrels sind im Bild oben grau hinterlegt.

### 5.2.5 Fazit und weitere Anwendungsmöglichkeiten genetisch kodierter Fluoreszenz-basierter Sonden

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Redox-Biosensoren hGrx1-roGFP2 und sfroGFP2 sowohl empfindliche als auch geeignete Instrumente zur Untersuchung der Redox-Homöostase im Zytosol von *P. falciparum* sind. Mit der stabilen Integration wurden Probleme mit episomal transfizierten Parasitenlinien, bei denen einige Parasiten Resistenzen gegen Selektionsmedikamente entwickeln können, wodurch sie ihr Plasmid und die Expression der Fluoreszenzsonde verlieren, überwunden. Die verbesserten Fluoreszenzniveaus von sfroGFP2 werden voraussichtlich von erheblichem Nutzen für Forscher sein, die mit kleinen Organismen oder in Organellen arbeiten. Für weitere Messungen mit den Sonden eignet sich besonders hGrx1-sfroGFP2, da dieses die bessere Fluoreszenz des sfroGFP2 mit den Vorteilen einer Grx-Kopplung verbindet und damit auch sehr gut für Messungen in Grx-freien subzellulären Kompartimenten geeignet ist.

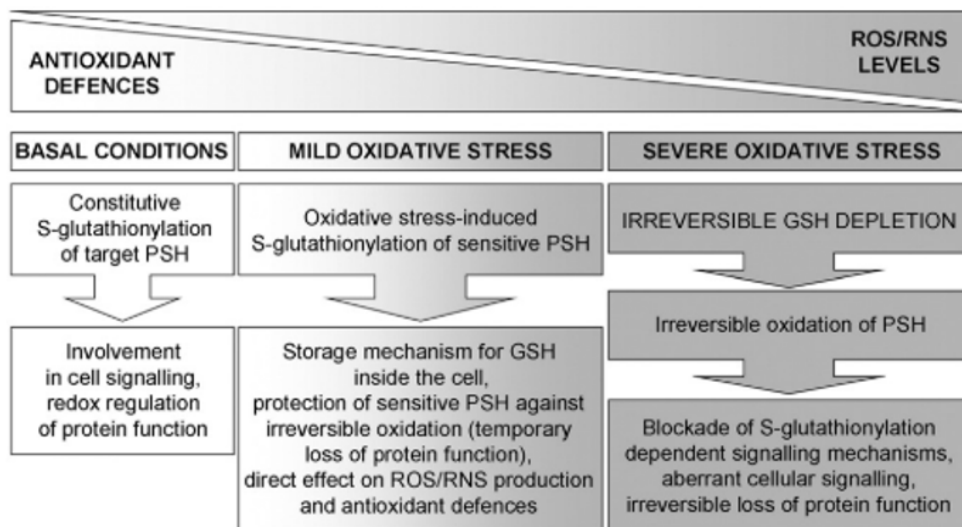
Sowohl die bereits bestehende Detektionsmethode am konfokalen Mikroskop als auch die neu etablierte Methode am Plattenleser haben ihre jeweiligen Vor- und Nachteile. Für die Zukunft wäre es von besonderem Interesse, durchflusszytometrische Messungen und andere potenziell mit Hochdurchsatz kompatible Techniken an roGFP2 transfizierten Parasiten (und für weitere Organismen) zu etablieren, um detaillierte Analysen einer ganzen Zellpopulation zu ermöglichen. Das Durchflusszytometer kombiniert die Vorteile der Messung einzelner Zellen mit dem zeiteffizienten Messen und Auswerten von Tausenden oder Millionen von Zellen. Da die Messungen mittels Durchflusszytometer sehr sensitiv sind, ist möglicherweise auch eine Messung in den einzelnen Stadien oder auch in Organellen möglich, was bisher am Plattenleser aufgrund zu geringer Fluoreszenz nicht durchführbar war. Dies könnte ganz neue Einblicke gewähren, da bekannt ist, dass bestimmte Wirkstoffe wie ART und Plasmodione schon in den Ring-Stadien wirken (Ehrhardt *et al.*, 2016; White, 2008). Neben den Sonden zur Bestimmung des Glutathion-abhängigen Redox-Potentials sind schon länger auch Sonden zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Messung verfügbar und auch für *P. falciparum* etabliert (Rahbari, Rahlfs, Jortzik, *et al.*, 2017). Aktuell wird auch an der Etablierung weiterer Sonden, zum Beispiel iNAP zur Messung von NADP(H) (Tao *et al.*, 2017), NAD(H) (Bilan & Belousov, 2016; Zhao *et al.*, 2015) und ATP (Imamura *et al.*, 2009; Lobas *et al.*, 2019), gearbeitet. Auch für diese wird die Detektion am Plattenleser oder vielleicht zukünftig auch am Durchflusszytometer vorteilhaft sein. Durch Fusion der Sonden an Fluoreszenzproteine unterschiedlicher Wellenlängen könnte man auch mehrere Sonden gleichzeitig in die Zellen einbringen und parallel beobachten.

Von Hefe weiß man, dass GSSG schnell aus dem Zytosol abtransportiert wird, um das reduzierende Milieu aufrechtzuerhalten (Morgan *et al.*, 2013). Durch den Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzproteine für unterschiedliche Zellkompartimente, zum Beispiel durch Kopplung an Protein anderer Farbspektren, könnte man so vielleicht genauer studieren, wie die Ströme und Signale in der Zelle fließen und die intrazelluläre Redox-Homöostase aufrechterhalten wird. Eine weitere Einsatzmöglichkeit der Sonden könnte eine Transfektion in humane Leberzellen sein, womit man z.B. den Redox-Status bei Infektion mit Sporozoiten beobachten könnte. Hierzu wurden auch im Rahmen dieser Arbeit bereits erste Versuche einer lentiviralen Transduktion von Huh7-Zellen unternommen, die derzeit weiterverfolgt werden.



### 5.3 SILAC zur Untersuchung von Veränderungen der Glutathionylierungsprofile als Antwort auf oxidativen Stress

Für das SILAC-Experiment sollten geeignete Bedingungen an oxidativem Stress gefunden werden, die idealerweise zu einer differentiellen Glutathionylierung und Sulfenylierung (Dissertation von Susanne Schipper) führen. Für eine kontinuierliche Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wurde die Glukose-Oxidase ausgewählt, die unter Verbrauch von Sauerstoff und Wasser Glukose zu D-Glucono- $\delta$ -lacton und  $H_2O_2$  umwandelt. In Vollkultur sind die Parasiten selbst umgeben von Erythrozyten, die mit 2 mM GSH ein reduzierendes Milieu aufweisen. Deshalb wurde eine kontinuierliche Produktion von  $H_2O_2$  einer einmaligen Zugabe von  $H_2O_2$  vorgezogen, da man eine sehr hohe Dosis benötigt hätte, um Stress in den Parasiten zu erzeugen. Glutathionylierung entsteht auch physiologischerweise und ohne massiven oxidativen Stress in Zellen und ist in Zellkommunikation und Redox-Regulierung involviert (Abbildung 43). Abbildung 33 B zeigt, dass auch im *P. falciparum* Zelllysat unbehandelter Parasiten glutathionylierte Proteine vorliegen. Unter oxidativem Stress durch GOD kam es zu einer vermehrten Glutathionylierung. Die beschriebenen Funktionen von Protein-S-Glutathionylierung bei mildem oxidativem Stress sind das Speichern von GSH sowie der Schutz sensibler SH-Gruppen an Proteinen vor Überoxidation und damit Schutz vor Verlust der Proteinfunktion (Abbildung 43). Die Glutathionylierung kann dabei direkt über GSSG oder über eine reaktive Sulfensäure und GSH entstehen (Dalle-Donne *et al.*, 2007).



