

Oxidative posttranslationale Redoxmodifikationen in *Plasmodium falciparum*

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Susanne Schipper

geboren in Pinneberg

Gießen, 2021

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2015 bis Mai 2019 am Interdisziplinären Forschungszentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen an der Professur für Biochemie und Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Katja Becker und PD Dr. Jude Przyborski angefertigt.

Die Prüfungskommission setzte sich zusammen aus:

PD Dr. Jude M. Przyborski

Professur für Biochemie und Molekularbiologie
Interdisziplinäres Forschungszentrum
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

Prof. Dr. Peter Friedhoff

Institut für Biochemie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 17
35392 Gießen

Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Rind 26-32
35392 Gießen

Prof. Dr. Bernhard Spengler

Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 17
35392 Gießen

Summary

The malaria causing protozoan parasite *Plasmodium* has been investigated for decades. Yet, its biology, biochemistry, and interaction with its host are not completely understood. The deadliest form of the disease is caused by *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). During its complex life cycle, the parasite is constantly exposed to oxidative and nitrosative stress from different origins. Therefore, an adequate redox control is crucial for the parasite's survival. Part of this is regulation of oxidative posttranslational modifications (oxPTM). These include reversible and irreversible modifications of the sulfur containing amino acids cysteine and methionine. OxPTM are triggered by reactive oxygen and nitrogen species. Even though cysteine is not a very prominent amino acid in the proteome, it is highly accessible for oxPTM due to its nucleophilicity. OxPTM are part of a protein's regulation and allow for adaption to changing environmental conditions. Part of such reversible oxPTM is sulfenylation. This rather unstable modification serves as a molecular switch in regulation of proteins and is in general part of redox signaling. Often, this modification is also an intermediate on the way to more stable modifications such as S-glutathionylation. The aims of this study were the analysis of *P. falciparum* 3D7 trophozoite sulfenylome, the comparison with proteomic data of S-glutathionylation and S-nitrosation, and thus the identification of proteins especially susceptible towards redox modifications. Analysis of previously collected mass spectrometry data revealed a target list of 102 sulfenylated proteins including 152 modification sites. Matching these hits with 491 identified glutathionylated and 317 nitrosated proteins, depicts redox modification of 11% of *P. falciparum*'s proteome. More than 38% were modified as containing more than one modification. Overall, 1% of the entire proteome was identified as having all three modifications. Particularly susceptible to modifications are glycolytic proteins. Even though they represent only 0.001% of *P. falciparum*'s proteome, they constitute 7% of the sulfenylome. At the same time, S-nitrosation and S-glutathionylation target almost all glycolytic proteins. For some proteins, a redox regulation of their activity has already been shown. This underlines the high importance of redox modifications as part of a protein's regulation.

One of the most prominent identified highly redox modified proteins is *macrophage migration inhibitory factor* (MIF). The plasmodial homologue of the human protein (hMIF) serves as a virulence factor and is able to modulate the human immune system in order to improve the parasite's survival. Furthermore, the protein possesses an intrinsic oxidoreductase and tautomerase activity. Within this doctoral thesis PfMIF's four cysteines were analysed with regard to their susceptibility towards redox modifications and their relevance for the protein's activity. For this purpose, cysteine-to-alanine mutants were generated and analysed in parallel to the wildtype proteins of PfMIF and hMIF. Proteins were nitrosated and glutathionylated, subjected to protein immunoblot, and analysed using mass spectrometry. Furthermore, proteins were tested in tautomerase activity assay and in receptor interaction studies. Protein crystallization was performed to get an insight into possible conformational changes due to redox modifications.

S-nitrosation as well as S-glutathionylation could be observed for hMIF and PfMIF without a visible impact on tautomerase activity. In contrast, PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C3AC4A}, and PfMIF^{C103A} showed a significant decrease in tautomerase activity. For the first time an interaction between PfMIF and human receptors CXCR2 and 4 was observed. Redox modifications of PfMIF caused a significant lower activation of intracellular signaling cascades through receptor

binding, thus showing an impact of redox modifications on biological functions. Mutant proteins PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A}, and PfMIF^{C59A} showed similar effects, leading to decreased receptor activation. To determine whether this effect is due to structural rearrangement of the protein, crystallization of modified PfMIF was performed. Nitrosated PfMIF gave a crystal structure with 1.7 Å resolution.

This study contributes to a complementation of *P. falciparum*'s redoxome by adding the sulfenylome, thus allowing for a deeper insight into redox modifications of the parasite's proteins. Upon these findings, new targets for the development of specific drugs can be identified helping to fight the disease.

Zusammenfassung

Das die Infektionskrankheit Malaria auslösende Protozoon *Plasmodium* ist seit langem Mittelpunkt intensiver Forschung. Bisher sind seine Biologie, Biochemie und die Interaktion mit dem Wirt nicht vollständig verstanden. Die tödlichste Form der Erkrankung wird durch *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) verursacht. Während seines komplexen Lebenszyklus ist der Parasit konstant oxidativem und nitrosativem Stress aus verschiedenen Quellen ausgesetzt. Somit ist eine adäquate Redoxkontrolle essentiell für das Überleben des Organismus. Hierzu gehört auch die Regulation von oxidativen posttranslationalen Modifikationen (oxPTM). Diese umfassen reversible und irreversible Modifikationen an den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Ausgelöst werden oxPTM durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Cystein ist keine prominente Aminosäure im Proteom, aber aufgrund seiner Nukleophilität besonders zugänglich für oxPTM. OxPTM sind wichtig für die Regulation von Proteinen und dienen der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen. Zu den reversiblen oxPTM gehört unter anderem die Sulfenylierung. Diese instabile Modifikation dient als molekularer Schalter in der Regulation von Proteinen und generell im Redoxsignaling. Sulfenylierung ist auch oftmals ein Zwischenschritt zu stabileren Modifikationen wie S-Glutathionylierung. Ziel dieser Studie war es, das Sulfenylom im Trophozoiten-Stadium in *P. falciparum* 3D7 zu analysieren, mit Proteomdaten der oxPTM S-Glutathionylierung und S-Nitrosierung zu vergleichen, und so stark redoxmodifizierte Proteine zu identifizieren. Die Analyse von im Vorfeld dieser Arbeit erhobenen Massenspektrometriedaten ergab eine Trefferliste von 102 sulfenylierten Proteinen mit insgesamt 152 modifizierten Cysteinen. Der Abgleich dieser Trefferliste mit den 491 identifizierten glutathionylierten und 317 nitrosierten Proteinen zeigt, dass ca. 11 % des Proteoms von *P. falciparum* redoxmodifizierbar scheint. Hiervon lassen sich 38 % mit mehr als einer Redoxmodifikation nachweisen. Insgesamt konnte ca. 1 % des gesamten Proteoms mit allen drei Redoxmodifikationen identifiziert werden. Besonders stark redoxmodifiziert sind die glykolytischen Proteine. Obwohl diese nur 0,001 % des Proteoms von *P. falciparum* ausmachen, stellen sie 7 % des identifizierten Sulfenyloms dar. Gleichzeitig werden fast alle glykolytischen Proteine ebenfalls nitrosiert und glutathionyliert. Für einige Proteine konnte bereits eine Regulation der Aktivität durch oxPTM nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die wichtige Funktion von Redoxmodifikationen als Regulationsmechanismus in einem Proteom.

Eines der stark redoxmodifizierten Proteine ist der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF). Das *Plasmodium* Homolog zum humanen MIF (hMIF) fungiert als Virulenzfaktor und ist in der Lage das menschliche Immunsystem zu modulieren, um das Überleben des Parasiten zu verbessern. Zusätzlich verfügt das Protein über eine Oxidoreduktase- und Tautomeraseaktivität. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die vier Cysteine von PfMIF hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit gegenüber Redoxmodifikationen und ihrer Relevanz für die Enzymaktivität analysiert. Dazu wurden Cystein-zu-Alanin Mutanten generiert und parallel zu dem Wildtypprotein und hMIF charakterisiert. Proteine wurden nitrosiert und glutathionyliert und anschließend mittels Protein Immunoblot und Massenspektrometrie untersucht. Zusätzlich wurden die Proteine auf ihre Aktivität im Tautomeraseassay und in Rezeptorinteraktionsstudien mit den humanen Rezeptoren CXCR2 und 4 analysiert. Zur Untersuchung einer eventuellen Konformationsänderung durch Redoxmodifikationen wurden modifizierte Proteine kristallisiert.

Es konnte eine S-Nitrosierung und S-Glutathionylierung für PfMIF und hMIF nachgewiesen werden, welche allerdings keinen sichtbaren Einfluss auf die Tautomeraseaktivität der Proteine hatte. PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C3AC4A} und PfMIF^{C103A} hingegen zeigten eine signifikant verringerte Tautomeraseaktivität. Erstmals konnte eine Interaktion zwischen PfMIF und den humanen Rezeptoren CXCR2 und 4 nachgewiesen werden. Die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden durch Rezeptorbindung wurde signifikant durch S-Nitrosierung und S-Glutathionylierung von PfMIF verringert. Somit konnte ein direkter Einfluss von Redoxmodifikationen auf die biologische Funktion des Proteins gezeigt werden. PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A} und PfMIF^{C59A} zeigten ebenfalls eine signifikant verringerte Aktivierung der Rezeptoren. Inwiefern dies auf eine Konformationsänderung des Proteins zurückgeht, wurde anhand von Kristallisationsanalysen untersucht. Eine Kristallstruktur von nitrosiertem PfMIF konnte bei einer Auflösung von 1,7 Å erhalten werden.

Mit dieser Studie konnten Erkenntnisse aus vorangegangenen Studien vom Glutathionylom und Nitrosom um das Sulfenylom ergänzt werden. Dies erlaubt weitreichende Einblicke in die Redoxmodifikationen von Proteinen des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* und bietet neue Angriffspunkte für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Feilcke R, Arnouk G, Raphane B, Richard K, Tietjen I, Andrae-Marobela K, Erdmann F1, **Schipper S**, Becker K, Arnold N, Frolov A, Reiling N, Imming P, Fobofou SAT (2019)

Biological activity and stability analysis of knipholone anthrone, a phenyl anthraquinone derivative isolated from *Kniphofia foliosa* Hochst, **J Pharm Biomed Anal.** 2019 Sep 10; 174:277-285. doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.065

Brandstaedter C, Delahunty CM, **Schipper S**, Rahlfs R, Yates JR 3rd, Becker K (2019)

The interactome of 2-Cys peroxiredoxins in *Plasmodium falciparum*. **SciRep.** 2019 Sep 19;9(1): 13542. doi: 10.1038/s41598-019-49841-3.

Schipper S, Wu H., Furdui CM, Poole LB, Delahunty CM, Park R, Yates JR 3rd, Becker K, Przyborski J. (2021)

Identification of sulfenylation patterns in trophozoite stage *Plasmodium falciparum* using a non-dimedone based probe. **Mol Biochem Parasitol.** 2021 Jan 26; 111362. doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111362.

Konferenzbeiträge

Schipper S, Delahunty CM, Furdui CM, Becker K. Detection of sulfenylated proteins in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* using different molecular probes. 9th Annual Conference of the International Giessen Graduate School for the Life Sciences, Gießen, 2016 (Poster)

Schipper S, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Furdui CM, Poole LB, Becker K. Identification of protein sulfenylation targets in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. 10th Annual Conference of the International Giessen Graduate School for the Life Sciences, Gießen, 2017 (Poster)

Schipper S, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Poole LB, Furdui CM, Becker K. Detection of sulfenylated proteins in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* using different molecular probes. EMBO Conference on Redox Biology, Russland, 2017 (Poster)

Schipper S, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Poole LB, Furdui CM, Becker K. Identification of protein sulfenylation targets in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. EMBL Conference BioMalPar XIV: Biology and Pathology of the Malaria Parasite, Heidelberg, Mai 2018 (Poster)

Schipper S, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Furdui CM, Poole LB, Becker K. Characterization of protein sulfenylation targets in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. 11th Annual Conference of the International Giessen Graduate School for the Life Sciences, Gießen, 2018 (Poster)

Schipper S, Identification of protein sulfenylation targets in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. International meeting of the SPP 1710, Berlin, 2018 (Vortrag)

Schipper S, Redox posttranslational modifications in *Plasmodium falciparum* Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), 8th Meeting of the DFG Priority Program "Dynamics of Thiol-based Redox Switches in Cellular Physiology", Rauischholzhausen, März 2019 (Vortrag)

Inhaltsverzeichnis

Summary III

Zusammenfassung V

Publikationen und Konferenzbeiträge VII

Inhaltsverzeichnis VIII

Tabellenverzeichnis XIII

Abbildungsverzeichnis XIV

Abkürzungsverzeichnis XVI

1 Einleitung 1

 1.1 Oxidative posttranslationale Modifikationen 1

 1.1.1 Sulfenylierung 4

 1.1.2 Sulfinylierung und Sulfonylierung 7

 1.1.3 S-Glutathionylierung 7

 1.1.4 S-Nitrosierung 8

 1.2 Malaria 9

 1.2.1 Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* 11

 1.2.2 Pathogenese und klinische Manifestation von Malaria 12

 1.2.3 Redoxmetabolismus von *Plasmodium* 13

 1.2.4 Redoxenzyme von Plasmodium 14

 1.3 *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) 16

 1.3.1 MIF als chemotaktisches Zytokin 16

 1.3.2 MIF-Rezeptoren 16

 1.3.3 Katalytische Aktivitäten von MIF 18

 1.3.4 MIF Homologe in Parasiten 20

 1.3.5 MIF und Malaria 21

 1.4 Zielsetzung 26

2 Material 27

 2.1 Geräte und Software 27

2.2	Chemikalien	28
2.3	Verbrauchsmaterialien	29
2.4	Kits.....	30
2.5	Enzyme	30
2.5.1	Restriktionsenzyme	30
2.5.2	Enzyme für die Molekularbiologie.....	30
2.5.3	Weitere Enzyme.....	30
2.6	Antikörper.....	30
2.7	Zellstämme	31
2.8	Vektoren.....	31
2.9	Oligonukleotide	31
2.10	Puffer und Lösungen.....	31
2.10.1	Stocklösungen.....	31
2.10.2	Medium für Bakterienkultur.....	32
2.10.3	Puffer für Proteinreinigung.....	32
2.10.4	Puffer für Elektrophorese	32
2.10.5	Gele	33
2.10.6	Puffer für Western Blot	33
2.10.7	Puffer Biotin Switch Technik.....	33
2.10.8	Proteinkristallisationsscreens	34
2.10.9	Assaypuffer	34
3	Methoden	35
3.1	Auswertung von Massenspektrometriedaten	35
3.2	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1	Plasmidpräparation	35

3.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
3.2.3	Agarosegelelektrophorese.....	36
3.2.4	Molekulare Klonierung.....	36
3.2.5	Zielgerichtete Mutagenese	36
3.3	Mikrobiologische Methoden.....	37
3.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	37
3.3.2	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i>	38
3.4	Proteinbiochemische Methoden	38
3.4.1	Reinigung von rekombinantem Protein mittels Affinitätschromatographie.....	38
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
3.4.3	Größenausschlusschromatographie.....	39
3.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	40
3.4.5	Protein Immunoblot	40
3.4.6	Gelfiltration zum Entsalzen von Proteinen	41
3.4.7	Sulfonylierung von rekombinanten Proteinen	41
3.4.8	S-Nitrosierung von rekombinanten Proteinen	42
3.4.9	Chemilumineszenzdetektion von S-Nitrosierung	43
3.4.10	S-Glutathionylierung von rekombinanten Proteinen.....	44
3.4.11	Massenspektrometrie	44
3.4.12	Tautomeraseassay.....	44
3.4.13	Oxidoreduktaseassay.....	46
3.4.14	CXCR2 und CXCR4 Rezeptorinteraktionstudie	46
3.5	Proteinkristallisation	46
4	Ergebnisse	49
4.1	Sulfonylom von <i>P. falciparum</i>	49