**Abbildung 43: Die Rolle von Protein-S-Glutathionylierung unter basalen Bedingungen und unter oxidativem Stress.** Neben ihrer Funktion bei der Signaltransduktion und bei der Redox-Regulation kann die Glutathionylierung unter physiologischen Bedingungen Proteine vor irreversibler Oxidation von SH-Gruppen schützen und als Speicher für GSH dienen (Dalle-Donne *et al.*, 2007).

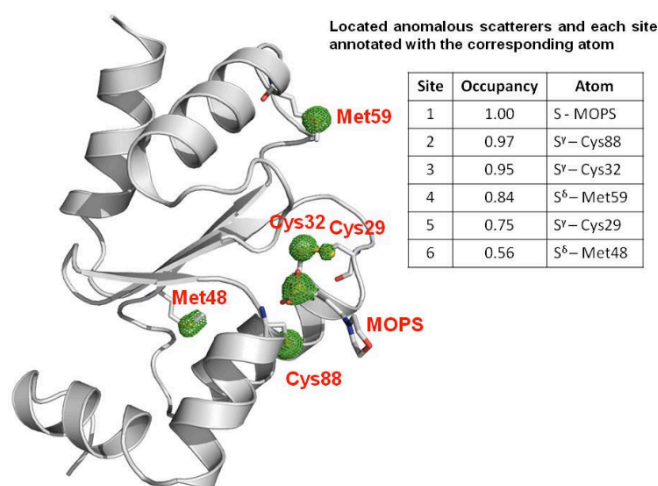
Die Identifikation glutathionylierter Proteine durch einen vorherigen Deglutathionylierungsschritt mit Grx wurde zuvor schon beschrieben (Lind *et al.*, 2002; Reynaert *et al.*, 2006) und als vielversprechendste Methode zur Identifikation glutathionylierter Proteine bewertet (Mieyal & Chock, 2012). In der Arbeit von Kehr *et al.* (2011), dessen Protokoll diesem Experiment zugrunde liegt, wurde für das Hauptexperiment *PfGrx1* verwendet. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Experiment mit der *PfGrx1*<sup>C32S</sup>-Mutante durchgeführt, die spezifischer für die

Deglutathionylierung ist und bei der tatsächlich weniger Proteine identifiziert wurden. Deshalb wurde in dieser Arbeit diese Mutante zur Deglutathionylierung verwendet. Als weitere Kontrolle wurde die Zahl der unspezifisch an das Säulenmaterial bindenden Proteine getestet, die bei Kehr *et al.* bei 13 Proteinen lag. In dieser Arbeit wurden in den sechs relevanten Proben zwischen 7 und 76 Proteine gefunden. Ein Unterschied im Protokoll war jedoch, dass bei Kehr *et al.* nur die Blockierung mit NEM stattfand und in der vorliegenden Arbeit alle Schritte gemäß dem *Pulldown*-Protokoll durchgeführt wurden und statt in DMSO-gelöstes Biotinmaleimid nur DMSO zugegeben wurde. Möglicherweise erhöht die Zugabe von DMSO die unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial. Die zum Teil sehr hohe, vor allem aber stark variierende Anzahl an Proteinen in den Kontrollen ohne Deglutathionylierungsschritt war unerwartet, wurde aber bereits von Kehr *et al.* (2011) und auch bei Vortests für dieses Experiment beobachtet. Bei detaillierter Betrachtung sieht man aber, dass in diesen Proben wenige, mit Biotinmaleimid modifizierte, plasmodiale Proteine vorlagen. Mögliche Gründe für eine hohe Anzahl von Proteinen, die ohne vorherige Glutathionylierung trotzdem nach dem *Pulldown* in der MS gefunden werden, könnten sein, dass sie generell „*highly abundant*“ sind, also in großen Mengen im Parasiten vorkommen, oder dass sich während der Verarbeitung Disulfidbrücken geöffnet haben, Cysteinreste nicht vollständig durch NEM blockiert waren oder die Proteine an glutathionylierte Proteine gebunden vorlagen und durch die Waschschrte nicht entfernt wurden. In dieser Auswertung wurden deshalb nur diejenigen Proteine näher betrachtet, für die eine Cysteinmodifikation mit Biotinmaleimid eindeutig nachgewiesen wurde und bei welchen damit vorher sehr wahrscheinlich eine Glutathionylierung vorlag.

Als interessantes und wichtiges differentiell reguliertes Redoxprotein wurde das *PfTrx1* gefunden, das an C43 mit Biotinmaleimid modifiziert war und zuvor vermutlich eine Glutathionylierung an diesem Cystein enthielt. Thioredoxine sind ubiquitäre Proteine, die in allen Organismen vorkommen und an der Erhaltung des intrazellulären Redox-Gleichgewichts beteiligt sind (Tiwari *et al.*, 2021). Im Genom von *P. falciparum* wurden drei Trx-Isoformen identifiziert (Kawazu *et al.*, 2010). *PfTrx1* liegt zytosolisch vor (Kehr *et al.*, 2010), ist das physiologische Substrat der *P. falciparum*-Thioredoxinreduktase (Fritz-Wolf *et al.*, 2013) und interagiert unter anderem mit Proteinen, die an Transkription und Translation, Signaltransduktion, Proteinfaltung, Glykolyse und Hämoglobinabbau beteiligt sind (Tiwari *et al.*, 2021). Es besitzt drei Cysteine, von denen C30 und C33 die beiden *active site* Cysteine sind. Eine Modifikation an C43 könnte aufgrund der räumlichen Nähe auch eine Bindung an die Thioredoxin-Reduktase verändern. Außerdem wurde C43 schon als Ziel der S-Nitrosierung in *Plasmodium* beschrieben (Wang *et al.*, 2014). Dabei wird dem C43 eine besondere Rolle als Ziel für die S-Nitrosierung zugeschrieben, da eine Mutante ohne die beiden *active site* Cysteine (*PfTrx1*<sup>C30S/C33S</sup>) konzentrationsabhängig nitrosiert wurde. Dies wurde zusätzlich dadurch bestätigt, dass die *PfTrx1*<sup>C43S</sup> auch bei hohen GSNO-Konzentrationen nicht nitrosiert wurde (Wang *et al.*, 2014). Ob ähnliche Effekte durch eine Glutathionylierung am C43 verursacht werden, ist zu untersuchen. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zu sulfenylierten Proteinen in *P. falciparum* konnte *PfTrx1* nicht als sulfenyliert gefunden werden, jedoch aber die Thioredoxin-Reduktase (Schipper *et al.*, 2021). Für das humane Trx konnte auch eine Glutathionylierung außerhalb der *active site* Cysteine (C31 und C34) an einem der drei

strukturellen Cysteine (C72) gezeigt werden. Diese Glutathionylierung führte zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität des rekombinanten Proteins (Casagrande *et al.*, 2002).

Außerdem konnte für ein weiteres Redoxprotein, das *PfGrx1*, eine Glutathionylierungsstelle (C88) gefunden werden. *PfGrx1* liegt zytosolisch vor (Kehr *et al.*, 2010), hat ein klassisches CxxC-*active-site*-Motiv ( $^{29}\text{CPYC}^{32}$ ) (Rahlfs *et al.*, 2001) und zeigt in der Struktur eine typische Glutaredoxin/Thioredoxin-Faltung mit einem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt und fünf  $\alpha$ -Helices (Yogavel *et al.*, 2014). Abbildung 44 zeigt die Struktur *PfGrx1* mit seinen drei Cysteinen, wobei die räumliche Nähe von C88 zu den beiden *active-site*-Cysteinen deutlich sichtbar ist und C88 eine Disulfidbrücke mit C32 bilden kann (Djuika *et al.*, 2013).