4.2	Macrophage migration inhibitory factor	57
4.2.1	Heterologe Überexpression und Reinigung von hMIF und PfMIF	57
4.2.2	Oligomerisierung von hMIF und PfMIF	57
4.2.3	Mutagenese	58
4.2.4	Heterologe Überexpression und Reinigung von PfMIF Mutanten	59
4.2.5	Oxidoreduktaseaktivität von MIF	60
4.2.6	Tautomeraseaktivität von MIF und Mutanten.....	62
4.2.7	Posttranslationale Redoxmodifikationen von MIF	65
4.2.7.1	Sulfenylierung.....	65
4.2.7.2	S-Glutathionylierung.....	66
4.2.7.3	S-Nitrosierung.....	70
4.2.8	Rezeptorinteraktionsstudien	74
4.2.9	Kristallisation von redoxmodifiziertem PfMIF	76
5	Diskussion.....	78
5.1	Oxidative posttranslationale Modifikationen.....	78
5.1.1	Sulfenylierung in <i>Plasmodium falciparum</i>	78
5.1.2	Vergleich der oxPTM in <i>P. falciparum</i>	82
5.1.3	Redoxregulation der Glykolyse.....	85
5.2	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i> (MIF)	89
5.2.1	Rekombinante Herstellung von MIF-Wildtyp und Cystein-zu-Alanin-Mutanten	90
5.2.2	Oxidoreduktaseaktivität von MIF	90
5.2.3	Tautomeraseaktivität von MIF	92
5.2.4	Redoxmodifikationen von MIF	93
5.2.5	Rezeptorinteraktionsstudien	99
5.2.6	Kristallisation von redoxmodifiziertem PfMIF	102
	Literaturverzeichnis	104
	Anhang.....	124

Danksagung	147
Eidesstattliche Erklärung	148

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Charakterisierung von MIF-Homologen aus <i>Plasmodien</i>	23
Tabelle 2 – Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR.....	37
Tabelle 3 – PCR-Programm für die Mutagenese-PCR.....	37
Tabelle 4 – Probenvorbereitung für SDS-PAGE	39
Tabelle 5 – Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten von MIF	40
Tabelle 6 – Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen für die Immunoblot Analyse	41
Tabelle 7 – Verhältnis von Cys-NO zu freien Cysteinen in PfMIF und hMIF	43
Tabelle 8 - Verhältnis von Cys-NO zu freien Cysteinen in PfMIF und hMIF	44
Tabelle 9 – Mittels Massenspektrometrie identifizierte sulfenylierte Proteine	51
Tabelle 10 – Chemilumineszenzdetektion von nitrosiertem PfMIF	74
Tabelle 11 – Chemilumineszenzdetektion von nitrosiertem hMIF	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies	2
Abbildung 2 – Oxidation von Methionin	3
Abbildung 3 – Oxidative Modifikationen an Cysteinen	4
Abbildung 4 – Reaktionen, welche zur Bildung von Sulfensäuren führen	5
Abbildung 5 – Reaktionsmechanismus von BCN mit einem sulfenylierten Protein.....	6
Abbildung 6 – Versuchsablauf zur Identifizierung von sulfenylierten Proteinen.....	6
Abbildung 7 – Mechanismen der Protein S-Glutathionylierung und Deglutathionylierung	8
Abbildung 8 – Globales Vorkommen von Malaria	10
Abbildung 9 – Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	12
Abbildung 10 – Redoxmetabolismus in <i>P. falciparum</i>	14
Abbildung 11 – Thioredoxinsystem von <i>P. falciparum</i>	15
Abbildung 12 – Effekte der MIF-Sekretion	17
Abbildung 13 – Einfluss von Protozoen MIF auf den Wirt	21
Abbildung 14 – Kristallstruktur von PfMIF im Komplex mit einem Inhibitor (4P7S).....	24
Abbildung 15 – Tautomerisierung von L-Dopachrom-Methylester	45
Abbildung 16 – Berechnung der Konzentration von L-Dopachrom-Methylester nach Lambert-Beer	45
Abbildung 17 – Schematische Darstellung von Kristallisationstechniken	47
Abbildung 18 – Versuchsdurchführung des BCN-Bio1 <i>pull-downs</i>	50
Abbildung 19 – Reinigung von PfMIF und hMIF.....	57
Abbildung 20 – Größenausschlusschromatographie von PfMIF und hMIF.....	58
Abbildung 21 – Protein Immunoblot der PfMIF ^{C3A/C4A} Testsynthese	59
Abbildung 22 – Reinigung von PfMIF Mutanten.....	60
Abbildung 23 – Oxidoreduktaseassay von PfMIF	61

Abbildung 24 – Stabilitätstest von DCME in verschiedenen Assaypuffern	62
Abbildung 25 – Tautomeraseaktivitätsmessung von hMIF	63
Abbildung 26 – Tautomeraseaktivitätsmessung von PfMIF ^{WT} und Mutanten	64
Abbildung 27 – Vergleich der Tautomeraseaktivität von PfMIF ^{WT} und Mutanten.....	65
Abbildung 28 – Protein Immunoblot der Sulfenylierung von MIF	66
Abbildung 29 – Protein Immunoblot der S-Glutathionylierung von hMIF	67
Abbildung 30 – Protein Immunoblot der S-Glutathionylierung von PfMIF	68
Abbildung 31 – Protein Immunoblot der S-Glutathionylierung von MIF und Mutanten	69
Abbildung 32 – Tautomeraseaktivitätsmessung von glutathionyliertem MIF	70
Abbildung 33 – Protein Immunoblot der Biotin Switch Technik von hMIF	71
Abbildung 34 – Protein Immunoblot der Biotin Switch Technik von PfMIF	72
Abbildung 35 – Enzymaktivitätsmessung von nitrosiertem MIF	73
Abbildung 36 – Rezeptorinteraktionsstudie von MIF	75
Abbildung 37 – Kristallisation von glutathionyliertem PfMIF	76
Abbildung 38 – Initiales Screening von nitrosiertem PfMIF	77
Abbildung 39 – Kristalle von nitrosiertem PfMIF	77
Abbildung 40 – Funktionelle Klassifikation von sulfenylierten <i>P. falciparum</i> Proteinen.....	81
Abbildung 41 – Oxidative posttranslationale Modifikationen in <i>P. falciparum</i>	83
Abbildung 42 – Posttranslationale Modifikationen der glykolytischen Enzyme.....	86
Abbildung 43 – Sequenzvergleich von GAPDH aus verschiedenen Organismen	88
Abbildung 44 – Kristallstruktur PfMIF (2WKF)	94

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BST	Biotin Switch Technik
C	Cystein
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLD	Chemilumineszenzdetektion
Cys	Cystein
Cys-NO	S-Nitrosocystein
DCME	L-Dopachrom-Methylester
D-DT	D-Dopachrom Tautomerase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Fe	Eisen
FP	Ferroporphyrin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO	Genontologie
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
h	human
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
His	Histidin
His ₆ -tag	Hexahistidyl-tag
IAA	Iodoacetamid
IL	Interleukin
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
Met	Methionin
MetHb	Methämoglobin
MetO	Methioninsulfoxid
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
MS	Massenspektrometrie
MudPIT	<i>Multidimensional protein identification technique</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxidanion

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OH ⁻	Hydroxidion
oxPTM	Oxidative posttranslationale Modifikation(en)
P	Prolin
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PEG	Polyethylenglykol
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PK	Pyruvatkinase
Plrx	Plasmoredoxin
Prx	Peroxiredoxin
PTM	Posttranslationale Modifikation
RNNO	Nitrosamin
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
RONs	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSNO	Nitrosothiol
RXNO	Summe aus Nitrosamin und Nitrosothiol
-SH	Thiol
-SNO	S-Nitrosylierung
-SO ₂	Sulfinylierung
-SO ₃	Sulfonylierung
-SOH	Sulfenylierung
-SS-	Disulfid
-SSG	S-Glutathionylierung
-SSH	Sulhydrat
SMA	Schwere Malariaämie
SOD	Superoxiddismutase
Srx	Sulfiredoxin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	<i>Tumor-necrosis-factor-α</i>
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reduktase
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
ZM	Zerebrale Malaria

1 Einleitung

1.1 Oxidative posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen (PTM) von Proteinen ermöglichen nicht nur eine rasche Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen, sondern erhöhen auch massiv die Komplexität sowie Diversität eines Proteoms. Sie können die Struktur von Proteinen verändern und dienen damit der Zellregulation. Im Gegensatz zur Neusynthese von Proteinen sind diese Prozesse erheblich schneller und dynamischer, teilweise induzieren sie sogar eine Proteinbiosynthese (Hening Lin and Kate S. Carroll, 2018). Zu den diversen PTM zählen unter anderem die proteolytische Spaltung oder die kovalente Verknüpfung einer funktionellen Gruppe, wie beispielsweise Phosphat mit einem Protein (Uversky, 2013). Zu den bekanntesten PTM gehören die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und Glykosylierung. Mittlerweile sind über 200 verschiedene PTM bekannt (Minguez *et al.*, 2013). Diese können enzymatisch oder nicht-enzymatisch stattfinden. Viele dieser Modifikationen sind reversibel und ermöglichen so die Regulation von Proteinaktivitäten. Eine weitere Gruppe der PTM bilden die oxidativen posttranslationalen Modifikationen (oxPTM). Ausgelöst werden diese Modifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS). ROS werden endogen von Aerobiern während physiologischen zellulären Prozessen gebildet. So transferieren beispielsweise NADPH-Oxidasen (NOX) Elektronen von NADPH auf Sauerstoff, sodass Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) entsteht. ROS können aber auch während der Interaktion von Enzymen mit exogenen Quellen, wie beispielsweise Xenobiotika entstehen (Ray *et al.*, 2012). Die intrazelluläre Konzentration an ROS wird streng reguliert, sodass ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Neutralisation herrscht (Hoshi and Heinemann, 2001). Wird das Gleichgewicht gestört, kommt es aufgrund steigender ROS-Konzentrationen zu Schäden an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren. Dieser Prozess wird als oxidativer Stress bezeichnet und scheint an vielen Erkrankungen wie unter anderem Alzheimer, Diabetes sowie verschiedene Krebserkrankungen beteiligt zu sein (Chatterjee, 2016). In geringen Konzentrationen sind ROS notwendig, um mittels Zellsignaling Prozesse wie die Zellproliferation zu regulieren (Ray *et al.*, 2012). Zu den ROS gehören überwiegend freie Radikale wie $O_2^{\cdot-}$ und das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}). Diese sind sehr reaktiv und weisen eine kurze Halbwertszeit auf (Hoshi and Heinemann, 2001). Ein weiterer Vertreter der ROS ist das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Abbildung 1). RNS können aus ROS gebildet werden, bzw. auch als Vorläufer für ROS dienen. Verschiedene reaktive Spezies können auf die gleichen molekularen Ziele wirken oder in der Regulation der gleichen Signalwege involviert sein. Daher werden ROS und RNS oftmals zusammengefasst als RONS bezeichnet (Moldogazieva *et al.*, 2020). RNS werden ausgehend vom Stickstoffmonoxid ($\cdot NO$) gebildet. Für die Produktion von $\cdot NO$ sind die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), Häm-enthaltende Enzyme verantwortlich. Diese kommen in drei Isoformen vor: neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und induzierbare NOS (iNOS). Neben $\cdot NO$ bilden NOS auch $O_2^{\cdot-}$. Beide RONS reagieren miteinander zu der instabilen RNS Peroxynitrit ($OONO^{\cdot-}$). Dieses wiederum kann zu Nitrat (NO_3^-) isomerisieren (Patel *et al.*, 1999) (Abbildung 1). Während das schwache Radikal $\cdot NO$ als physiologisches Signalmolekül fungiert, werden die meisten RNS mit pathologischen

Prozessen, wie beispielsweise Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen, assoziiert (Moldogazieva *et al.*, 2020).

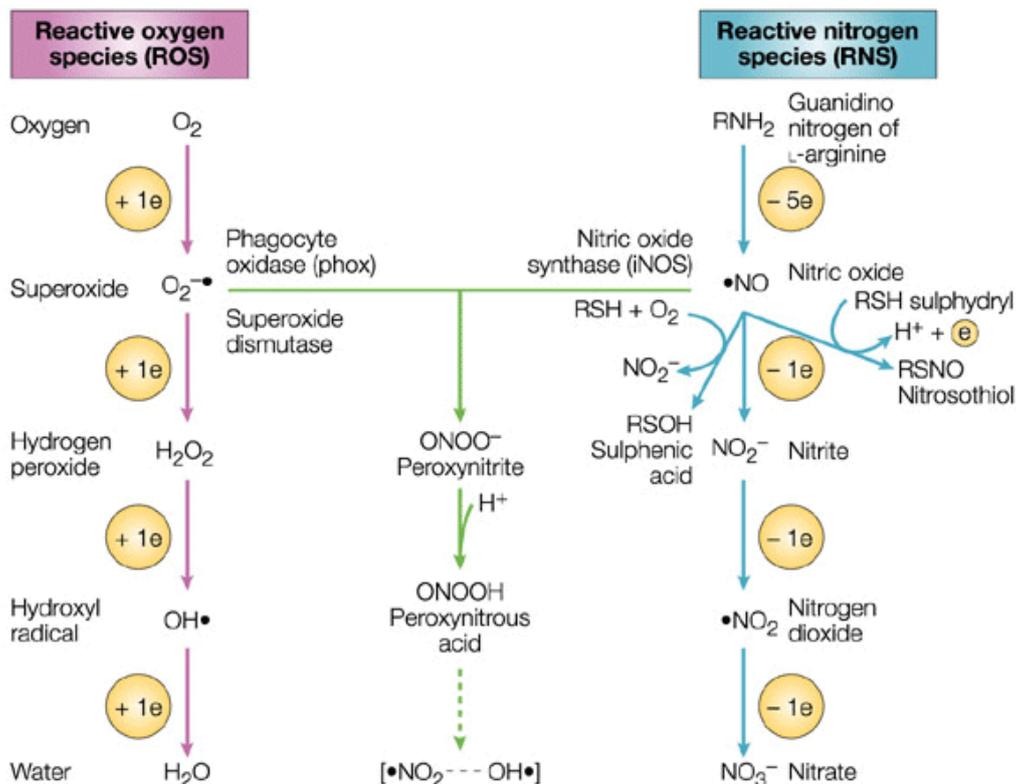


Abbildung 1 – Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Ausgehend von Sauerstoff (O_2) bzw. von einer Aminogruppe (RNH_2) können verschiedene reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies gebildet werden. Modifiziert nach (Fang, 2004).

Obwohl alle RONS als reaktive Spezies bezeichnet werden, variieren sie untereinander stark in ihrer Reaktivität und Selektivität. Allen RONS gemein ist ihre Fähigkeit vor allem Proteine zu modifizieren (Hawkins and Davies, 2019). Hierbei werden vor allem die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein (Cys) und Methionin (Met) modifiziert (Kim *et al.*, 2014). Während Cysteinmodifikationen seit langem untersucht werden, ist bisher über die Funktion von oxPTM an Met wenig bekannt. Durch ROS kann die Aminosäure oxidiert werden zu Methioninsulfoxid (MetO). Dieses kann enzymatisch über Thioredoxin-abhängige Methioninsulfoxid-Reduktasen reduziert werden (Abbildung 2). MetO kann Protein-Protein-Interaktionen modulieren und in der intrazellulären Signaltransduktion wirken (Liang *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass die Oxidation von Met zur antioxidativen Abwehr beiträgt. Indem Met reversibel oxidiert wird, können andere Seitenketten nicht oxidiert werden und sind somit geschützt (Kim *et al.*, 2014).