**Abbildung 44: Struktur von *PfGrx1*.** Die beiden *active site*-Cysteine C29 und C32 bilden hier eine Disulfidbrücke. C88 befindet sich in räumlicher Nähe dazu (Yogavel *et al.*, 2014).

Hier ist jedoch zu beachten, dass während der Probenaufbereitung *PfGrx1*<sup>CSC</sup> hinzugegeben wird. Es könnte sich auch um eine Kontamination handeln. Eine reversible Glutathionylierung von Grx konnte jedoch auch schon für den parasitären Helminthen *Fasciola gigantica* gezeigt werden (Gupta *et al.*, 2017).

Generell können durch dieses Experiment nur glutathionylierte Proteine gefunden werden, die von Grx deglutathionyliert werden können. Dadurch, dass nur Proteine näher betrachtet wurden, für die ein modifiziertes Cystein in der MS gefunden wurde (29 Stück), ist die Anzahl der Proteine deutlich geringer als bei Kehr *et al.* (2011), aber ähnlich wie bei Lind *et al.* (2002), die ein vergleichbares Protokoll nutzten und 43 zelluläre Proteine als Ziel der S-Glutathionylierung in immortalisierten ECV304 Zellen fanden. Für humane T-Lymphozyten konnten nach oxidativem Stress 38 glutathionylierte Proteine (Fratelli *et al.*, 2002) und 15 glutathionylierte Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden werden (Shenton & Grant, 2003). Für die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde mittels einer Methode, die biotinyliertes GSH nutzte, jedoch 225 Proteine identifiziert (Zaffagnini *et al.*, 2012), mit einer weiteren Methode ( $^{35}\text{S}$ -Cystein-Markierung) allerdings nur 25 (Michelet *et al.*, 2008).

Unter den modifizierten Proteinen im SILAC-Experiment war auch FIKK8, eine Serin-/Threonin-Kinase, vertreten, die an zwei unterschiedlichen Cysteinen modifiziert war (Tabelle 16). Die *Apicomplexa*-spezifischen FIKK-Kinasen enthalten eine typische katalytische Kinase-

Domäne mit den hochkonservierten Regionen, die am Phosphotransfer, dem Aminosäure-Targeting und der Katalyse beteiligt sind, obwohl ihnen eine glycinreiche Schleife zur ATP-Verankerung in der Subdomäne I fehlt (Nunes *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2004). Die Familie der FIKK-Kinasen, die in allen Malariaparasiten vorkommt, ist nach einem vier Aminosäuren umfassenden Phe-Ile-Lys-Lys-Sequenzmotiv benannt, das sie gemeinsam haben (Lin *et al.*, 2017). Der Versuch, das Gen des FIKK8-Orthologs in *Plasmodium berghei* (PbFIKK8) zu disruptieren, war nicht erfolgreich und könnte darauf hindeuten, dass FIKK8 essentiell für die Zellzyklusregulation bei *Plasmodium*-Parasiten sein könnte (Osman *et al.*, 2015). Die Glutathionylierung eines Cysteins in der katalytischen Domäne kann die Bindung von ATP und damit die Kinase-Aktivität beeinträchtigen (Anselmo & Cobb, 2004). Obwohl die Kinase durch die Glutathionylierung möglicherweise vorübergehend inaktiviert wird, könnte die Modifikation wichtig für die Stabilität, zum Schutz vor Hyperoxidation oder die Aktivität der Kinase sein (Corcoran & Cotter, 2013). Kinasen sind für *Plasmodium* besonders interessante *Drug Targets*, da viele von ihnen zu keiner der benannten eukaryotischen Proteinkinasen gehören (*Orphan Kinases*). Diese Divergenz stellt einen interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente dar (Jaijyan *et al.*, 2016; Lucet *et al.*, 2012).

#### 5.4 GFP-Pulldown der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner und deren Veränderung durch (Redox-)Stress

Dass Kinasen ein vielversprechender Angriffspunkt zur Bekämpfung von Erkrankungen sind, zeigen die Erfolge, die in der Krebsmedizin durch Kinase-Inhibitoren in den letzten Jahren erzielt wurden (Fabbro *et al.*, 2012; Otto & Sicinski, 2017; Jianming Zhang *et al.*, 2009). Mit nur etwa 85 Proteinkinasen und etwa 30 Phosphatasen ist das Kinom und Phosphatom von *P. falciparum* deutlich kleiner als das humane, das >500 Proteinkinasen und >200 Phosphatasen umfasst (Dorin-Semlat *et al.*, 2015).

Beim *Pulldown* der glutathionylierten Proteine aus *P. falciparum*-Zelllysat von Kehr *et al.* (2011) wurden auch Kinasen, unter anderem die CK1, CK2, Pyruvatkinase (PK) und die Hexokinase gefunden (Kehr *et al.*, 2011). Dies wirft die Frage auf, ob die Glutathionylierung eine regulatorische Funktion hat und inwieweit posttranslationale Modifikationen im *Cross Talk* miteinander stehen und sich gegenseitig beeinflussen und/oder regulieren (Corcoran & Cotter, 2013). Die Kinase-Aktivität wird normalerweise über (De-)Phosphorylierung reguliert. Inwieweit sich zusätzliche Redox-Modifikationen wie Glutathionylierung, Nitrosylierung und Sulfenylierung auf die Aktivität und das Zusammenspiel der Regulation von Kinasen in *Plasmodium* auswirken, ist wenig bekannt. In einem Kooperationsprojekt mit der Gruppe von Prof. Doerig sollte diese Frage weiter untersucht werden. Ein Teilaspekt dieser Forschungskooperation war die Frage, ob sich die Interaktionspartner von Kinasen durch (Redox-)Stress ändern. Hierzu wurde ein *Pulldown* mit einer GFP-getaggten Kinase, der PfCK1, und ihren Interaktionspartnern durchgeführt. Als Stressbedingungen wurden die Inkubation mit Glukose-Oxidase, ART und einem Kinase-Inhibitor (V116832) gewählt.

Die CK1 ist in eukaryotischen Organismen evolutionär konserviert (Cheong & Virshup, 2011). Bei Säugetieren sind sieben Isoformen bekannt (Knippschild *et al.*, 2005). CK1 umfasst eine Familie von monomeren Serin/Threonin (Ser/Thr)-selektiven Proteinkinasen, welche an der

Regulation verschiedener Prozesse wie DNA-Replikation, zirkadianer Rhythmus und am Wnt-Signalweg beteiligt sind (Cheong & Virshup, 2011). In *P. falciparum* gibt es eine CK1-Isoform (Talevich *et al.*, 2012), die PfCK1, die 59-69 % Übereinstimmung mit der humanen Sequenz teilt (Barik *et al.*, 1997). Die PfCK1 wird in allen Stadien des parasitären Lebenszyklus exprimiert (Dorin-Semlat *et al.*, 2015) und ist sehr wahrscheinlich essentiell für den asexuellen Lebenszyklus (Solyakov *et al.*, 2011). Außerdem wird sie in die Erythrozyten exportiert (Batty *et al.*, 2020).