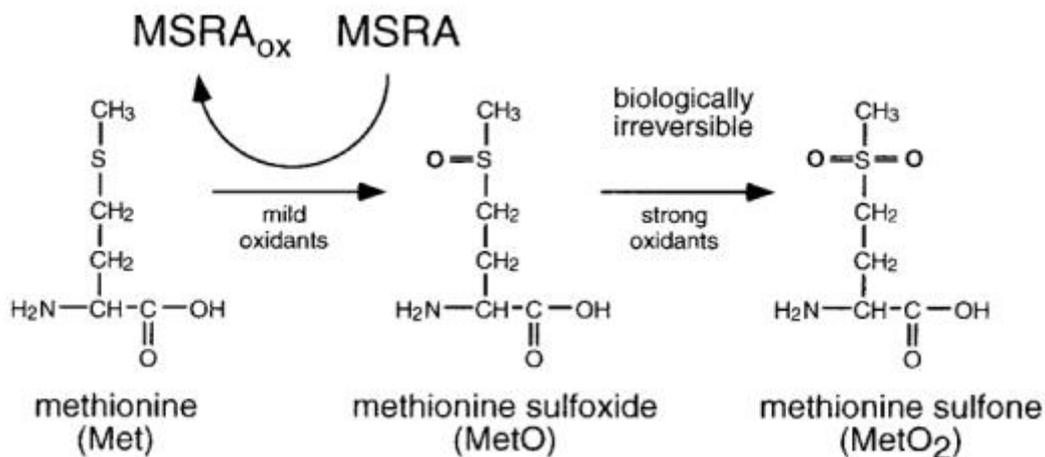


Abbildung 2 – Oxidation von Methionin

Methionin kann in der Gegenwart von Oxidationsmitteln zu Methioninsulfoxid oxidiert werden. Die Methioninsulfoxid-Reduktase (MSRA) ist in der Lage, die Modifikation zu entfernen. Diese Reaktion ist abhängig vom Thiothoxinsystem (nicht gezeigt). In der Gegenwart von starken Oxidationsmitteln kann Methioninsulfoxid hyperoxidiert werden zu Methioninsulfon. Modifiziert nach (Hoshi and Heinemann, 2001).

Intensiver untersucht sind oxPTM an Cys, welche essentiell zum Redoxsignaling beitragen (Jortzik *et al.*, 2011). Diese schwefelhaltige Aminosäure ist aufgrund ihrer Nukleophilität besonders zugänglich für PTM (Deng *et al.*, 2019). Mit knapp 2 % ist Cys nicht sehr prominent im Proteom vertreten (Pe'er *et al.*, 2004). Unter neutralen Bedingungen deprotoniert die Thiolgruppe und es entsteht ein nukleophiles Thiolatanion (Miyake *et al.*, 2020). Die reaktive Thiolseitenkette fungiert als Redoxsensor und wechselt in Abhängigkeit von dem jeweiligen Vorkommen an ROS/RNS zwischen einem oxidierten und reduzierten Zustand (Murray and Van Eyk, 2012). Bei den oxPTM an Cys wird zwischen reversiblen und irreversiblen Modifikationen unterschieden (Abbildung 3). Zu den bekanntesten reversiblen Modifikationen eines Thiols (-SH) gehört die Bildung eines Disulfids (-SS-). Dieses kann sowohl intra- als auch intermolekular stattfinden. Durch Reaktion eines Thiols mit Schwefelwasserstoff (H₂S) kommt es zur Sulfhydratation (-SSH). Reagiert ein Thiol mit S-Nitrosoglutathion (GSNO), so kommt es zur S-Nitrosierung (-SNO). Die Reaktion eines Thiols mit Glutathion führt zur S-Glutathionylierung (-SSG). Durch Oxidation mit H₂O₂ kommt es zu einer Sulfenylierung (-SOH). Die Übergänge zwischen den verschiedenen reversiblen oxPTM sind hierbei fließend, so kann beispielweise eine S-Glutathionylierung sowohl an einem Thiol als auch an einer Sulfensäure stattfinden. Wenn das Level an ROS steigt, dann kommt es zu irreversiblen oxPTM und damit zur Störung des Redoxsignaling (Matsui *et al.*, 2020). Hierzu gehören die Sulfinylierung (-SO₂) sowie die Sulfonylierung (-SO₃). Die Sulfinylierung galt lange Zeit als irreversible Modifikation, jedoch konnten in einigen Organismen Enzyme, wie Sulfiredoxin (Srx), identifiziert werden, welche Sulfinsäuren reduzieren können (Biteau *et al.*, 2003). In Kapitel 1.1.2 wird dies näher erläutert.

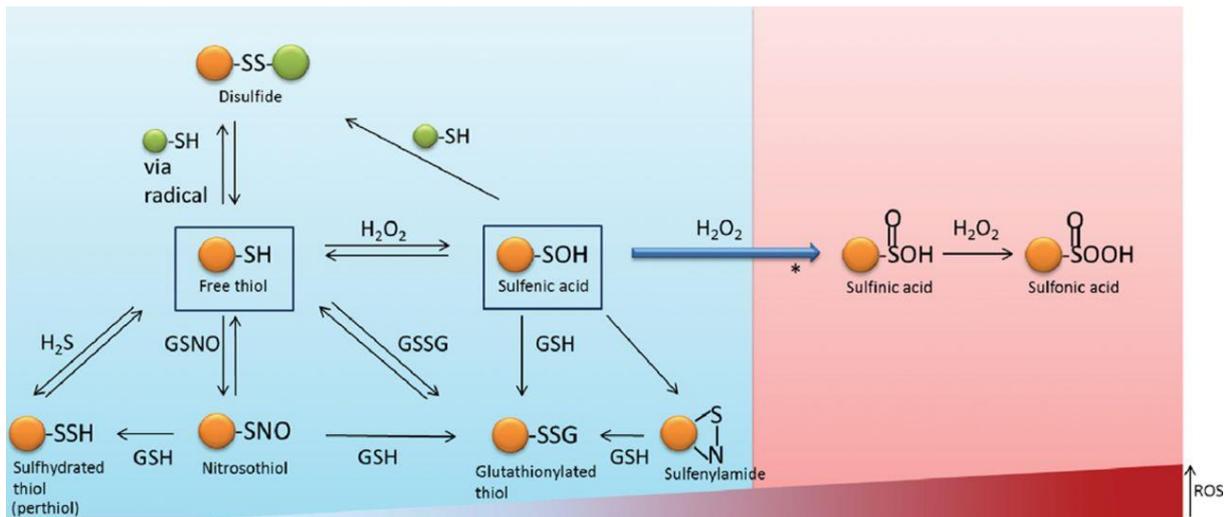


Abbildung 3 – Oxidative Modifikationen an Cysteinen

Auf der linken Seite sind blau unterlegt reversible Modifikationen von freien Thiolen (-SH) dargestellt. Mit steigendem Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt es zu irreversiblen Modifikationen (rot unterlegt). *: Diese Modifikation wurde lange Zeit als irreversibel betrachtet (Chung *et al.*, 2013).

Verschiedene Faktoren bestimmen, ob und welche Modifikationen an einem Thiol stattfinden. Hierzu gehören unter anderem die Reaktivität eines einzelnen Cysteins, dessen räumliche Umgebung (z.B. lokales elektrostatisches Feld) sowie der aktuelle Redoxstatus in der Zelle (Chung *et al.*, 2013; Miyake *et al.*, 2020). Des Weiteren weisen Proteinthiole eine stark variierende Reaktionsgeschwindigkeit zu H₂O₂ auf. Die antioxidativen Prx-Enzyme sind mit 10⁵ bis 10⁸ M⁻¹s⁻¹ sehr reaktiv, redox-sensible Proteine wie die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit 10³ bis 10⁵ M⁻¹s⁻¹ etwas weniger reaktiv, während die Mehrheit der Cysteine nur sehr langsam mit Wasserstoffperoxid reagiert (ungefähr 10 M⁻¹s⁻¹) (Shi and Carroll, 2020).

1.1.1 Sulfenylierung

Die reversible oxPTM Sulfenylierung ist bereits seit mehreren Dekaden Gegenstand intensiver Forschung (Allison, 1976). Sulfenylierung als Sensor für oxidativen Stress hat eine wichtige Funktion im Redoxsignaling. Sie reguliert die Aktivität verschiedener Proteine, indem sie u. a. als molekularer An-/Ausschalter für Transkriptionsfaktoren dient (Devarie-Baez *et al.*, 2016; Salsbury *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte für einige Proteine, wie beispielsweise Peroxidasen und Prx, gezeigt werden, dass sie -SOH Intermediate während ihres katalytischen Zyklus bilden (Poole and Nelson, 2008). Grundsätzlich ist Sulfenylierung oft ein Zwischenzustand für verschiedene andere oxPTM. Die Modifikation ist aufgrund ihrer metastabilen und hoch reaktiven funktionellen Gruppen meistens instabil. Das Schwefelatom besitzt den formalen Oxidationsstatus 0 und kann daher sowohl elektrophil als auch nukleophil wirken (Paulsen and Carroll, 2013).

Verschiedene Reaktionen führen zu der Ausbildung von Sulfensäuren (siehe Abbildung 4). Durch die Oxidation eines Thiols bzw. eines Thiolatanions mit Wasserstoffperoxid oder Hypochlorsäure entsteht eine Sulfensäure. Hypochlorsäure wird in menschlichen Zellen

während einer Immunantwort gebildet. Die Hydrolyse eines S-Nitrosothiols führt ebenfalls zur Ausbildung einer Sulfensäure. Tritt ein Thiol bzw. Thiolanion in die räumliche Nähe eines Thiosulfins, so kann das Sauerstoffatom übertragen werden. Hierbei entsteht neben einer Sulfensäure auch eine Disulfidbrücke. Aus einem Thiyl und einem Hydroxylradikal kann sich ebenfalls eine Sulfensäure bilden (Reddie and Carroll, 2008).

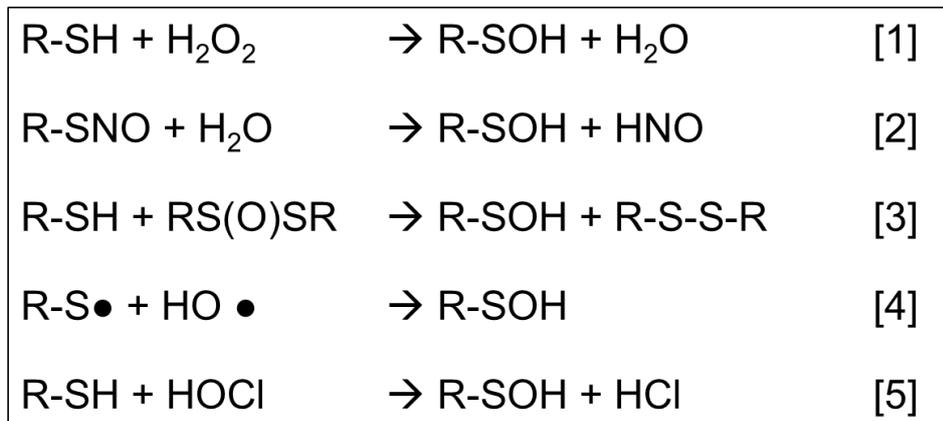


Abbildung 4 – Reaktionen, welche zur Bildung von Sulfensäuren führen

[1] Oxidation eines Thiols/Thiolanions mit Wasserstoffperoxid. [2] Hydrolyse eines S-Nitrosothiols. [3] Reaktion eines Thiols/Thiolanion mit einem Thiosulfins. [4] Reaktion eines Thiyls mit einem Hydroxylradikal. [5] Oxidation eines Thiols/Thiolanions mit Hypochlorsäure (Reddie and Carroll, 2008).

Es gibt verschiedene Faktoren, welche die Wahrscheinlichkeit erhöhen können, dass sich an einem Cystein eine Sulfensäure bildet. Befinden sich in der räumlichen Umgebung eines Cysteins polare, aber nicht zwingend geladene Reste oder ein Histidin oder Threonin, dann scheint dies die Reaktivität des Schwefelatoms gegenüber einer Oxidation zu erhöhen (Salsbury *et al.*, 2008). Obwohl Sulfensäuren als instabile Intermediate gelten, können sie unter bestimmten Bedingungen eine hohe Langlebigkeit aufweisen. Ein niedriger pK_a des Schwefelatoms, sowie die Abwesenheit von benachbarten Thiolen oder anderen Nukleophilen, scheinen dies zu begünstigen. Es konnte gezeigt werden, dass Sulfensäuren am humanen Serumalbumin für mehrere Stunden stabil sind (Turell *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite begünstigt ein niedriger pK_a -Wert zwar die Stabilität der Sulfensäure, verstärkt aber gleichzeitig die Nukleophilität des Schwefelatoms, was es somit anfällig für Hyperoxidation zu Sulfin- bzw. Sulfonsäuren macht (Paulsen and Carroll, 2013; Poole and Nelson, 2008). Mittels *in silico* Analysen ist es möglich, potenzielle Modifikationsstellen in Proteinen zu identifizieren (Bui *et al.*, 2016). Diese müssen anschließend empirisch verifiziert werden. Hierfür werden meist Massenspektrometrie basierte Untersuchungen des Proteoms durchgeführt. Die zu untersuchende Modifikation wird mit einer spezifischen Sonde markiert. Diese erlaubt in weiteren Schritten eine Anreicherung solcherart markierter Proteine sowie eine anschließende Identifizierung. Zur Identifizierung von sulfenylierten Proteinen werden seit den 70er Jahren 1,3-Dicarbonyl Reagenzien wie 5,5-Dimethyl-1,3-Cyclohexadion, besser bekannt als Dimedon, verwendet (Allison, 1976). Seitdem wurden zahlreiche Derivate entwickelt, welche sowohl eine Anreicherung als auch eine Visualisierung von sulfenylierten Proteinen ermöglichen (*reviewed in* (Gupta and Carroll, 2014)). Hierbei ist vor allem wichtig, dass die

Sonde schnell an die instabile Modifikation bindet und diese somit konserviert. Hierfür wurden in den letzten Jahren verschiedene neue Sonden entwickelt (Gupta *et al.*, 2017; Poole *et al.*, 2014). Eine Gruppe bilden die Biotin-gekoppelten *strained bicyclononyne*, wie beispielsweise BCN-Bio1 ($C_{20}HN_2O_3S_1$). Die Reaktionsraten der Sonde mit Sulfensäuren sind über 100 mal schneller als die von Dimedon-Derivaten (Poole *et al.*, 2014). Der *bicyclo[6.1.0]nonyne* Teil der Sonde reagiert mit einer Sulfensäure zu einem stabilen Alkenylsulfoxid (Abbildung 5). Nicht gezeigt in dieser Abbildung ist der esterverknüpfte Biotinteil der Sonde, welcher sowohl eine Anreicherung BCN-Bio1-markierter Proteine sowie eine Identifikation mittels Antikörper erlaubt. Zu beachten ist neben der Kreuzreaktivität mit Persulfiden (Galardon and Padovani, 2015), dass Sonden mit einem Biotinrest eine schlechte Zellpermeabilität aufweisen und daher nur in Zelllysaten Anwendung finden (Seo and Carroll, 2009).

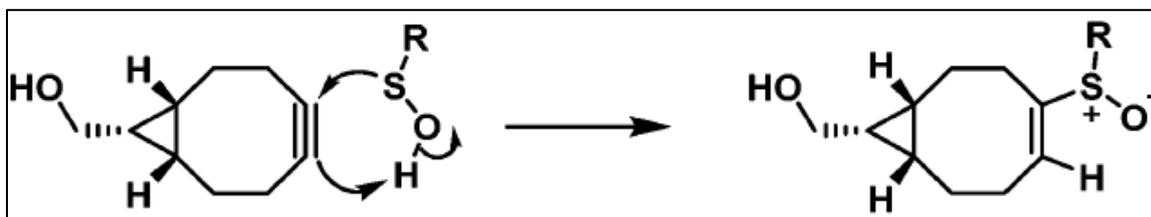


Abbildung 5 – Reaktionsmechanismus von BCN mit einem sulfenylierten Protein

Bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) reagiert mit einem sulfenylierten Protein (R-SOH) zu einem stabilen Alkenylsulfoxid (Poole *et al.*, 2014).

Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf eines *pull-down* Experiments zur Identifizierung von sulfenylierten Proteinen. Modifizierte Proteine müssen zuerst zugänglich gemacht werden, meist durch Zelllyse, da nicht alle Sonden zur Identifizierung zellpermeabel sind. Anschließend wird ein Thiol-blockierendes Reagenz, wie beispielsweise N-Ethylmaleimid (NEM), zugegeben. Dieses bindet an freie Thiole und schützt sie vor Oxidation. In einem weiteren Schritt bindet eine Sonde mit hoher Reaktivität und Spezifität an Sulfenylierungsstellen. Im Idealfall erlaubt diese Sonde eine Anreicherung der markierten Proteine, um diese zu isolieren. In einem finalen Schritt können markierte Proteine identifiziert werden, z. B. mittels Massenspektrometrie (MS).

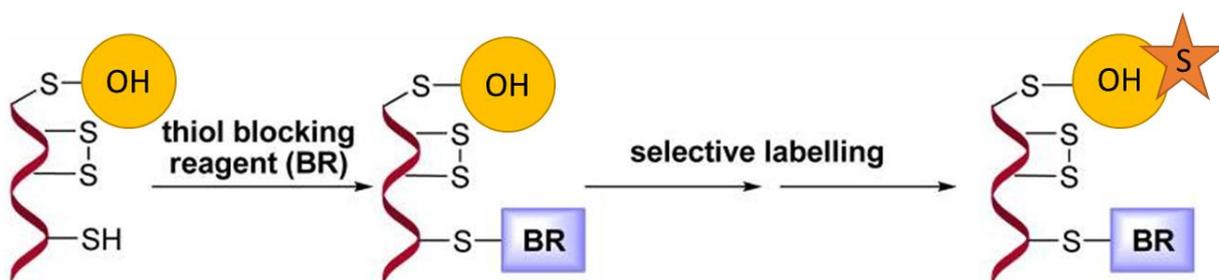


Abbildung 6 – Versuchsablauf zur Identifizierung von sulfenylierten Proteinen

Ein sulfenyliertes Protein wird mit einem Thiol-blockierendem Reagenz (BR) inkubiert. Anschließend wird die Modifikation mittels einer Sulfensäure-spezifischen Sonde (S) markiert. Durch den Einsatz des BR werden Thiole vor Oxidation geschützt und können nicht durch die Sonde markiert werden. Modifiziert nach (Zhang *et al.*, 2013).

1.1.2 Sulfinylierung und Sulfonylierung

Sind Sulfensäuren einem steigenden Level an ROS ausgesetzt, so kann es durch eine Hydroxidation zu der stabileren oxPTM Sulfinsäure kommen (Abbildung 3). Durch die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen sowie sterischer Hinderung scheinen Sulfinsäuren stabilisiert und somit vor weiterer Oxidation geschützt zu werden (Wilson, 2011). Im Zytosol liegen Sulfinsäuren deprotoniert als schwach nukleophile Sulfinatanionen (RSO_2^-) vor (Reddie and Carroll, 2008). Die Modifikation kann nicht durch das Thioredoxin (Trx)- oder Glutathion (Grx)-System reduziert werden (1.2.4). Somit wurde die Modifikation bis zur Entdeckung der ATP-abhängigen Sulfinsäurereduktase Sulfiredoxin (Srx) 2003 als irreversibel angesehen (Biteau *et al.*, 2003). Untersucht wurde vor allem die Rolle von Srx im katalytischen Zyklus von Peroxidredoxin (Prx) (Rhee *et al.*, 2007). Während eines Durchgangs des katalytischen Zyklus wird ca. 0,1 % des peroxidativen Cysteins von hPrx1 zu Cys-SO₂H hydroxyliert und damit inaktiviert (Yang *et al.*, 2002). Srx stellt somit die Reaktivierung des Prx sicher. Mittlerweile konnten Homologe von Srx in Pflanzen identifiziert werden (Liu *et al.*, 2006). Grundsätzlich wird angenommen, dass rund 5 % aller Cysteine eines Proteoms sulfinyliert vorliegen (Hamann *et al.*, 2002). Im Vergleich zur Sulfonylierung wurden bisher sehr wenige Zielproteine dieser Modifikation identifiziert. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass spezifische Proben zur Detektion von Sulfinsäuren erst seit kurzem verfügbar sind (Aker *et al.*, 2018; Lo Conte *et al.*, 2015). Neben der Identifikation von sulfinylierten Proteinen wird außerdem nach Zielproteinen für Srx bzw. nach Organismus-spezifischen Homologen des Proteins gescreent (Lo Conte and Carroll, 2013). Bisher konnte für verschiedene Proteine gezeigt werden, dass Sulfinsäuren ihre Aktivität regulieren. Während die Sulfinylierung von Prx zur Deaktivierung des Enzyms führt, aktiviert die Hydroxidation des Thiois im aktiven Zentrum von Matrixmetalloproteasen deren Proteasefunktion (Fu *et al.*, 2001). Es lässt sich somit nicht grundsätzlich von einer schädigenden Wirkung auf Proteine durch Hydroxidation ausgehen, sondern vielmehr auf eine individuelle, regulierende Funktion.

Werden Sulfinsäure weiter oxidiert, entstehen Sulfonsäuren. Diese stellen die höchste Form der Oxidation von Thiois dar und deaktivieren Proteine (Reddie and Carroll, 2008). Bisher ist keine Sonde zur spezifischen Identifikation von sulfonylierten Proteinen verfügbar. Des Weiteren ist wenig bekannt über die genauen regulatorischen Mechanismen, die dieser Modifikation zugrunde liegen.

1.1.3 S-Glutathionylierung

Protein S-Glutathionylierung zählt zu den reversiblen oxPTM und wird definiert als die reversible Bildung von gemischten Disulfiden zwischen dem antioxidativen Molekül Glutathion und Cysteinen mit niedrigem pK_a -Wert (Dalle-Donne *et al.*, 2007). Die Spezifität der Modifikation wird durch die Empfänglichkeit eines Cysteins ihr gegenüber bestimmt. Diese wird sterisch und elektrochemisch durch die Konformation eines Proteins bedingt (Rashdan *et al.*, 2020). So wird zum Beispiel der pK_a -Wert eines Cysteins durch umliegende Aminosäuren beeinflusst. Sind diese überwiegend positiv geladen, dann verringert dies den pK_a -Wert des Cysteins und macht es empfänglicher für Modifikationen (Rhee *et al.*, 2000). Die Modifikation wird sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei mildem oxidativen/nitrosativen Stress gebildet. Sie dient als Schutzmechanismus für Cysteine, indem sie die irreversible

Hyperoxidation dieser verhindert und dadurch die Proteinfunktion erhalten werden kann (Kalinina *et al.*, 2014). Durch die Modifikation scheinen vor allem Proteine des Zellsignaling sowie metabolischer Wege selektiv reguliert zu werden (Belcastro *et al.*, 2017; Dalle-Donne *et al.*, 2007). Hierbei kann es sowohl zu einer erhöhten als auch zu einer verringerten Aktivität des Proteins kommen (Rashdan *et al.*, 2020). S-Glutathionylierung kann enzymatisch und nicht-enzymatisch stattfinden (Abbildung 7). Die meisten Proteine werden enzymatisch durch Glutathion-S-Transferasen (GST) glutathionyliert. Weitere mögliche Reaktionswege sind die Bildung von S-Glutathionylierung über den Zwischenschritt der Sulfenylierung oder S-Nitrosierung. Die reversible oxPTM kann enzymatisch entfernt werden in einem Prozess, der als Deglutathionylierung bezeichnet wird. Die Reaktion wird hauptsächlich durch Glutaredoxin (Grx) katalysiert, kann aber auch durch Trx, Srx oder GST katalysiert werden (Zhang *et al.*, 2018). Hierbei wird GSH zu GSSG oxidiert und muss in einem weiteren Schritt unter NADPH-Verbrauch durch die Glutathion-Reduktase (GR) recycelt werden (Begara-Morales *et al.*, 2016).

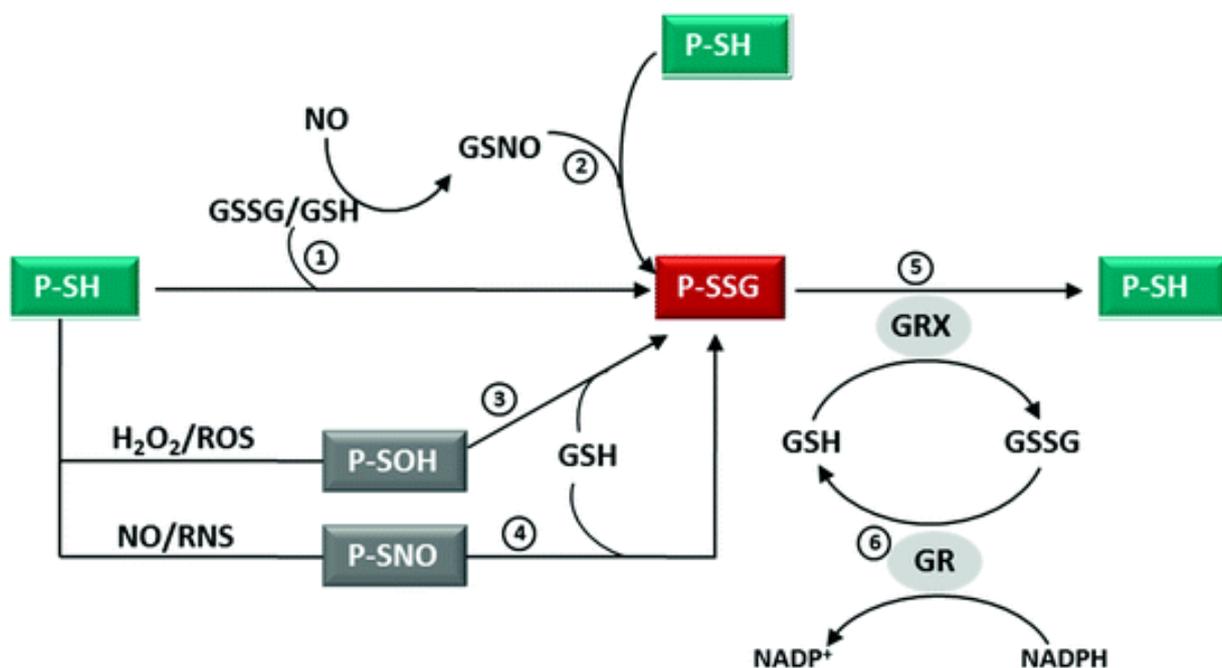


Abbildung 7 – Mechanismen der Protein S-Glutathionylierung und Deglutathionylierung

Verschiedene Reaktionen führen zu Protein S-Glutathionylierung (P-S-SG): (1) Ein Protein Thiol (P-SH) kann direkt durch Glutathion (GSSG/GSH) glutathionyliert werden. (2) GSH kann nitrosyliert werden zu S-Nitrosoglutathion (GSNO), welches wiederum ein Thiol glutathionylieren kann. (3) Durch Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt es zur Bildung einer Sulfensäure (-SOH). Diese kann mit GSH zu -SSG reagieren. (4) Ein Thiol wird durch reaktive Stickstoffspezies (RNS) nitrosiert (-SNO), bevor es nach Kontakt mit GSH glutathionyliert wird. (5) Deglutathionylierung findet hauptsächlich Glutaredoxin (Grx)-vermittelt statt. Hierbei wird GSH zu GSSG oxidiert. GSSG wiederum wird Nicotinamadenindinukleotid (NADPH)-abhängig durch die Glutathion-Reduktase (GR) zu GSH reduziert (Begara-Morales *et al.*, 2016).

1.1.4 S-Nitrosierung

Bei der reversiblen oxPTM S-Nitrosierung wird ein Nitrosoniumion (NO⁺) kovalent mit einem Thiol verknüpft (Murray and Van Eyk, 2012). In der Literatur wird analog zu S-Nitrosierung

auch der Begriff S-Nitrosylierung verwendet. Chemisch gesehen bezeichnet der Prozess der Nitrosierung die Verknüpfung einer Nitroso-Gruppe mit einer anderen chemischen Gruppe. Bei der Nitrosylierung hingegen wird eine Nitrosyl-Gruppe mit einem Metall koordiniert (Martínez-Ruiz and Lamas, 2004). Durch die Verwendung des Präfixes „-S“ wird impliziert, dass der NO-Teil mit einem Schwefelatom die S-NO-Bindung eingeht. Da die meisten PTM-Bezeichnungen auf „-ylierung“ enden, kann daher der Begriff der S-Nitrosylierung analog zu S-Nitrosierung verwendet werden. Neben Proteinen können auch niedermolekulare Thiole wie GSH und Coenzym A nitrosiert werden zu GSNO bzw. S-Nitroso-Coenzym A (Stomberski *et al.*, 2019). Diese oxPTM darf jedoch nicht mit der Nitrierung verwechselt werden, bei welcher eine Nitrogruppe (-NO₂), bevorzugt an Tyrosin, bindet (Martínez-Ruiz and Lamas, 2004).

Obwohl unter physiologischen Bedingungen die intrazelluläre NO-Konzentration mit ca. 10 nM relativ gering ist, kann diese bei pathophysiologischen Prozessen durch Aktivierung der iNOS auf über 1 µM steigen (Belcastro *et al.*, 2017). Hierbei scheint die S-Nitrosierung das jeweilige Cystein vor irreversibler Hyperoxidation zu schützen (Murphy *et al.*, 2012). Durch die oxPTM kann die Bildung von intra-/intermolekularen Disulfidbrücken begünstigt/verhindert werden. Dies ist abhängig von der räumlichen Nähe bzw. Orientierung eines weiteren Thiols (Hess *et al.*, 2005). Gleichzeitig bestimmen Aminosäuregruppen in der räumlichen Nähe die Stabilität der Modifikation (Hess *et al.*, 2005). Die reversible S-Nitrosierung weist eine hohe zeitliche und räumliche Spezifität auf. Verantwortlich hierfür ist eine Colokalisation von NO-Quellen und Zielproteinen, welche gleichzeitig zu einer hohen Spezifität der oxPTM führt (Sun *et al.*, 2006). Studien haben gezeigt, dass meist nur ein Cystein, bzw. wenige pro Protein, nitrosiert werden, dies jedoch ausreichend ist, um eine Funktionsänderung zu verursachen. Das Niveau der S-Nitrosierung wird bestimmt durch die Denitrosylaseaktivität, wobei vor allem das Trx-System die Denitrosylierung katalysiert (Stomberski *et al.*, 2019).

Neben der direkten S-Nitrosierung kann es auch zu einer Transnitrosierung kommen, welche thermodynamisch bevorzugt wird (Stomberski *et al.*, 2019). Im Rahmen des NO-Signaling gibt hierbei ein nitrosiertes Protein die NO-Gruppe an ein freies Thiol weiter (Sun *et al.*, 2006). Das abgebende Protein wird als NO-Donor bzw. Transnitrosylase bezeichnet und das aufnehmende Protein als NO-Akzeptor (Mnatsakanyan *et al.*, 2019).