Die Etablierung des Protokolls zum *Pulldown* der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner bedurfte einiger Optimierungen, bis schließlich mit einem kommerziellen Kit und einer *On-Bead-Digestion* vor der MS ein passendes Protokoll etabliert wurde. Abbildung 36 zeigt das Elutionsprofil der PfCK1 und ihrer Interaktionspartner. Im Western Blot (Abbildung 36 B) zeigte sich die erwartete 63 kDa Bande (Dorin-Semlat *et al.*, 2015), die sich aus der 36 kDa großen CK1 und dem 27 kDa großen GFP-Tag zusammensetzt. Bei etwa 27 kDa ist eine zusätzliche Bande zu sehen, die durch nicht-fusioniertes GFP zu erklären ist. Bei der MS-Analyse der präzipitierten Proteine wurden für alle vier Behandlungen (Kontrolle, ART, GOD und VI16832) fast immer die gleichen Proteine gefunden (Abbildung 37). Um zu vergleichen, welche Unterschiede sich durch die Behandlungen ergaben, wurde eine Heatmap erstellt, welche die am stärksten differentiell identifizierten Proteine zeigt (Abbildung 38). Insgesamt waren die drei biologischen Replikate leider nicht sehr einheitlich. Um belastbare Aussagen zu treffen, sollten weitere Experimente mit *Labeling*, zum Beispiel SILAC *Labeling* oder *Tandem Mass Tags*, zur Ermöglichung quantitativer Vergleiche durchgeführt werden, um hier signifikante Ergebnisse zu erzielen. In den vorliegenden Proben zeigte sich für die Behandlung mit ART die deutlichste Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 38), die besonders die Proteine der 40S- und 60S-Untereinheit betrafen.

Tabelle 17 listet die Proteine mit ihrer Annotation und Abbildung 39 zeigt die Klassifizierung nach Proteinklasse und molekularer Funktion. Der Großteil der Proteine ist an der Translation beteiligt, wobei Proteine der 40S- und 60S-Untereinheit besonders prominent waren (Tabelle 17). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Dorin-Semlat *et al.* (2015), die diese Proteine auch als Interaktionspartner der PfCK1 identifizierten, ebenso wie Histon H4 und Untereinheiten des 26S Proteasoms. Jedoch werden in der *Protein Abundance Database* auch einige der gefundenen Proteine, darunter Elongation factor 1-alpha, Histon H4, HSP 70 und das Ubiquitin-60S Ribosomal Protein L40, unter den Top 5 % der *highly abundant* Proteine gelistet. Andere *highly abundant* Proteine wie beispielweise die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden hier jedoch nicht gefunden (PaxDb, 2021). Insgesamt liefern die Ergebnisse erste Anhaltspunkte dafür, dass sich das Interaktom der CK1 in *P. falciparum* unter oxidativem bzw. pharmakologischem Stress ändert. Um valide Aussagen zu treffen, sind jedoch weitere Experimente, die eine bessere Quantifizierbarkeit erlauben, nötig.

## 6 REFERENZEN

- Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, Rosenthal PJ, & D'Alessandro U (2011) Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10, 144.
- Adams PD, Afonine P V., Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, & Zwart PH (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66, 213–221.
- Adjalley SH, Lee MCS, & Fidock DA (2010) A method for rapid genetic integration into *Plasmodium falciparum* utilizing mycobacteriophage Bxb1 integrase. *Methods in Molecular Biology*, 634, 87–100.
- Akoachere M, Buchholz K, Fischer E, Burhenne J, Haefeli WE, Schirmer RH, & Becker K (2005) In vitro assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4592–4597.
- Albrecht SC, Barata AG, Großhans J, Teleanu AA, & Dick TP (2011) In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. *Cell Metabolism*, 14, 819–829.
- Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe C V., Rodríguez MH, Sinden R, Slutsker L, & Tanner M (2011) A research Agenda to underpin Malaria Eradication. *PLoS Medicine*, 8.
- Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113, 548–555.
- Anselmo AN, & Cobb MH (2004) Protein kinase function and glutathionylation. *The Biochemical Journal*, 381, 1–2.
- Barik S, Taylor RE, & Chakrabarti D (1997) Identification, cloning, and mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Stage-specific expression of the gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 26132–26138.
- Batty MB, Schittenhelm RB, Dorin-Semblat D, Doerig C, & Garcia-Bustos JF (2020) Interaction of *Plasmodium falciparum* casein kinase 1 with components of host cell protein trafficking machinery. *IUBMB Life*, 72, 1243–1249.
- Becker K, Gui M, Traxler A, Schirmer RH, & Kirsten C (1994) Redox processes in malaria and other parasitic diseases - Determination of intracellular glutathione. *Histochemistry*, 102, 389–395.
- Becker K, Rahlfs S, Nickel C, & Schirmer RH (2003) Glutathione - Functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biological Chemistry*, Vol. 384, pp. 551–566.
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, & Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: Host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, 34, 163–189.
- Bell AF, Stoner-Ma D, Wachter RM, & Tonge PJ (2003) Light-driven decarboxylation of wild-type green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 6919–6926.

- Bilan DS, & Belousov V V (2016) Genetically encoded probes for NAD<sup>+</sup>/NADH monitoring. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 32–42.
- Birk J, Ramming T, Odermatt A, & Appenzeller-Herzog C (2013) Green fluorescent protein-based monitoring of endoplasmic reticulum redox poise. *Frontiers in Genetics*, 4.
- Blasco B, Leroy Di, & Fidock DA (2017) Antimalarial drug resistance: Linking Plasmodium falciparum parasite biology to the clinic. *Nature Medicine*, 23, 917–928.
- Böhme CC, Arscott LD, Becker K, Schirmer RH, & Williams CH (2000) Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite Plasmodium falciparum. Comparison with the human enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 37317–37323.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, & Krause KH (2012) Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142.
- Buchholz K, Putrianti ED, Rahlfs S, Schirmer RH, Becker K, & Matuschewski K (2010) Molecular genetics evidence for the in vivo roles of the two major NADPH-dependent disulfide reductases in the malaria parasite. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 37388–37395.
- Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massignan T, Salmona M, Chang G, Holmgren A, & Ghezzi P (2002) Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9745–9749.
- CDC (2020) CDC - Malaria Worldwide - Impact of Malaria. Retrieved April 19, 2020, from [https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/impact.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html)
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, & Prasher DC (1994) *Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression*. 263.
- Chattoraj M, King BA, Bublitz GU, & Boxer SG (1996) Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 8362–8367.
- Chayen NE, & Saridakis E (2008) Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5, 147–153.
- Chen W, Seefeldt T, Young A, Zhang X, Zhao Y, Ruffolo J, Kaushik RS, & Guan X (2012) Microtubule S-glutathionylation as a potential approach for antimetabolic agents. *BMC Cancer*, 12, 245.
- Cheong JK, & Virshup DM (2011, April 1) Casein kinase 1: Complexity in the family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 43, pp. 465–469 Elsevier Ltd.
- Chung HS, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, & Van Eyk JE (2013) Cysteine oxidative posttranslational modifications: Emerging regulation in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 112, 382–392.
- Cociorva D, L. Tabb D, & Yates JR (2006) Validation of Tandem Mass Spectrometry Database Search Results Using DTASelect. *Current Protocols in Bioinformatics*, 16.
- Cockburn IA, & Seder RA (2018) Malaria prevention: from immunological concepts to effective vaccines and protective antibodies. *Nature Immunology*, 19, 1199–1211.
- Corcoran A, & Cotter TG (2013) Redox regulation of protein kinases. *FEBS Journal*, 280, 1944–1965.
- Cowman AF, Healer J, Marapana D, & Marsh K (2016) Malaria: Biology and Disease. *Cell*, 167, 610–624.