1.2 Malaria

Der Begriff Malaria stammt aus dem Italienischen von *male aria*, was übersetzt „schlechte Luft“ bedeutet. Im Mittelalter wurde angenommen, dass die Erkrankung durch übelriechende Luft in Sumpfgeländen übertragen wurde. Erst 1880 gelang es Alphonse Laveran den einzelligen Erreger dieser Erkrankung zu identifizieren (Cox, 2010). Verursacht wird Malaria durch einen eukaryotischen Parasiten, *Plasmodium*. Das Protozoon gehört zu dem Stamm der Apicomplexa und wird während einer Blutmahlzeit von einem weiblichen *Anopheles*-Moskito übertragen (White *et al.*, 2014). Weltweit sind ca. 70 *Anopheles* Arten in der Lage, *Plasmodium* zu übertragen (Tizifa *et al.*, 2018). Der Parasit zeichnet sich durch einen komplexen Lebenszyklus aus (Tuteja, 2007). Von den bekannten über 120 *Plasmodium* Arten sind nur sechs humanpathogen: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale curtisi* und *P. ovale wallikeri* (Cowman *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2009). *P. knowlesi* infiziert Langschwanzmakaken, kann aber auch als Zoonose auf Menschen übergehen. *P. falciparum* und *P. vivax* sind für die meisten Erkrankungen weltweit verantwortlich (WHO, 2020). Ersterer

tritt vor allem in Subsahara-Afrika auf und führt zu den schwersten Formen von Malaria und damit verbunden zu den höchsten Sterberaten. Als einziger *Plasmodium* Vertreter kann er zu zerebraler Malaria führen. Die Armut-assoziierte Erkrankung bedroht vor allem Menschen in Afrika (rund 94% aller Fälle), Südostasien und dem Mittelmeerraum (Abbildung 8). In vielen dieser oftmals von Bürgerkriegen betroffenen Regionen gibt es nur eine unzureichende Gesundheitsversorgung und keine ausreichende Infrastruktur, um uneingeschränkten Zugang zu Medikamenten sowie Präventionsmitteln zu gewährleisten. Gleichzeitig begünstigt vor allem in den Tropen das Klima die Verbreitung des Vektors *Anopheles*.

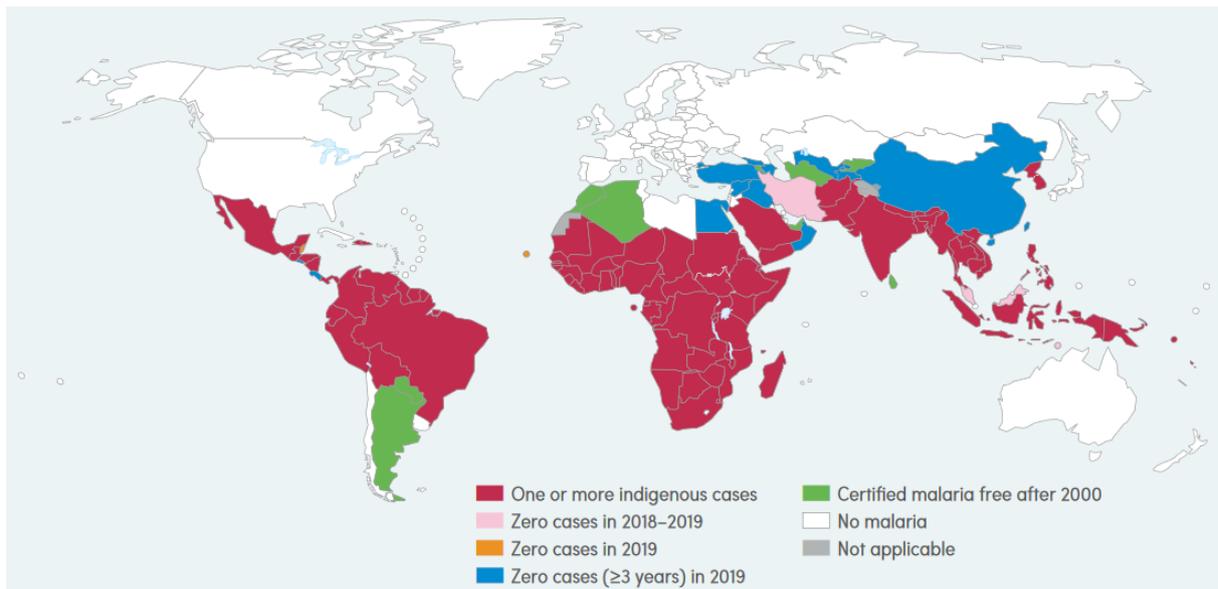


Abbildung 8 – Globales Vorkommen von Malaria

Weltweit werden Malariaerkrankungen vor allem in Afrika, Südostasien sowie dem Mittelmeerraum registriert. Farblich hinterlegt sind Ländern, in denen Malaria im Jahr 2000 endemisch war. In magenta hinterlegt sind Länder, in welchen 2019 mehr als ein Fall von Malaria dokumentiert wurde. Wurden in einem Land länger als drei Jahre keine Malaria-Fälle registriert, dann gilt die Krankheit in dem Land als ausgerottet (WHO, 2020).

In den letzten Jahren konnte sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität von Malariainfektionen gesenkt werden. Wurden 2010 weltweit noch 251 Millionen Fälle von Malaria registriert, so lag die Zahl 2019 bei 229 Millionen. Zeitgleich sank die Mortalität von 585.000 auf 409.000 Personen. Am gefährdetsten sind nach wie vor immundefiziente Personen. Dazu zählen Kinder unter fünf Jahren, Schwangere sowie ältere Menschen (WHO, 2020). Zur Bekämpfung der Erkrankung werden drei Strategien angewandt: die Vektorkontrolle, die Chemoprävention, und das Fallmanagement (Cowman *et al.*, 2016). Die Vektorkontrolle basiert hauptsächlich auf dem Einsatz von mit Insektiziden behandelten Moskitonetzen und dem Ausbringen von Insektiziden in Innenräumen (WHO, 2020). Bei der Chemoprävention wird versucht mittels Medikamenten einen Ausbruch der Krankheit nach einer *Plasmodium* Übertragung zu verhindern. Vor allem für Schwangere, junge Kinder und Reisende wird diese Behandlung empfohlen (Ashley *et al.*, 2018; Tizifa *et al.*, 2018). Ein zweiter Ansatz der Chemoprävention basiert auf der Entwicklung eines Impfstoffs gegen Malaria. RTS,S/AS01, auch bekannt als Mosquirix™, ist aktuell der vielversprechendste Kandidat (Wilby *et al.*, 2012). In der klinischen

Phase III Studie konnte eine Effizienz von 28,3 % (5-17 Monate alte Kinder) und 18,3 % (6-12 Wochen alte Kinder) erreicht werden. Die geringe Effizienz liegt vermutlich in der hohen Varianz des *Plasmodium circumsporozoite protein*, welche eine Immunevasion des Parasiten begünstigt (Khan *et al.*, 2020). Für das Fallmanagement wird eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie bei unkomplizierten Malariainfektionen empfohlen (WHO, 2020). Bei schweren Krankheitsverläufen wird Artesunat verabreicht und zusätzlich Symptome wie beispielsweise schwere Anämie, Hypoglykämie, Hypovolämie und Azidose behandelt (Ashley *et al.*, 2018). Zunehmend erschwert wird die Behandlung der Erkrankung durch resistente Parasiten (Menard and Dondorp, 2017). Obwohl durch die Kombination von Artemisinin mit anderen Antimalariamedikamenten die Gefahr einer Resistenzbildung verringert wird, treten in Südostasien bereits resistente Parasiten auf (Conrad and Rosenthal, 2019). Die Entwicklung von neuen Medikamenten ist daher ein wesentlicher Bestandteil zur Bekämpfung von *Plasmodien*.

1.2.1 Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Der Lebenszyklus des Parasiten ist komplex und findet in zwei verschiedenen Organismen statt. Man unterscheidet humane Leberstadien (exoerythrozytäre Schizogonie), Blutstadien (erythrozytäre Schizogonie) und Moskitostadien (sporogonischer Zyklus). Ein weiblicher *Anopheles* Moskito überträgt 15-20 Sporozoiten bei einer Blutmahlzeit. Nach weniger als 30 min erreichen diese über den Blutstrom die Leber, in welcher sie sich in den Hepatozyten zu Gewebeschizonten differenzieren. Während der exoerythrozytären Schizogonie entwickeln sich aus einem Gewebeschizonten 10.000-30.000 Merozoiten. Durch den Parasiten induziert, schnüren sich aus der infizierten Hepatozyte Membransäckchen, sogenannte Merosomen, ab. Diese gelangen in den Blutstrom ohne durch das Immunsystem eliminiert zu werden (Sturm *et al.*, 2006). Nach Erreichen der Lungenkapillare kommt es zur Merosomenruptur und freigesetzte Merozoiten können Erythrozyten infizieren. *P. vivax* und *P. ovale* können sogenannte Hypnozoiten bilden, dies sind dormante Leberstadien, welche Monate bis Jahre später zu einem erneuten Ausbruch der Krankheit führen können (White *et al.*, 2014). Beim erythrozytären Zyklus unterscheidet man verschiedene Stadien. Merozoiten infizieren Erythrozyten und differenzieren dann intrazellulär weiter zum sogenannten Ringstadium. Knapp 20 h nach der Invasion spricht man von Trophozoiten. In diesem Stadium wird die Verdauungsvakuole mit dem darin enthaltenen Hämozoin sichtbar. 38-48 h nach der Invasion ist der Erythrozyt komplett mit Parasiten ausgefüllt und wird als Schizont bezeichnet. Die sich differenzierenden Merozoiten sind erkennbar. Nach 48 h kommt es zur Schizontenruptur und 16-32 Merozoiten werden in den Blutstrom entlassen. Die genannten Zeiten beziehen sich auf den *in vitro* Lebenszyklus und können *in vivo* variieren. Nach 3 bis 90 sec treffen Merozoiten auf nicht infizierte Erythrozyten und ein neuer Infektionszyklus startet. Einige Merozoiten differenzieren in die sexuelle Form, die sogenannten Gametozyten. Diese sind nicht pathogen und können von einem Moskito im Rahmen einer Blutmahlzeit aufgenommen werden. In dem Moskito findet daraufhin die sexuelle Vermehrung statt. Der sporogene Zyklus dauert 10 bis 14 Tage und findet im Mitteldarm von *Anopheles* statt. Aus Mikrogameten werden Makrogameten, welche sich weiter in Ookineten und Oozysten entwickeln. Aus diesen werden Tausende von infektiösen Sporozoiten freigesetzt, welche in die Speicheldrüse der Mücke migrieren. Von dort aus können sie während der nächsten Blutmahlzeit transfiziert werden (Schlitzer, 2008) (Abbildung 9).

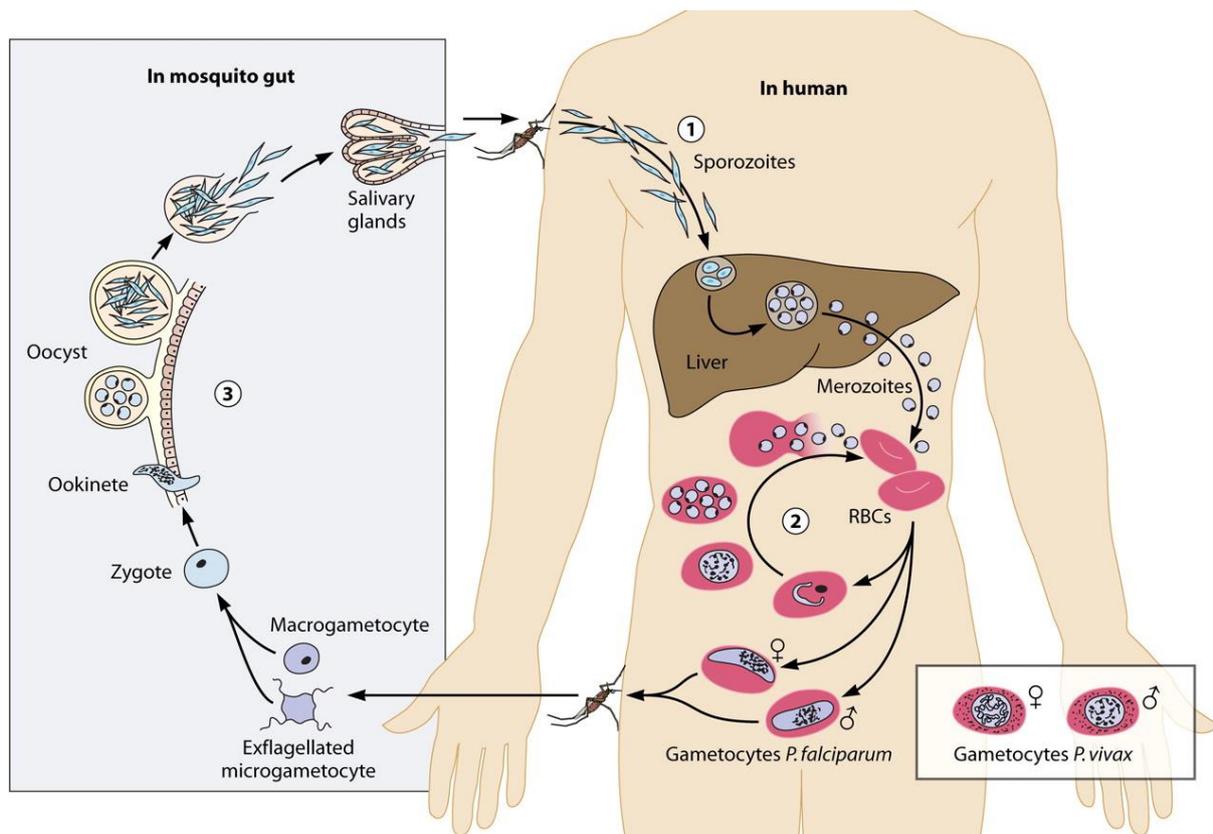


Abbildung 9 – Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Plasmodium Parasiten durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus, welcher sich über den Vektor *Anopheles* sowie den menschlichen Wirt erstreckt. Man unterscheidet hierbei die Leberstadien, die Blutstadien und die Moskitostadien. Ein weiblicher infizierter Mosquito überträgt bei einer Blutmahlzeit Sporozoiten auf einen Menschen. Diese wandern über den Blutstrom in die Leber (1), in welcher sie in die Hepatozyten eindringen und sich zu Schizonten differenzieren. Nach ca. einer Woche bersten diese und entlassen Merozoiten in den Blutstrom. Die Parasiten infizieren Erythrozyten und starten ihre asexuelle Vermehrung (2). Einige Parasiten differenzieren zu Gametozyten, den sexuellen Stadien. Diese können bei einer erneuten Blutmahlzeit von einem Mosquito aufgenommen werden. In dem Vektor differenzieren sie dann zu Sporozoiten und dringen in die Speicheldrüsen ein, von wo aus ein erneuter Infektionszyklus starten kann (3). Modifiziert nach (Bousema and Drakeley, 2011).

1.2.2 Pathogenese und klinische Manifestation von Malaria

Die typischen Krankheitssymptome von Malaria werden durch den asexuellen intraerythrozytären Zyklus hervorgerufen. Sie treten erstmals auf, wenn die Parasitämie mehr als 100 Parasiten pro μL Blut übersteigt (Ashley *et al.*, 2018). Klassische Symptome sind mit Fieber, Schüttelfrost sowie Muskel- und Kopfschmerzen eher unspezifisch. Hervorgerufen werden diese Symptome durch die Schizontenruptur, bei welcher nicht nur Parasiten, sondern auch toxische Stoffwechselprodukte ins Blut abgegeben werden (Tuteja, 2007). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Symptomen kann die Infektion mit Malaria auch zu einer Ansammlung und Sequestrierung von Erythrozyten in verschiedenen Organen, wie beispielsweise Herz, Lunge, Niere, Plazenta, subkutanem Gewebe und dem Gehirn führen. Während der Infektion strukturiert der Parasit den Erythrozyten als terminal differenzierte Zelle

gemäß seinen eigenen Bedürfnissen um (*reviewed in* (Boddey and Cowman, 2013)). *Plasmodium* exprimiert und exportiert mehrere hundert Proteine während der intraerythrozytären Phase und gewährleistet so sein Überleben. Unter anderem ermöglichen diese Proteine den Zugang zu Nährstoffen, Protein *trafficking* sowie Mechanismen um dem menschlichen Immunsystem zu entkommen. Des Weiteren wird eine Restrukturierung des Zytoskeletts der Wirtszelle induziert. Hierdurch wird der Erythrozyt widerstandsfähiger gegenüber höheren Temperaturen (Fieber) sowie Scherstress (Cowman *et al.*, 2016). Zu den exportierten Proteinen gehören auch die Proteine der *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) Familie. Diese Proteine werden auf die Oberfläche von infizierten Erythrozyten exportiert. Dort vermitteln sie die Bindung an nicht-infizierte Erythrozyten sowie Endothelzellen. Der Parasit kann so nicht nur dem Immunsystem entkommen, sondern auch verhindern, dass seine Wirtszelle in der Milz abgebaut wird (Ghazanfari *et al.*, 2018).

Schwere Fälle von Malaria werden primär durch *P. falciparum* verursacht und äußern sich vor allem in zerebraler Malaria (ZM), akuter Lungenschädigung, akute Nierenschädigung und einer Azidose (Ashley *et al.*, 2018). Gerade junge Kinder zeigen schwere Krankheitsverläufe mit stark ausgeprägter Anämie. Mit zunehmendem Alter steigt der Immunschutz und es treten meist nur noch milde bis gar keine Symptome auf, während parallel oftmals eine konstante, geringe Parasitämie zu beobachten ist (Cowman *et al.*, 2016).

1.2.3 Redoxmetabolismus von *Plasmodium*

Verschiedene Faktoren tragen dazu bei, dass *Plasmodium* verstärkt oxidativen sowie nitrosativen Herausforderungen ausgesetzt ist. Sowohl in seinem Vektor *Anopheles* als auch im menschlichen Wirt greift das jeweilige Immunsystem den Parasiten an. Im Mitteldarmepithel des Moskito ist der Erreger hierbei ROS ausgesetzt und im menschlichen Wirt sowohl ROS als auch RNS (Becker *et al.*, 2004). Eine weitere Herausforderung besteht in der hohen Sauerstoff- und Eisenkonzentration *per se* in Erythrozyten. Diese begünstigen die Bildung von ROS über die Fentonreaktion (Müller, 2004). Zusätzlich entstehen durch die hohe metabolische Rate des Parasiten, insbesondere während des Verdauens von Hämoglobin (Hb), weitere ROS (Percário *et al.*, 2012). Hb wird in der Nahrungsvakuole abgebaut, um dem Parasiten Aminosäuren zu liefern. Gleichzeitig entsteht freies Häm (Ferroprotoporphyrin IX, FP) sowie Superoxid (O_2^-) (Loria *et al.*, 1999). An Hb gebundenes Eisen (Fe(II)) wird zu Fe(III) oxidiert. Mithilfe der Superoxiddismutase (SOD) wird O_2^- im Zytosol zu Wasserstoffperoxid umgewandelt. Parallel wird in der mitochondrialen Elektronentransportkette ebenfalls H_2O_2 gebildet. Verschiedene Redoxenzyme, u. a. Thioredoxin, sind in der Lage, H_2O_2 zu neutralisieren. Geschieht dies nicht oder nur unvollständig, kann H_2O_2 weiter zu hoch reaktiven Hydroxylradikalen (OH^\cdot) reagieren und damit zu schweren oxidativen Schäden führen (siehe Abbildung 10). Toxisches FP kann über verschiedene Wege entgiftet werden: Es kann an freie, Häm-bindende Proteine binden (Harwaldt *et al.*, 2002), mit Glutathion reagieren (Ginsburg *et al.*, 1998) oder zu Hämozoin (Malariapigment) kristallisieren (Egan *et al.*, 2002). In geringen Konzentrationen wirken ROS als Signalmoleküle, steigt ihre Konzentration jedoch zu stark an, führt dies zu schweren oxidativen Schäden an DNA, Lipiden sowie Proteinen im Parasiten und der Wirtszelle (Jortzik and Becker, 2012; Sharma *et al.*, 2012). Daher ist die Redoxhomöostase und adäquates Redoxsignaling essentiell, um dem Parasiten ein Wachstum und Überleben zu ermöglichen.

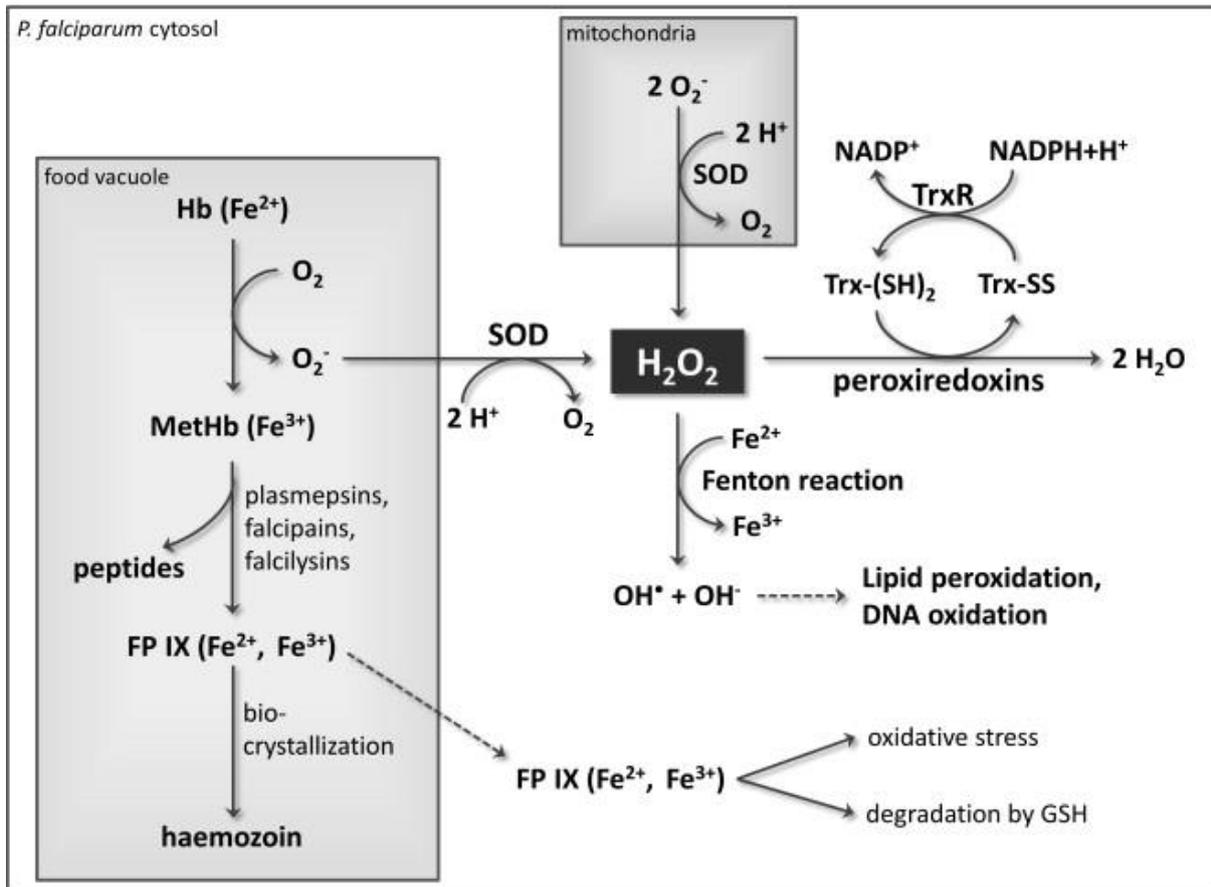


Abbildung 10 – Redoxmetabolismus in *P. falciparum*

Fe: Eisen, FP IX: Ferroprotoporphyrin IX, GSH: Glutathion, H₂O₂: Wasserstoffperoxid, Hb: Hämoglobin, MetHb: Methämoglobin, O₂⁻: Superoxidation, OH⁻: Hydroxidion, •OH: Hydroxylradikal, SOD: Superoxiddismutase, Trx: Thioredoxin, TrxR: Thioredoxinreduktase. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Text (Jortzik and Becker, 2012).

1.2.4 Redoxenzyme von Plasmodium

Mithilfe eines mannigfaltigen, antioxidativen Systems gewährleistet der Parasit sein Überleben. Obwohl der Einzeller nicht über die klassischen redoxregulierenden und antioxidativen Säugetierenzyme wie Katalase, Glutathionperoxidase und Srx verfügt (Sztajer *et al.*, 2001), schafft er es, die Kontrolle über seinen intrazellulären Redoxstatus zu behalten (Becker *et al.*, 2004). Hierbei hilft ihm vor allem das Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-abhängige Trx- und Glutathion (GSH)-System sowie zwei SOD (Chaudhari *et al.*, 2017; Jortzik and Becker, 2012). Die verschiedenen Redoxenzyme sind in verschiedenen Kompartimenten des Parasiten lokalisiert und schützen so die meisten Bereiche des Parasiten vor oxidativen Herausforderungen (Kehr *et al.*, 2010).

Zum Trx-System gehören zwei Isoformen der Thioredoxinreduktase (PfTrxR), welche über ähnliche kinetische Eigenschaften verfügen (Jortzik and Becker, 2012; Nickel *et al.*, 2006). Obwohl das Enzym hauptsächlich oxidiertes Trx reduziert, kann es auch Elektronen auf andere Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht übertragen (Jortzik and Becker, 2012). Hierbei transferieren zwei aktive Zentren die Elektronen von NADPH über FAD zu den

Disulfidsubstraten (siehe Abbildung 11). Des Weiteren gehören drei Thioredoxine (PfTrx1-3) zu dem System, von denen PfTrx1 am wichtigsten für die antioxidative Abwehr des Parasiten ist. Die drei PfTrx sind sowohl im Zytosol als auch im Mitochondrion lokalisiert und verfügen über ein klassisches Trx Cystein-Glutamin-Alanin-Cystein (CQAC) Motiv, mit welchem sie Zielproteine über einen Dithiolmechanismus reduzieren (siehe Abbildung 11) (Nickel *et al.*, 2006). Das zytosolische PfTrx1 wirkt oxidativem Stress entgegen, indem es nicht nur Zielproteine wie Plasmoredoxin (Plrx) und Peroxiredoxine sowie GSH reduziert, sondern auch u. a. H_2O_2 und GSNO neutralisiert (Kanzok *et al.*, 2000; Rahlfs and Becker, 2001; Rahlfs *et al.*, 2003). Weitere Proteine des Trx-Systems sind zwei Thioredoxin-like Proteinen (PfTlp1-2) sowie Plrx. Letzteres ist ein *Plasmodium spp.* spezifisches Protein, welches nicht lebensnotwendig für den Parasiten zu sein scheint. Seine Funktionen ähneln denen von PfGrx und PfTrx (Becker *et al.*, 2003a; Jortzik and Becker, 2012).

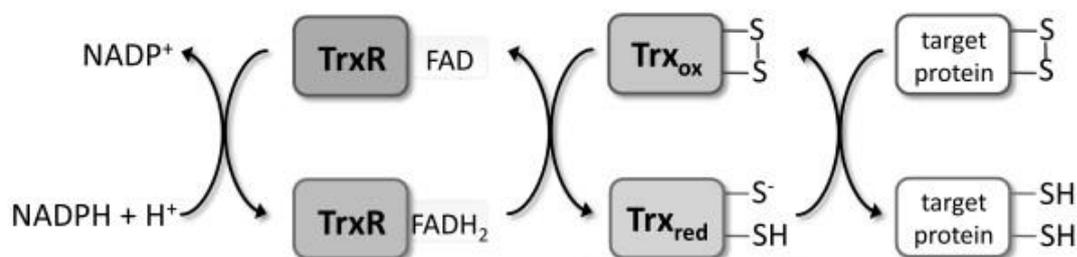


Abbildung 11 – Thioredoxinsystem von *P. falciparum*

Mittels eines Dithiolmechanismus ist Thioredoxin (Trx) in der Lage, Zielproteine zu reduzieren. Dabei wird das Protein selbst oxidiert und kann über das Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH)-abhängige Enzym Thioredoxinreduktase (TrxR) recycelt werden (Jortzik and Becker, 2012).

Ergänzt wird das Trx-System durch Trx-abhängige Peroxidasen (TPx) (Rahlfs and Becker, 2001). Aufgrund der Änderung der Nomenklatur sind diese Proteine mittlerweile besser bekannt als Peroxiredoxine (Prx). Insgesamt verfügt *Plasmodium* über fünf Prx (Deponte *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2012). Diese werden unterteilt in 1- und 2-Cys Prx, je nachdem wie viele Cysteine des aktiven Zentrums in die katalytische Aktivität involviert sind. TPx1 und TPx2, auch bekannt als PfPrx1a und PfPrx1m, gehören zu den 2-Cys Prx. PfPrx5, auch bekannt als *antioxidant* Protein (AOP), sowie PfPrx6 gehören zu den 1-Cys Prx (Sarma *et al.*, 2005). Das nukleäre PfPrxQ wurde erst vor einiger Zeit entdeckt und ist noch weitestgehend unerforscht (Richard *et al.*, 2011). Zur Ergänzung des antioxidativen Systems wird von dem Parasiten hPrx2 aus dem Erythrozyten importiert (Koncarevic *et al.*, 2009).

Das zweite wichtige antioxidative System ist das GSH-System. Dieses besteht aus Glutathion (GSH), einer Glutathionreduktase (GR), einer Glutathion-S-Transferase (GST), einer GSH-abhängigen Glyoxalase, drei Glutaredoxin-like Proteinen (Glp1-3) und einem Glutaredoxin (Grx) (Becker *et al.*, 2003b). Letzteres gehört mit seinem Cystein-Tyrosin-Prolin-Cystein (CPYC)-Motiv zur Thioredoxinfamilie. GSH wird nur in geringen Mengen von dem Parasiten aufgenommen, ist aber essentiell für das Überleben von *Plasmodium* in den Erythrozyten. Somit ist das intrazelluläre Verhältnis von GSH zu GSSG abhängig von dem Expressionslevel der GR, welche GSSG zu GSH reduziert, sowie der Biosynthese von GSH (Patzewitz *et al.*, 2012). Die durch GR katalysierte Reduktion von GSSG ist NADPH- und FAD-abhängig und trägt wesentlich dazu bei, intrazelluläres Glutathion reduziert zu halten (Jortzik and Becker,

2012). Dies ist vor allem deshalb wichtig, da GSSG-Konzentrationen über 100 μM zytotoxisch wirken (Becker *et al.*, 2003b). GSH kann u.a. toxisches Häm neutralisieren, Peroxide und oxidierte Proteine reduzieren sowie an der Regulation des Zellzyklus und der Genexpression teilnehmen (Aquilano *et al.*, 2014).

1.3 Macrophage migration inhibitory factor (MIF)

Der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) ist ein konserviertes Protein, welches in vielen verschiedenen Spezies von Pflanzen, über Cyanobakterien bis hin zu Säugetieren vorkommt. Neben einer immunmodulatorischen Funktion weist das humane Protein antioxidative Eigenschaften sowie eine katalytische Aktivität auf (Kleemann *et al.*, 1998a; Rosengren *et al.*, 1996). Das 115 Aminosäuren lange 12,5 kDa schwere Protein besteht aus zwei antiparallelen α -Helices, welche an ein viersträngiges β -Faltblatt ragen. Das Protein kristallisiert als Trimer, bei welchem zwei weitere β -Stränge eines Monomers mit β -Faltblättern von benachbarten Untereinheiten interagieren (Sun *et al.*, 1996). Unter physiologischen Bedingungen liegt das Protein sowohl als Monomer, Dimer sowie als Trimer vor (Mischke *et al.*, 1998; Philo *et al.*, 2004).