- Craggs TD (2009) Green fluorescent protein: Structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews*, 38, 2865–2875.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, & Milzani A (2009) Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 34, 85–96.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, & Milzani A (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 883–898.
- Deng J, Erdjument-Bromage H, & Neubert TA (2019) Quantitative Comparison of Proteomes Using SILAC. *Current Protocols in Protein Science*, 95, e74.
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, & Chulay JD (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16, 710–718.
- Dicko A, Roh ME, Diawara H, Mahamar A, Soumare HM, Lanke K, ... Bousema T (2018) Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of *Plasmodium falciparum* transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 18, 627–639.
- Djuika CF, Fiedler S, Schnölzer M, Sanchez C, Lanzer M, & Deponte M (2013) *Plasmodium falciparum* antioxidant protein as a model enzyme for a special class of glutaredoxin/glutathione-dependent peroxiredoxins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830, 4073–4090.
- Doerig C, Rayner JC, Scherf A, & Tobin AB (2015) Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 160–172.
- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, & Tsien RY (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 22284–22293.
- Dooley CT, Li L, Mislser JA, & Thompson JH (2012) Toxicity of 6-hydroxydopamine: Live cell imaging of cytoplasmic redox flux. *Cell Biology and Toxicology*, 28, 89–101.
- Dorin-Semblat D, Demarta-Gatsi C, Hamelin R, Armand F, Carvalho TG, Moniatte M, & Doerig C (2015) Malaria parasite-infected erythrocytes secrete PfCK1, the *Plasmodium* homologue of the pleiotropic protein kinase casein kinase 1. *PLoS ONE*, 10, e0139591.
- Ebersoll S, Bogacz M, Günter LM, Dick TP, & Krauth-Siegel RL (2020) A trypanredoxin-coupled biosensor reveals a mitochondrial trypanothione metabolism in trypanosomes. *ELife*, 9.
- Ehrhardt K, Deregnaucourt C, Goetz AA, Tzanova T, Gallo V, Arese P, Pradines B, Adjalley SH, Bagrel D, Blandin S, Lanzer M, & Davioud-Charvet E (2016) The redox cyler plasmodione is a fast-acting antimalarial lead compound with pronounced activity against sexual and early asexual blood-stage parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 5146–5158.
- Ekland EH, Schneider J, & Fidock DA (2011) Identifying apicoplast-targeting antimalarials using high-throughput compatible approaches. *The FASEB Journal*, 25, 3583–3593.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, & Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66, 486–501.
- Enayati A, & Hemingway J (2010) Malaria Management: Past, Present, and Future. *Annual Review of Entomology*, 55, 569–591.
- Fabbro D, Cowan-Jacob SW, Möbitz H, & Martiny-Baron G (2012) Targeting cancer with small-molecular-weight kinase inhibitors. *Methods in Molecular Biology*, 795, 1–34.
- FBP (2020) *Aequorea victoria* in the Fluorescent Protein Database. Retrieved May 1, 2020,



- from <https://www.fpbases.org/organism/6100/>
- Eachem RGA, Chen I, Akbari O, Bertozzi-Villa A, Bhatt S, Binka F, ... Mpanju-Shumbusho W (2019) Malaria eradication within a generation: ambitious, achievable, and necessary. *The Lancet*, 394, 1056–1112.
- Francis SE, Sullivan DJ, & Goldberg DE (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, 51, 97–123.
- Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Eberini I, Salmons M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E, Bachi A, Vandekerckhove J, Gianazza E, & Ghezzi P (2002) Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3505–3510.
- Fritz-Wolf K, Jortzik E, Stumpf M, Preuss J, Iozef R, Rahlfs S, & Becker K (2013) Crystal Structure of the *Plasmodium falciparum* Thioredoxin Reductase – Thioredoxin Complex. *Journal of Molecular Biology*, 425, 3446–3460.
- Frommer WB, Davidson MW, & Campbell RE (2009) Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, 38, 2833–2841.
- Gallogly MM, & Mieyal JJ (2007) *Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress*. 381–391.
- Ganesan K, Ponmee N, Jiang L, Fowble JW, White J, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y, Wilairat P, & Rathod PK (2008) A Genetically Hard-Wired Metabolic Transcriptome in *Plasmodium falciparum* Fails to Mount Protective Responses to Lethal Antifolates. *PLoS Pathogens*, 4, e1000214.
- Giustarini D, Colombo G, Garavaglia ML, Astori E, Portinaro NM, Reggiani F, Badalamenti S, Aloisi AM, Santucci A, Rossi R, Milzani A, & Dalle-Donne I (2017) Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 360–375.
- Goldberg DE, & Slater AFG (1992) The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitology Today*, 8, 280–283.
- Goody RM, & Walker JCG (1985) *Geowissen KOMPAKT, Atmosphären* (Band 9). Stuttgart: Enke Verlag Stuttgart.
- Grek CL, Zhang J, Manevich Y, Townsend DM, & Tew KD (2013) Causes and consequences of cysteine s-glutathionylation. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 26497–26504.
- Gupta A, Sripa B, & Tripathi T (2017) Purification and characterization of two-domain glutaredoxin in the parasitic helminth *Fasciola gigantica*. *Parasitology International*, 66, 432–435.
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, & Dick TP (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature Methods*, 5, 553–559.
- Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, & Remington SJ (2004) Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 13044–13053.
- Henderson JN, Gepshtein R, Heenan JR, Kallio K, Huppert D, & Remington SJ (2009) Structure and mechanism of the photoactivatable green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 4176–4177.
- Hill AVS (2011) Vaccines against malaria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1579), 2806–2814.

- Hill BG, & Bhatnagar A (2012) Protein S-glutathiolation: Redox-sensitive regulation of protein function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52, 559–567.
- Holland HD (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361, 903–915.
- Hoseki J, Oishi A, Fujimura T, & Sakai Y (2016) Development of a stable ERroGFP variant suitable for monitoring redox dynamics in the ER. *Bioscience Reports*, 36.
- Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, & Hay SI (2013) G6PD Deficiency. Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. In S. I. Hay, R. Price, & J. K. Baird (Eds.), *Advances in Parasitology* (Vol. 81, pp. 133–201) Elsevier.
- Imamura H, Huynh Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, & Noji H (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 15651–15656.
- Jackson SE, Craggs TD, & Huang J-R (2006) Understanding the folding of GFP using biophysical techniques. *Expert Rev. Proteomics*, 3, 545–559.
- Jaijyan DK, Verma PK, & Singh AP (2016) A novel FIKK kinase regulates the development of mosquito and liver stages of the malaria. *Scientific Reports*, 6, 1–14.
- Jorge MM, Ouermi L, Meissner P, Compaoré G, Coulibaly B, Nebie E, Krisam J, Klose C, Kieser M, Jahn A, Lu G, D'Alessandro U, Sié A, Mockenhaupt FP, & Müller O (2019) Safety and efficacy of artesunate-amodiaquine combined with either methylene blue or primaquine in children with falciparum malaria in Burkina Faso: A randomized controlled trial. *PLoS ONE*, 14.
- Jortzik E (2011) *Characterization of redox interactions in malaria parasites*.
- Jortzik E, & Becker K (2012) Thioredoxin and glutathione systems in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Medical Microbiology*, 302, 187–194.
- Jortzik E, Wang L, & Becker K (2012) Thiol-based posttranslational modifications in parasites. *Antioxidants and Redox Signaling*, 17, 657–673.
- Josling GA, & Llinás M (2015) Sexual development in *Plasmodium* parasites: Knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 573–587.
- Kabsch W (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66, 133–144.
- Kasozi D, Mohring F, Rahlfs S, Meyer AJ, & Becker K (2013) Real-Time Imaging of the Intracellular Glutathione Redox Potential in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens*, 9, 1–18.
- Kasting JF (1993) Earth's Early Atmosphere. *Science*, 259, 920–926.
- Kawagishi H, & Finkel T (2014) ROS and disease: Finding the right balance. *Nature Medicine*, 20, 711–713.
- Kawazu S ichiro, Takemae H, Komaki-Yasuda K, & Kano S (2010) Target proteins of the cytosolic thioredoxin in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology International*, 59, 298–302.
- Kehr S, Jortzik E, Delahunty C, Yates JR, Rahlfs S, & Becker K (2011) Protein S-glutathionylation in malaria parasites. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15, 2855–2865.
- Kehr S, Sturm N, Rahlfs S, Przyborski JM, & Becker K (2010) Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLoS Pathogens*, 6.
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, & Stöter M (2005) The casein kinase 1 family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling*, 17,

675–689.