1.3.1 MIF als chemotaktisches Zytokin

MIF wurde bereits 1966 als eines der ersten Zytokine beschrieben (David, 1966). Als Chemokin wirkt es vor allem auf Leukozyten chemotaktisch. Strukturell ist MIF nicht den klassischen Chemokinen zuzuordnen, da das Protein weder über ein N-terminales Cystein noch über die typische Chemokin-Faltung (*fold*) verfügt. Das pleiotrophe Zytokin wirkt pro-inflammatorisch und ist sowohl für die angeborene als auch die adaptive Immunantwort wichtig. Als Regulator der angeborenen Immunität induziert MIF die Produktion von verschiedenen Zytokinen und NO und wirkt antagonistisch gegen die immunsuppressiven Effekte von Glucocorticoiden (Calandra and Roger, 2003). Zellen des Immunsystems, Zellen des endokrinen Systems und Gewebszellen exprimieren MIF und lagern das Protein intrazellulär in Vesikeln (Calandra and Bucala, 2017). Ausgelöst durch Stimulation mit Lipopolysacchariden, Endotoxinen sowie Glucocorticoiden kann MIF über einen nicht-konventionellen Signalweg sezerniert werden (Calandra and Roger, 2003). Unter physiologischen Bedingungen liegt die Konzentration von MIF im Plasma bei ≤ 20 ng/mL (Regis *et al.*, 2010). Bei entzündlichen Prozessen, kardiovaskulären Erkrankungen, Krebserkrankungen und Infektionskrankheiten kann die extrazelluläre Konzentration stark ansteigen. Während eine hohe MIF-Konzentration bei einigen Erkrankungen mit einem negativen Verlauf assoziiert ist, konnte für andere Erkrankungen ein protektiver Effekt beobachtet werden (Voss *et al.*, 2019).

1.3.2 MIF-Rezeptoren

Der humane MIF ist in der Lage, an verschiedene Rezeptoren zu binden, was eine mögliche Erklärung für die breite Vielfalt seiner biologischen Funktionen bietet (Farr *et al.*, 2020). Je nach gebundenem Rezeptor werden andere Signalkaskaden aktiviert (Abbildung 12). Die Rezeptoren können zum Teil untereinander interagieren.

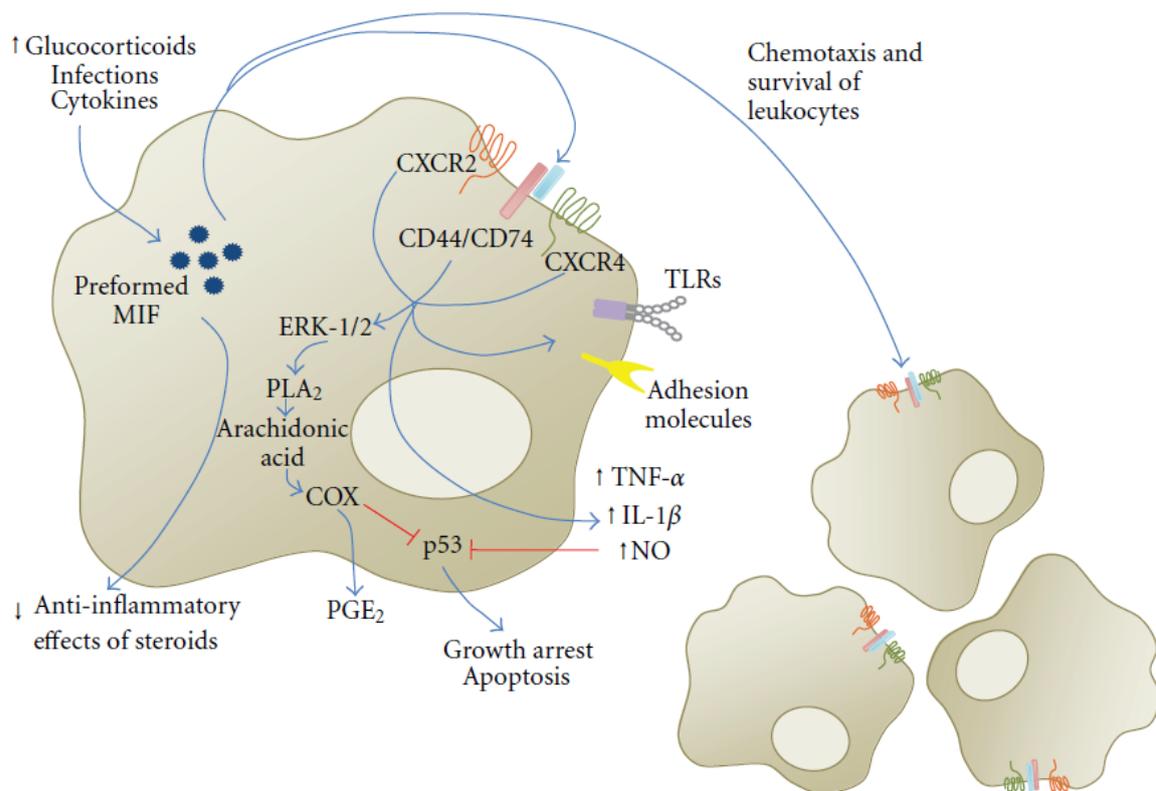


Abbildung 12 – Effekte der MIF-Sekretion

Durch externe Stimuli, wie gesteigerte Glucocorticoid-Level, wird die Sekretion von *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) ausgelöst. Dieser kann an verschiedene Rezeptoren binden und so intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Hierzu gehören unter anderem die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2. Es kommt zu einer gesteigerten Produktion und Sekretion von *tumor-necrosis-factor- α* (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Stickstoffmonoxid (NO). Außerdem wird die Expression von *Toll-like* Rezeptoren (TLR) und Adhäsionsmolekülen in Makrophagen gesteigert. MIF wirkt ebenfalls chemotaktisch und verbessert das Überleben von Leukozyten (Bozza *et al.*, 2012).

Der Hauptrezeptor für MIF ist der CD74-Rezeptor (*cluster of differentiation*) (Leng *et al.*, 2003). MIF bindet an die extrazelluläre Domäne von CD74, wobei CD74 alleine nicht in der Lage ist, eine Signalkaskade zu initiieren. Hierfür werden Co-Rezeptoren wie CD44 benötigt, welche mit ihren zytosomatischen Domänen Signalkomponenten rekrutieren können (Shi *et al.*, 2006). Es werden verschiedene für die Zellproliferation und das Überleben von B-Zellen und Makrophagen benötigte Signalwege aktiviert (Starlets *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2017). 2007 wurde ein weiterer Rezeptor für MIF identifiziert, der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor CXCR2 (Bernhagen *et al.*, 2007). Die Bindung an CXCR2 wird vermittelt durch ein *N-like loop* sowie ein Glutaminsäure-Leucin-Arginin (ELR) Motiv, bzw. im Fall von MIF durch ein Pseudo (E)LR Motiv (Weber *et al.*, 2008). Durch die Bindung von MIF an diesen Rezeptor kommt es zu einer intrazellulären Signalweitergabe, welche die Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen sowie eine Aktivierung von Integrin bewirkt. Letztere ermöglicht die Adhäsion von Monozyten ans Endothel (Bernhagen *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2015a). CXCR2 scheint dabei ähnlich wie CD44 als Co-Rezeptor für CD74 zu fungieren (Bernhagen *et al.*, 2007).

MIF kann auch an den CXC-Motiv Chemokinrezeptor CXCR4 binden. Neben einem *N-like loop* wird ein Arginin-Leucin-Arginin (RLR) Motiv und N-terminales Prolin für die Bindung von MIF benötigt (Lacy *et al.*, 2018). CXCR4 kann entweder direkt eine intrazelluläre Signalkaskade initiieren oder als Co-Rezeptor für CD74 fungieren. Hierbei kommt es zu einer T- und B-Zell-Rekrutierung (Bernhagen *et al.*, 2007; Sinitski *et al.*, 2019a). Als zusätzlicher Rezeptor wurde CXCR7 identifiziert. Hierzu liegt allerdings noch keine ausreichende Datenlage vor (Alampour-Rajabi *et al.*, 2015; Rafiei *et al.*, 2019).

1.3.3 Katalytische Aktivitäten von MIF

MIF gehört zu den *moonlighting* Proteinen, welche verschiedene, nicht miteinander im Zusammenhang stehende Funktionen ausüben. Neben seiner wichtigen immunmodulatorischen Funktion weist MIF zusätzlich katalytische Eigenschaften auf. Wie diese unterschiedlichen Funktionen im Zusammenhang stehen und reguliert werden, ist bisher noch nicht im Detail bekannt.

Tautomeraseaktivität

1996 beschrieben Rosengren *et al.* die katalytische Eigenschaft von MIF, das D-Enantiomer von 2-Carboxy-2,3-dihydroindol-5,6-quinon (D-Dopachrom), aber nicht L-Dopachrom, zu tautomerisieren (Rosengren *et al.*, 1996). Für Aktivitätsmessungen wird meist der Methylester von D-Dopachrom eingesetzt (Zapatero *et al.*, 2016). Weitere verwendete, nicht-physiologische Substrate sind Phenylpyruvat und *p*-Hydroxyphenylpyruvat (*p*HPP), welche von MIF Keto-Enol-tautomerisiert werden (Rosengren *et al.*, 1997). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das N-terminale Prolin-2 (P2) essentiell für die Tautomeraseaktivität ist (Bendrat *et al.*, 1997; Lubetsky *et al.*, 1999; Swope *et al.*, 1998). Diese Aminosäure zeigt im humanen MIF mit 5,6 einen ungewöhnlich niedrigen pK_a -Wert und wirkt als katalytische Base (Stamps *et al.*, 1998). Im Homotrimer ragen die P2 der Untereinheiten in das Interface zwischen den Monomeren. P2 scheint hierbei nicht nur für die Tautomeraseaktivität, sondern auch für die Interaktion mit dem CD74-Rezeptor wichtig zu sein (Zapatero *et al.*, 2016). Der *solvent channel*, welcher sich zwischen den Untereinheiten bildet, scheint hierbei nicht nur ein Ergebnis der Proteinfaltung zu sein, sondern enthält einen allosterischen Knoten, welcher wichtig für die Regulation der enzymatischen Aktivität ist (Pantouris *et al.*, 2020). In Mutanten, bei denen das P2 gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde, konnte keine Tautomeraseaktivität beobachtet werden, während die immunmodulatorischen Funktionen erhalten blieben (Bendrat *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass die biologischen Aktivitäten unabhängig voneinander wirken und die Tautomeraseaktivität nicht erforderlich für die Chemokinfunktion von MIF ist. Daten einer Tautomerase-defizienten *knock-in* Maus Studie, bei welcher P2 durch Glycin ausgetauscht wurde, deuten auf eine strukturelle Funktion von P2 bei Protein-Protein-Interaktionen hin (Fingerle-Rowson *et al.*, 2009). Wird P2 hingegen durch einen irreversiblen Inhibitor gehemmt, verliert MIF neben seiner Tautomeraseaktivität auch seine proinflammatorischen Effekte. Dies ist vermutlich auf eine Änderung der Proteinkonformation in der katalytischen Domäne zurückzuführen (Ouertatani-Sakouhi *et al.*, 2009). Generell konnte bisher kein physiologisches Substrat für MIF identifiziert werden. P2 ist hoch konserviert in verschiedenen Spezies, was darauf hindeutet, dass die Tautomeraseaktivität ein evolutionäres Artefakt sein könnte. Eine andere Erklärung für die Konservierung des P2 könnte dessen Bedeutung für die Proteinkonformation sein, welche

wichtig für die Rezeptorbindung ist. Aufgrund der negativen Korrelation der extrazellulären Konzentration von MIF und dem Verlauf verschiedener Erkrankungen wird intensiv an der Identifizierung von potenten Inhibitoren gearbeitet. Hierbei ist das (*S,R*)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazol Essigsäure-Methylester (ISO-1) ein vielversprechender Inhibitor. Dieser bindet im aktiven Zentrum an der gleichen Stelle wie *p*HPP und führt neben einer Inhibierung der Tautomeraseaktivität auch zu einer Beeinträchtigung der immunmodulatorischen Aktivität von MIF (Lubetsky *et al.*, 2002). Ob dies allein auf eine Konformationsänderung oder auch auf eine Inhibierung der (nicht-) physiologischen Tautomeraseaktivität zurückzuführen ist, ließ sich bisher nicht genau identifizieren.

Oxidoreduktaseaktivität

Strukturanalysen von MIF zeigten mit CALC (C57-XX-C60) ein klassisches CXXC-Motiv, welches charakteristisch für Proteine der Thioredoxin-Superfamilie mit Thiol-Protein Oxidoreduktase-Aktivität ist. Kleemann *et al.* gelang es, 1998 nachzuweisen, dass sowohl Insulin als auch 2-Hydroxyethyl-disulfid (HEDS) enzymatisch durch MIF reduziert werden können (Kleemann *et al.*, 1998a). Hierbei haben die drei Cysteine (C57, C60, C81) im humanen MIF einen unterschiedlichen Einfluss auf die Oxidoreduktaseaktivität. Die Mutation von C81 zu Serin (C81S) hat keinen messbaren Einfluss auf die Oxidoreduktaseaktivität, scheint aber einen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität zu haben. Die C57S Mutante zeigt eine Oxidoreduktase-Teilaktivität, welche bei C60S nicht mehr messbar ist (Kleemann *et al.*, 1999). Diese Beobachtung deutet auf einen Monothiolmechanismus bei der Katalyse hin (Thiele and Bernhagen, 2005). C81 kann nitrosiert werden, was zu einer Verstärkung der Oxidoreduktaseaktivität zu führen scheint. Dies ist assoziiert mit kardioprotektiven Effekten (Luedike *et al.*, 2012). Insgesamt ist die Oxidoreduktaseaktivität von MIF wesentlich geringer als die von Trx oder Grx. Bisher ist auch kein physiologisches Substrat für die Aktivität bekannt. Es wäre möglich, dass MIF vielmehr als Donator von reduzierenden Äquivalenten über seine reduzierten CXXC Thiolgruppen dient (Thiele and Bernhagen, 2005).

Mittlerweile konnten verschiedene biologische Funktionen der Oxidoreduktaseaktivität nachgewiesen werden. Verschiedene Zellen wie bspw. Makrophagen und Epithelzellen können MIF nach einem H₂O₂ Stimulus sezernieren (Fukuzawa *et al.*, 2002). Sezernierter MIF kann anschließend das intrazelluläre Level von GSH modulieren und trägt so zu dem antioxidativen System bei (Nguyen *et al.*, 2003a). Gleichzeitig kann MIF durch oxidativen Stress induzierte Apoptose in verschiedenen Zellen, wie beispielsweise Immunzellen, reduzieren (Nguyen *et al.*, 2003a). Auch bei der MIF-vermittelten Funktion von Immunzellen scheint das CXXC-Motiv eine wichtige Funktion auszuüben. Die C60S Mutante konnte unter *in vitro* Bedingungen keine Makrophagen aktivieren und zeigte nur 37 % der antagonistischen Wirkung von MIF gegen Glucocorticoide (Kleemann *et al.*, 1998b, 1999). Andere Daten deuten darauf, dass das CXXC-Motiv einen Einfluss auf die Konformation des Proteins in der Rezeptor-Bindung hat (Thiele and Bernhagen, 2005). Es lassen sich also keine genauen Rückschlüsse ziehen, ob die Oxidoreduktaseaktivität oder eher das CXXC-Motiv in der Struktur des Proteins wichtig ist für die Regulation von inflammatorischen Effekten. Bekannt ist, dass MIF in der Lage ist mit anderen Proteinen, welche über Thiole oder Disulfide verfügen, zu interagieren. Eins dieser Proteine ist Insulin. Im *in vitro* Assay reduziert MIF die Disulfidbrücke zwischen der A- und B-Kette. Ob diese Reaktion auch im Organismus

stattfindet, konnte bisher noch nicht gezeigt werden, jedoch kolokalisiert MIF mit Insulin in den β -Zellen des Pankreas (Waeber *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen legen nahe, dass MIF an der Regulation von MIF-bindenden Proteinen beteiligt sein könnte.