- Kostyuk AI, Panova AS, Kokova AD, Kotova DA, Maltsev DI, Podgorny O V., Belousov V V., & Bilan DS (2020) In vivo imaging with genetically encoded redox biosensors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–94.
- Krieg R, Jortzik E, Goetz AA, Blandin S, Wittlin S, Elhabiri M, ... Becker K (2017) Arylmethylamino steroids as antiparasitic agents. *Nature Communications*, 8, 1–12.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lambros C, & Vanderberg JP (1979) Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology*, 65, 418–420.
- Lin BC, Harris DR, Kirkman LMD, Perez AM, Qian Y, Schermerhorn JT, Hong MY, Winston DS, Xu L, & Brandt GS (2017) FIKK Kinase, a Ser/Thr Kinase important to malaria parasites, is inhibited by tyrosine kinase inhibitors. *ACS Omega*, 2, 6605–6612.
- Lind C, Gerdes R, Hamnell Y, Schuppe-Koistinen I, Von Löwenhielm HB, Holmgren A, & Cotgreave IA (2002) Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406, 229–240.
- Lobas MA, Tao R, Nagai J, Kronschläger MT, Borden PM, Marvin JS, Looger LL, & Khakh BS (2019) A genetically encoded single-wavelength sensor for imaging cytosolic and cell surface ATP. *Nature Communications*, 10, 1–13.
- Lu G, Nagbanshi M, Goldau N, Mendes Jorge M, Meissner P, Jahn A, Mockenhaupt FP, & Müller O (2018) Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: A systematic review. *BMC Medicine*, 16.
- Lucet IS, Tobin A, Drewry D, Wilks AF, & Doerig C (2012) Plasmodium kinases as targets for new-generation antimalarials. *Future Medicinal Chemistry*, 4, 2295–2310.
- Luzzatto L, & Seneca E (2014) G6PD deficiency: A classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *British Journal of Haematology*, 164, 469–480.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, & Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 577–586.
- Matuschewski K (2017) Vaccines against malaria-still a long way to go. *The FEBS Journal*, 284, 2560–2568.
- Maxmen A (2019) First proven malaria vaccine rolled out in Africa — but doubts linger. *Nature*, 569, 14–15.
- McDonald WH, Tabb DL, Sadygov RG, MacCoss MJ, Venable J, Graumann J, Johnson JR, Cociorva D, & Yates JR (2004) MS1, MS2, and SQT - Three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 2162–2168.
- MESA Alliance (2020) Who We Are | Mesa. Retrieved April 20, 2020, from <https://mesamalaria.org/about>
- Metzger WG, Sulyok Z, Theurer A, & Köhler C (2020) Development of malaria vaccines—state of the art. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 63, 45–55.
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, & Hell R (2007) Redox-sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant Journal*, 52, 973–986.

- Meyer AJ, & Dick TP (2010) Fluorescent Protein-Based Redox Probes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13, 621–650.
- Michelet L, Zaffagnini M, Vanacker H, Le Maréchal P, Marchand C, Schroda M, Lemaire SD, & Decottignies P (2008) In vivo targets of S-thiolation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 21571–21578.
- Mieyal JJ, & Chock PB (2012) Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: Focus on S-Glutathionylation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 16, 471–475.
- Mieyal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, & Shelton MD (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10, 1941–1988.
- Mohring F, Jortzik E, & Becker K (2016) Comparison of methods probing the intracellular redox milieu in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 206, 75–83.
- Mohring F, Rahbari M, Zechmann B, Rahlfs S, Przyborski JM, Meyer AJ, & Becker K (2017) Determination of glutathione redox potential and pH value in subcellular compartments of malaria parasites. *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 104–117.
- Moll K, Ljungström I, Perlmann H, Scherf A, & Wahlgren M (2008) *Methods in Malaria Research* (Fifth Edit; K. Moll, I. Ljungström, H. Perlmann, A. Scherf, & M. Wahlgren, Eds.). Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), Manassas.
- Morgan B, Ezeriņa D, Amoako TNE, Riemer J, Seedorf M, & Dick TP (2013) Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nature Chemical Biology*, 9, 119–125.
- Morgan B, & Schwarzländer M (2016) Fluoreszierende Proteinsensoren für die Redoxregulation in lebenden Zellen. *BioSpektrum*, 22, 260–263.
- Morgan B, Sobotta MC, & Dick TP (2011) Measuring EGSH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with roGFP2-based redox probes. *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 1943–1951.
- Müller S (2004) Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 53, 1291–1305.
- Müller S (2015) Role and regulation of glutathione metabolism in *plasmodium falciparum*. *Molecules*, 20, 10511–10534.
- Nájera JA, González-Silva M, & Alonso PL (2011) Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Medicine*, 8, e1000412.
- Nirmalan N, Sims PFG, & Hyde JE (2004) Quantitative proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and its application to studies of development and inhibition. *Molecular Microbiology*, 52, 1187–1199.
- Nkrumah LJ, Muhle RA, Moura PA, Ghosh P, Hatfull GF, Jacobs WR, & Fidock DA (2006) Efficient site-specific integration in *Plasmodium falciparum* chromosomes mediated by mycobacteriophage Bxb1 integrase. *Nature Methods*, 3, 615–621.
- NobelPrize.org (2008) The Nobel Prize in Chemistry 2008. Retrieved May 1, 2020, from <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/illustrated-information/>
- Nunes MC, Goldring JPD, Doerig C, & Scherf A (2007) A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Molecular Microbiology*, 63, 391–403.
- Ong SE (2012) The expanding field of SILAC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 967–976.

- Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, & Remington SJ (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273, 1392–1395.
- Osman KT, Lou HJ, Qiu W, Brand V, Edwards AM, Turk BE, & Hui R (2015) Biochemical characterization of FIKK8 - A unique protein kinase from the malaria parasite *Plasmodium falciparum* and other apicomplexans. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 201, 85–89.
- Otto T, & Sicinski P (2017) Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17, 93–115.
- Pain A, Böhme U, Berry AE, Mungall K, Finn RD, Jackson AP, ... Berriman M (2008) The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature*, 455, 799–803.
- Park SK, Venable JD, Xu T, & Yates JR (2008) A quantitative analysis software tool for mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods*, 5, 319–322.
- Park SK, & Yates JR (2010) Census for proteome quantification. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 13, 13121–131211.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, & Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333, 19–39.
- Pastrana-Mena R, Dinglasan RR, Franke-Fayard B, Vega-Rodríguez J, Fuentes-Caraballo M, Baerga-Ortiz A, Coppens I, Jacobs-Lorena M, Janse CJ, & Serrano AE (2010) Glutathione reductase-null malaria parasites have normal blood stage growth but arrest during development in the mosquito. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 27045–27056.
- Paul F, Roath S, Melville D, Warhurst DC, & Osisanya JOS (1981) Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: use of a selective high-gradient magnetic separation technique. *The Lancet*, 318, 70–71.
- PaxDb (2021) PaxDb: Protein Abundance Database - *Plasmodium falciparum*. Retrieved April 5, 2021, from <https://pax-db.org/species/5833>
- Payne D (1987) Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, 3, 241–246.
- Pédrelacq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, & Waldo GS (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 24, 79–88.
- Peters AL, & Van Noorden CJF (2009) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: Cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57, 1003–1011.
- Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, & Ferrin TE (2004) UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25, 1605–1612.
- Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, Van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, & Wells TNC (2017) Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>
- Piperaki ET, & Daikos GL (2016, June 1) Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance? *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 22, pp. 487–493 Elsevier B.V.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, & Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229–233.
- Prieto JH, Koncarevic S, Park SK, Yates J, & Becker K (2008) Large-scale differential proteome analysis in *Plasmodium falciparum* under drug treatment. *PLoS ONE*, 3.

- Rabinovich RN, Drakeley C, Djimde AA, Hall BF, Hay SI, Hemingway J, Kaslow DC, Noor A, Okumu F, Steketee R, Tanner M, Wells TNC, Whittaker MA, Winzeler EA, Wirth DF, Whitfield K, & Alonso PL (2017) malERA: An updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLOS Medicine*, *14*, e1002456.
- Rahbari M, Diederich K, Becker K, Krauth-Siegel RL, & Jortzik E (2015) Detection of thiol-based redox switch processes in parasites - Facts and future. *Biological Chemistry*, *396*, 445–463.
- Rahbari M, Rahlfs S, Jortzik E, Bogeski I, & Becker K (2017) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dynamics in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLOS ONE*, *12*, e0174837.
- Rahbari M, Rahlfs S, Przyborski JM, Schuh AK, Nicholas H, Fidock DA, Grau GE, & Becker K (2017) Hydrogen peroxide dynamics in subcellular compartments of malaria parasites using genetically encoded redox probes. *Scientific Reports*, 1–13.
- Rahlfs S, Fischer M, & Becker K (2001) *Plasmodium falciparum* Possesses a Classical Glutaredoxin and a Second, Glutaredoxin-like Protein with a PICOT Homology Domain. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 37133–37140.
- Rashdan NA, Shrestha B, & Pattillo CB (2020) S-glutathionylation, friend or foe in cardiovascular health and disease. *Redox Biology*, *37*, 101693.
- RBM (2020) RBM Partnership to End Malaria. Retrieved April 20, 2020, from <https://endmalaria.org/>
- Remington SJ (2011) Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science*, *20*, 1509–1519.
- Reynaert NL, Ckless K, Guala AS, Wouters EFM, Van Der Vliet A, & Janssen-Heininger YMW (2006) In situ detection of S-glutathionylated proteins following glutaredoxin-1 catalyzed cysteine derivatization. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1760*, 380–387.
- Ristow M (2014) Unraveling the truth about antioxidants. *Nature Medicine*, *20*, 709–711.
- Sachs J, & Malaney P (2002) The economic and social burden of malaria. *Nature*, *415*, 680–685.
- Salamanca DR, Gómez M, Camargo A, Cuy-Chaparro L, Molina-Franky J, Reyes C, Patarroyo MA, & Patarroyo ME (2019) *Plasmodium falciparum* Blood Stage Antimalarial Vaccines: An Analysis of Ongoing Clinical Trials and New Perspectives Related to Synthetic Vaccines. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–15.
- Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sample V, Newman RH, & Zhang J (2009) The structure and function of fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, *38*, 2852–2864.
- Sanders JKM, & Jackson SE (2009) The discovery and development of the green fluorescent protein, GFP. *Chemical Society Reviews*, *38*, 2821–2822.
- Sarma GN, Savvides SN, Becker K, Schirmer M, Schirmer RH, & Karplus PA (2003) *Glutathione Reductase of the Malarial Parasite Plasmodium falciparum: Crystal Structure and Inhibitor Development*. *2836*, 893–907.
- Schipper S, Wu H, Furdui CM, Poole LB, Delahunty CM, Park R, Yates JR, Becker K, & Przyborski JM (2021) Identification of sulfenylation patterns in trophozoite stage *Plasmodium falciparum* using a non-dimedone based probe. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *242*, 111362.
- Schlitzer M (2008) Antimalarial drugs - What is in use and what is in the pipeline. *Archiv Der Pharmazie*, *341*, 149–163.

- Schuh AK, Rahbari M, Heimsch KC, Mohring F, Gabryszewski SJ, Weder S, Buchholz K, Rahlfs S, Fidock DA, & Becker K (2018) Stable Integration and Comparison of hGrx1-roGFP2 and sfroGFP2 Redox Probes in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *ACS Infectious Diseases*, 4, 1601–1612.
- Schuh AK, Sheybani B, Jortzik E, Niemann B, Wilhelm J, Boening A, & Becker K (2018) Redox status of patients before cardiac surgery. *Redox Report*, 23, 83–93.
- Schwarzländer M, Fricker MD, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove LJ, Hell R, & Meyer AJ (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of Microscopy*, 231, 299–316.
- Shelton MD, Chock PB, & Mieyal JJ (2005) Glutaredoxin: Role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7, 348–366.
- Shenton D, & Grant CM (2003) Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 374, 513–519.
- Shimomura O, Johnson FH, & Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223–239.
- Shu X, Leiderman P, Gepshtein R, Smith NR, Kallio K, Huppert D, & Remington SJ (2007) An alternative excited-state proton transfer pathway in green fluorescent protein variant S205V. *Protein Science*, 16, 2703–2710.
- Sies H (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291–295.
- Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 916–921.
- Sies H, Berndt C, & Jones DP (2017) Oxidative Stress: Annual Review of Biochemistry. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748.
- Sies H, & Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1–21.
- Sims PFG, & Hyde JE (2006) Proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Expert Review of Proteomics*, 3, 87–95.
- Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, & Conway DJ (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363, 1017–1024.
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, & Hay SI (2012) A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors*, 5:69, 1–11.
- Solyakov L, Halbert J, Alam MM, Semblat JP, Dorin-Semblat D, Reininger L, ... Doerig C (2011) Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, 2, 1–12.
- Tabb DL, McDonald WH, & Yates JR (2002) DTASelect and contrast: Tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research*, 1, 21–26.
- Talevich E, Tobin AB, Kannan N, & Doerig C (2012) An evolutionary perspective on the kinome of malaria parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 2607–2618.

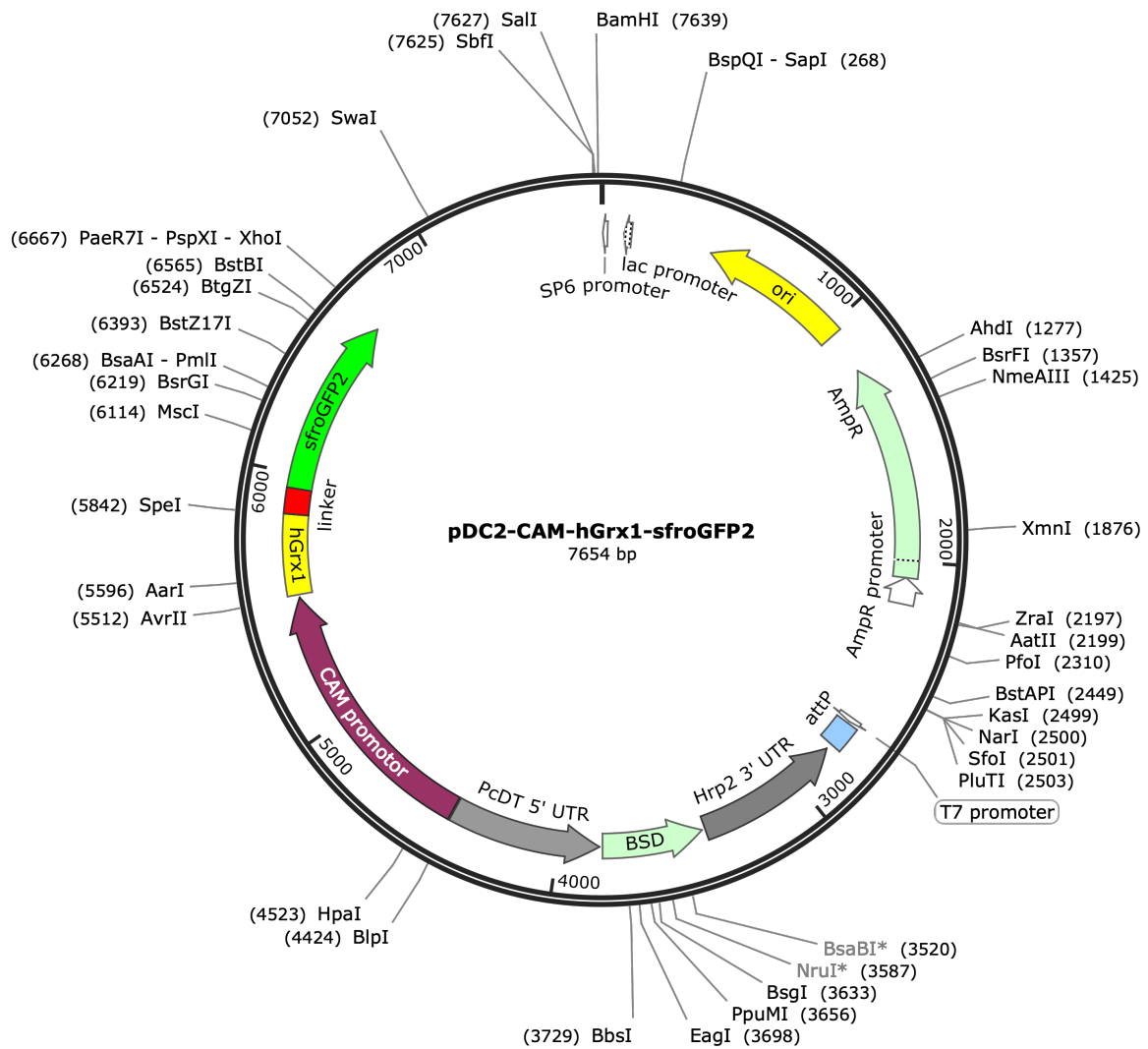
- Tang L, Zhu L, Taylor MA, Wang Y, James Remington S, & Fang C (2018) Excited state structural evolution of a GFP single-site mutant tracked by tunable femtosecond-stimulated Raman spectroscopy. *Molecules*, 23, 1–25.
- Tao R, Zhao Y, Chu H, Wang A, Zhu J, Chen X, Zou Y, Shi M, Liu R, Su N, Du J, Zhou HM, Zhu L, Qian X, Liu H, Loscalzo J, & Yang Y (2017) Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism. *Nature Methods*, 14, 720–728.
- The Lancet (2007) Is malaria eradication possible? *Lancet*, 370(9597), 1459.
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, 502–522.
- Tilley L, Straimer J, Gnädig NF, Ralph SA, & Fidock DA (2016) Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, 32, 682–696.
- Tiwari S, Sharma N, Sharma GP, & Mishra N (2021) Redox interactome in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research*, 120, 423–434.
- Towbin H, Staehelin T, & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350–4354.
- Trager W, & Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673–675.
- Tse EG, Korsik M, & Todd MH (2019) The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malaria Journal*, 18, 1–21.
- United Nations (2020) Sustainable Development Goals (SDG). Retrieved April 20, 2020, from <https://sustainabledevelopment.un.org/sdgs>
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, & Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44–84.
- Van Der Heijden J, Bosman ES, Reynolds LA, Finlay BB, & Isberg RR (2015) Direct measurement of oxidative and nitrosative stress dynamics in *Salmonella* inside macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 560–565.
- Van Der Heijden J, & Finlay B (2015) In vitro Real-time Measurement of the Intra-bacterial Redox Potential. *Bio-Protocol*, 5, 1–9.
- Van Loi V, & Antelmann H (2020) Method for measurement of bacillithiol redox potential changes using the Brx-roGFP2 redox biosensor in *Staphylococcus aureus*. *MethodsX*, 7, 100900.
- Van Thor JJ, Gensch T, Hellingwerf KJ, & Johnson LN (2002) Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222. *Nature Structural Biology*, 9, 37–41.
- Wang L, Delahunty C, Fritz-Wolf K, Rahlfs S, Helena Prieto J, Yates JR, & Becker K (2015) Characterization of the 26S proteasome network in *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports*, 5, 1–14.
- Wang L, Delahunty C, Prieto JH, Rahlfs S, Jortzik E, Yates JR, & Becker K (2014) Protein S-nitrosylation in *Plasmodium falciparum*. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20, 2923–2935.
- Ward P, Equinet L, Packer J, & Doerig C (2004) Protein kinases of the human malaria



- parasite *Plasmodium falciparum*: The kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics*, 5, 79.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, De Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, & Schwede T (2018) SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46, W296–W303.
- Wellems TE, & Plowe CV (2001) Chloroquine-Resistant Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 184, 770–776.
- White NJ (2008) Qinghaosu (artemisinin): The price of success. *Science*, 320, 330–334.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, & Dondorp AM (2014) Malaria. *The Lancet*, 383, 723–735.
- World Health Organization (1973) *Handbook of resolutions and decisions of the World Health Assembly and the Executive Board (1973-1984)*.
- World Health Organization (2014) About the WHO Global Malaria Programme. Retrieved April 20, 2020, from WHO website: [https://www.who.int/malaria/about\\_us/en/](https://www.who.int/malaria/about_us/en/)
- World Health Organization (2015) *Global technical strategy for malaria 2016-2030*. Geneva.
- World Health Organization (2018) Millennium Development Goals (MDGs). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28036-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28036-8_12)
- World Health Organization (2019a) *Malaria eradication: benefits, future scenarios and feasibility. Executive summary, WHO Strategic Advisory Group on Malaria Eradication*. 20.
- World Health Organization (2019b) Malaria vaccine pilot launched in Malawi. Retrieved May 1, 2020, from <https://www.who.int/news-room/detail/23-04-2019-malaria-vaccine-pilot-launched-in-malawi>
- World Health Organization (2019c) *WHO malaria terminology*. Geneva.
- World Health Organization (2019d) *World Malaria Report 2019*. Geneva.
- World Health Organization (2020) *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*. Geneva.
- World Health Organization (2021) *WHO Guidelines for Malaria*. Geneva.
- Xiong Y, Uys JD, Tew KD, & Townsend DM (2011) S-Glutathionylation: From molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15, 233–270.
- Xu T, Park SK, Venable JD, Wohlschlegel JA, Diedrich JK, Cociorva D, Lu B, Liao L, Hewel J, Han X, Wong CCL, Fonslow B, Delahunty C, Gao Y, Shah H, & Yates JR (2015) ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity. *Journal of Proteomics*, 129, 16–24.
- Yakubu RR, Weiss LM, & Silmon de Monerri NC (2018) Post-translational modifications as key regulators of apicomplexan biology: insights from proteome-wide studies. *Molecular Microbiology*, 107, 1–23.
- Yang D, Guo X, Xie T, & Luo X (2018) Reactive oxygen species may play an essential role in driving biological evolution: The Cambrian Explosion as an example. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 63, 218–226.
- Yogavel M, Tripathi T, Gupta A, Banday MM, Rahlfs S, Becker K, Belrhali H, & Sharma A (2014) Atomic resolution crystal structure of glutaredoxin 1 from *Plasmodium falciparum* and comparison with other glutaredoxins. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70, 91–100.

- Zaffagnini M, Bedhomme M, Groni H, Marchand CH, Puppo C, Gontero B, Cassier-Chauvat C, Decottignies P, & Lemaire SD (2012) Glutathionylation in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*: A proteomic survey. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11.
- Zhang Jianming, Yang PL, & Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 9, 28–39.
- Zhang Jie, Ye Z wei, Singh S, Townsend DM, & Tew KD (2018) An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 120, 204–216.
- Zhao Y, Hu Q, Cheng F, Su N, Wang A, Zou Y, ... Yang Y (2015) SoNar, a Highly Responsive NAD<sup>+</sup>/NADH Sensor, Allows High-Throughput Metabolic Screening of Anti-tumor Agents. *Cell Metabolism*, 21, 777–789.

## 7 APPENDIX



## ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Heidelberg,

---

Anna Katharina Schuh