Nukleaseaktivität

Wang *et al.* gelang es 2016, eine Endonukleaseaktivität für MIF nachzuweisen (Wang *et al.*, 2016). Diese spielt eine entscheidende Rolle bei dem Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod Parthanatos. PAR steht hierbei für Poly(ADP-Ribose), welche beteiligt ist an der Signalweitergabe bei dem programmierten Zelltod. Nach Schädigung der DNA, beispielsweise durch ROS, kommt es zu einer Überaktivierung der PAR Polymerase-1 (PARP-1). Diese produziert PAR-Polymere, welche aus dem Nukleus ins Zytosol translozieren. Dort induzieren sie die Freisetzung von *apoptosis-inducing factor* (AIF) aus Mitochondrien. Dieser Faktor gelangt anschließend in den Nukleus, woraufhin die DNA fragmentiert wird. Lange Zeit war nicht bekannt, wie es hierbei zum Zelltod kommt, da AIF selbst keine Nukleaseaktivität aufweist. Es konnte in obengenannter Studie gezeigt werden, dass AIF hMIF rekrutiert, welcher wiederum in einer Kalzium- und Magnesium-abhängigen Reaktion als Endonuklease aktiv wird. Neuere Studien zeigen, dass der *knock-down* von hMIF zu einem Schutz von Neuronen vor Parthanatos im Zusammenhang mit Rückenmarksverletzung führt (Yang *et al.*, 2020).

1.3.4 MIF Homologe in Parasiten

Evolutionär gesehen ist MIF ein altes Molekül, welches von einem Verteidigungsmolekül abstammt. In vielen Organismen wurden *mif*-ähnliche Gene identifiziert und in einer Vielzahl von Spezies konnten MIF-Proteine charakterisiert werden. Neben Bakterien, Pflanzen, Vögeln, Helminthen, Mollusken, Arthropoden, Nematoden, Fischen und Amphibien wurden homologe Proteine auch in Protozoen gefunden (*reviewed in* (Sparkes *et al.*, 2017)). Hierbei zeigte sich, dass das N-terminale Prolin in allen bekannten MIF-Proteinen streng konserviert ist, wohingegen das CXXC-Motiv weniger konserviert ist. MIF-Homologe in Vertebraten scheinen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort involviert zu sein und dabei Zellmigration, pro-inflammatorische Zytokinsekretion und Zelldifferenzierung zu beeinflussen (Bozza *et al.*, 2012). Bei Invertebraten wie Mollusken hingegen, welche über keine adaptive Immunantwort verfügen, scheinen MIF-Homologe eine Funktion bei der angeborenen Immunität auszuüben (Huang *et al.*, 2016). Eine besondere Aufgabe scheinen MIF-Homologe in Parasiten zu haben. Diese verändern die Immunantwort des Wirtes bei einer Infektion und sind involviert in Immunevasion, Parasiteninvasion und Pathogenese (Ghosh *et al.*, 2019). Strukturell ähneln diese Homologe hMIF, binden ebenfalls an CD74 und stimulieren Immun- und Epithelzellen, Zytokine wie TNF- α , IL-8 und IL-12 freizusetzen (Baeza Garcia *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2012). Gleichzeitig wird vom Wirtsorganismus bei einer parasitären Infektion die MIF-Expression gesteigert. Obwohl hohe Level an MIF gefährlich für den Wirt zu sein scheinen, werden sie auf der anderen Seite benötigt, um Parasiten bei Leishmaniose, Trypanosomiasis, Toxoplasmose, Coccidiose und Neosporose unter Kontrolle zu halten (de Dios Rosado and Rodriguez-Sosa, 2011). Diese Erkrankungen werden alle durch Protozoen hervorgerufen. MIF-Homologe in Protozoen weisen $\leq 30\%$ Sequenzidentität zu hMIF auf. Trotzdem konnte für die meisten dieser Proteine eine Tautomeraseaktivität und eine Bindung an den humanen CD74-Rezeptor nachgewiesen werden (Abbildung 13).

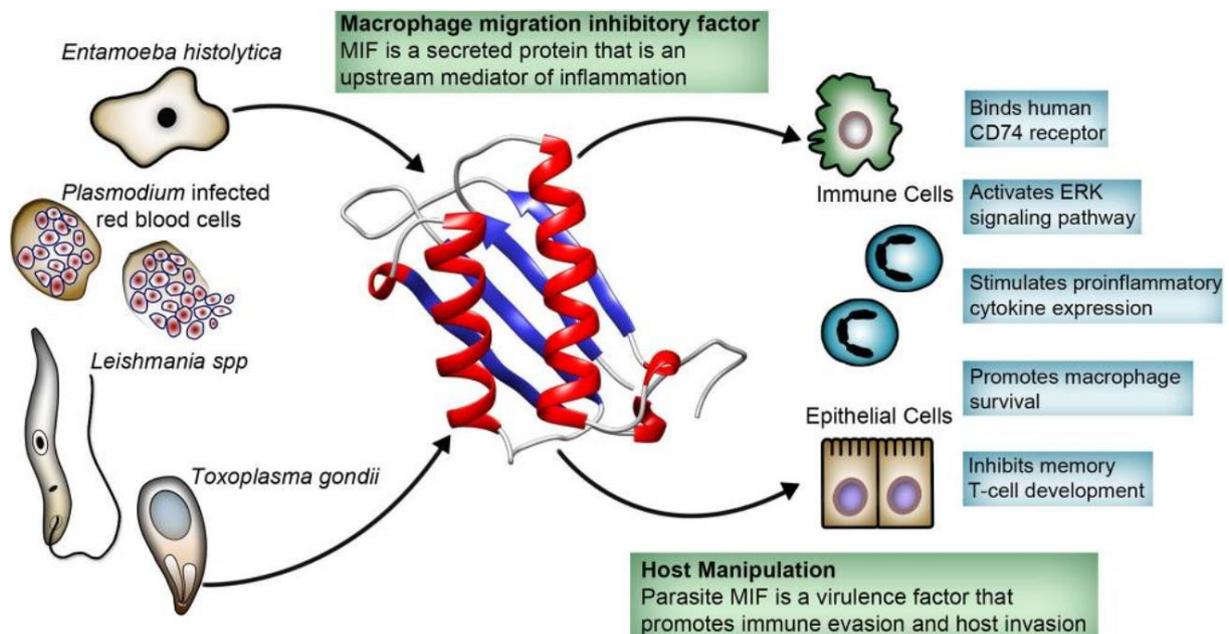


Abbildung 13 – Einfluss von Protozoen MIF auf den Wirt

Protozoen sezernieren ihre *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Proteine im Wirt. MIF-Proteine weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu hMIF auf und können an CD74 binden. Sie wirken als Virulenzfaktor und lösen verschiedene immunmodulatorische Effekte aus (Ghosh *et al.*, 2019).

Der obligat intrazelluläre Einzeller *Leishmania major* infiziert Makrophagen und sezerniert zwei MIF-Homologe (LmMIF-1 und -2). LmMIF-2 wird in allen Lebensstadien exprimiert, während LmMIF-1 (Lm1740MIF) nur in Amastigoten gefunden wird (Richardson *et al.*, 2009). Diese Stadien sind für das Krankheitsbild der Leishmaniose verantwortlich. Lm1740MIF kann an CD74 binden und den ERK 1/2 MAPK Weg induzieren. Gleichzeitig wird die Aktivierungsinduzierte Apoptose von Makrophagen inhibiert. So kann der Parasit sein intrazelluläres Überleben verbessern (Kamir *et al.*, 2008). *Toxoplasma gondii* sezerniert ebenfalls ein MIF-Homolog (TgMIF) welches den ERK 1/2 MAPK Weg in Makrophagen aktiviert sowie die IL-8 Produktion stimuliert. Letzteres wirkt chemotaktisch auf Neutrophile. Diese werden zwar benötigt um den Parasiten effektiv zu eliminieren, können aber gleichzeitig dessen Infektion begünstigen. Nach Stimulation durch den Makrophagen sezernieren sie CCL3, 4, 5 und 20, welche wiederum chemotaktisch auf dendritische Zellen wirken. Diese werden dann von dem Protozoon infiziert und ermöglichen so die Verbreitung des Parasiten (Sommerville *et al.*, 2013). Obwohl Lm1740MIF und TgMIF eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu hMIF aufweisen, unterscheiden sich die Parasiten-MIF im aktiven Zentrum der Tautomeraseaktivität wesentlich von dem humanen Protein. Dies ist ein guter Ansatzpunkt für die Entwicklung von Parasiten-spezifischen Inhibitoren.

1.3.5 MIF und Malaria

Verschiedene *Plasmodium* Spezies verfügen über ein MIF-Homolog (PMIF) (Tabelle 1). Dieses ist in der Lage, das Immunsystem des Wirtes während einer Infektion zu modulieren,

um optimale Bedingungen für die Etablierung der Infektion zu induzieren (Abbildung 13). Gleichzeitig reagiert der Wirt mit einer Veränderung der eigenen MIF-Expression und -Sekretion auf die Infektion mit dem Ziel, diese zu eliminieren. Es kommt hierbei zu keiner Kreuzreaktivität zwischen PMIF-Antikörpern und Wirts-MIF (Ghosh *et al.*, 2019).

Rolle von Wirt-MIF während Infektion mit *Plasmodium*

Der Einfluss des Wirt-MIF auf die Infektion mit einem *Plasmodium* Parasiten ist ein komplexer Mechanismus, der noch nicht im Detail verstanden ist. hMIF als pro-inflammatorisches Zytokin stimuliert das angeborene und adaptive Immunsystem, den Parasiten zu bekämpfen (Bozza *et al.*, 2012). Freigesetzte Substanzen wie NO und IL können aber auch zu einer entzündungsinduzierten Gewebeschädigung im Wirt führen (Calandra and Roger, 2003; Han *et al.*, 2010). Verschiedene Studien an *P. falciparum* Infizierten zeigen zum Teil stark widersprüchliche Ergebnisse.

Generell scheint eine hohe TNF- α Produktion zu schwerer Malariaanämie (SMA) und zerebraler Malaria (ZM) bei Kindern zu führen (Perkins *et al.*, 2011; Thuma *et al.*, 2011). TNF- α wird verstärkt nach hMIF-Aktivierung des CD74-Rezeptors gebildet. Hohe Konzentrationen von hMIF im Plasma wurden mit dem Tod von an ZM Erkrankten in Indien assoziiert (Jain *et al.*, 2009). Auch Frauen mit plazentaler Malaria zeigten in einer Studie signifikant erhöhte hMIF-Level im intervillösen Blut (Chaiyaroj *et al.*, 2004). Ähnliches wurde bei Kindern in Sambia beobachtet (McDevitt *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu diesen Studien konnten Untersuchungen bei infizierten Kindern in Afrika niedrige Konzentrationen von hMIF messenger RNA und hMIF-Protein nachweisen. Diese waren invers korreliert mit der Parasitenlast sowie SMA. Somit scheint die effektive Produktion von hMIF in diesen Fällen eher einen protektiven Einfluss zu haben (Awandare *et al.*, 2006, 2007).

Es lässt sich aufgrund der aktuellen Datenlage nicht generell von einem schädigenden oder protektiven Effekt von Wirt-MIF auf den Krankheitsverlauf bei einer *Plasmodium* Infektion schließen. Verschiedene Faktoren könnten einen Einfluss haben und die widersprüchlichen Daten erklären. Die meisten Studien zu hMIF wurden in Malaria-Endemiegebieten durchgeführt. Hierbei lässt sich oftmals nicht genau identifizieren, wie oft die Probanden bereits zuvor mit *P. falciparum* infiziert waren. Somit kann eine Teilimmunität nicht komplett ausgeschlossen werden. Das Alter der untersuchten Probanden könnte ebenfalls einen Einfluss haben, genauso wie die Schwere der Erkrankung (Chaiyaroj *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010).

Rolle von PMIF während Infektion

Alle genomisch sequenzierten *Plasmodium* besitzen ein MIF-Homolog (PMIF), welches während der asexuellen Blutstadien sezerniert wird. Diese Homologe können an CD74 binden und immunmodulatorisch auf den Wirt wirken (Augustijn *et al.*, 2007; Dobson *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016) (Tabelle 1). Durch die Bindung von PMIF an den Rezeptor wird analog zu hMIF Chemotaxis und eine verringerte Apoptose von Makrophagen induziert (Shao *et al.*, 2008; Thorat *et al.*, 2010). PMIF ist allerdings im Gegensatz zu hMIF nicht in der Lage, Monozyten zu stimulieren und IL-8, IL-12 und TNF- α freizusetzen (Cordery *et al.*, 2007). Die Funktion von PMIF scheint hierbei konzentrationsabhängig zu variieren. Während sehr geringer PMIF

Konzentration agiert dieser synergistisch zu murinem MIF (mMIF) bei der Aktivierung des MAPK-ERK 1/2 Signalweges. Bei hohen Konzentrationen hingegen wirkt PMIF antagonistisch (Shao *et al.*, 2010). Das Zusammenspiel zwischen PMIF und Wirt-MIF scheint komplex zu sein und ist noch nicht im Detail verstanden.

Tabelle 1 – Charakterisierung von MIF-Homologen aus *Plasmodien*

+: Aktivität ist vorhanden, CD: *cluster of differentiation*, h: human, MIF: *macrophage migration inhibitory factor*, n. a.: nicht analysiert, Ox: Oxidoreduktaseaktivität, Taut: Tautomeraseaktivität, TLR: Toll-like Rezeptor. Tabelle modifiziert nach (Sparkes *et al.*, 2017).

Spezies	Sequenz-identität zu hMIF	Enzymatische Aktivität	CD74-Bindung	Identifizierte Funktion
<i>Plasmodium berghei</i>	30 %	Taut: + Ox: +	+	<ul style="list-style-type: none"> • In infizierte Erythrozyten sezerniert • Verringert die Dichte von Retikulozyten • Könnte ein geringes Level an Parasitämie aufrecht halten (Langzeitinfektion?)
<i>Plasmodium falciparum</i>	29 %	Taut: + Ox: +	+	<ul style="list-style-type: none"> • Freigesetzt aus Blutstadien • Inhibiert Migration von Monozyten • Reduziert Oberflächenexpression von TLR2, TLR4 und CD86 • Antioxidative Funktion für den Parasiten
<i>Plasmodium yoelii</i>	29 %	n. a.	+	<ul style="list-style-type: none"> • MIF-defiziente Parasiten können Zellteilung nicht regulieren und daher im Leberstadium nicht wachsen • Erhöht die Sekretion von pro-inflammatorischen Faktoren

PMIF wird in den Blutstadien des Parasiten detektiert, während über die Funktion in den Leberzellstadien wenig bekannt ist. Miller *et al.* untersuchten erstmals den Einfluss von *P. yoelii* MIF (PyMIF) auf die Hepatozytenstadien in Mäusen. PyMIF scheint für effektives Parasitenwachstum benötigt zu werden. Dieser Effekt scheint unabhängig zu sein von einer Beeinflussung des Immunsystems des Wirts (Miller *et al.*, 2012). Neutralisation von PMIF durch Antikörper in mit *P. berghei* (Pb) infizierten Mäusen zeigte, dass das Parasitenprotein die Differenzierung von murinen CD4 T-Zellen zu Gedächtniszellen hemmt. Durch die mangelnde Ausbildung einer protektiven Immunität des Wirts gegen den Erreger, kann es zu einer erneuten Infektion kommen (Baeza Garcia *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2012). Dies erschwert die effektive Bekämpfung von Malaria stark. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wird aktuell an der Entwicklung eines PMIF messenger RNA basierten Impfstoffs gegen Malaria gearbeitet (Bucala and Geall, 2021).

Das *P. falciparum* MIF Homolog (PfMIF, PF3D7_1229400) ist 116 Aminosäuren lang und weist trotz nur geringer Sequenzidentität eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu hMIF auf (Augustijn *et al.*, 2007). Das Monomer besteht aus einem viersträngigen β -Faltblatt, dem zwei antiparallele α -Helices gegenüberstehen. Das Lösen der Kristallstruktur zeigte ein Homotrimer. Durch die Trimerisierung bildet sich ein von Monomeren umschlossener *solvent channel* (Abbildung 14).

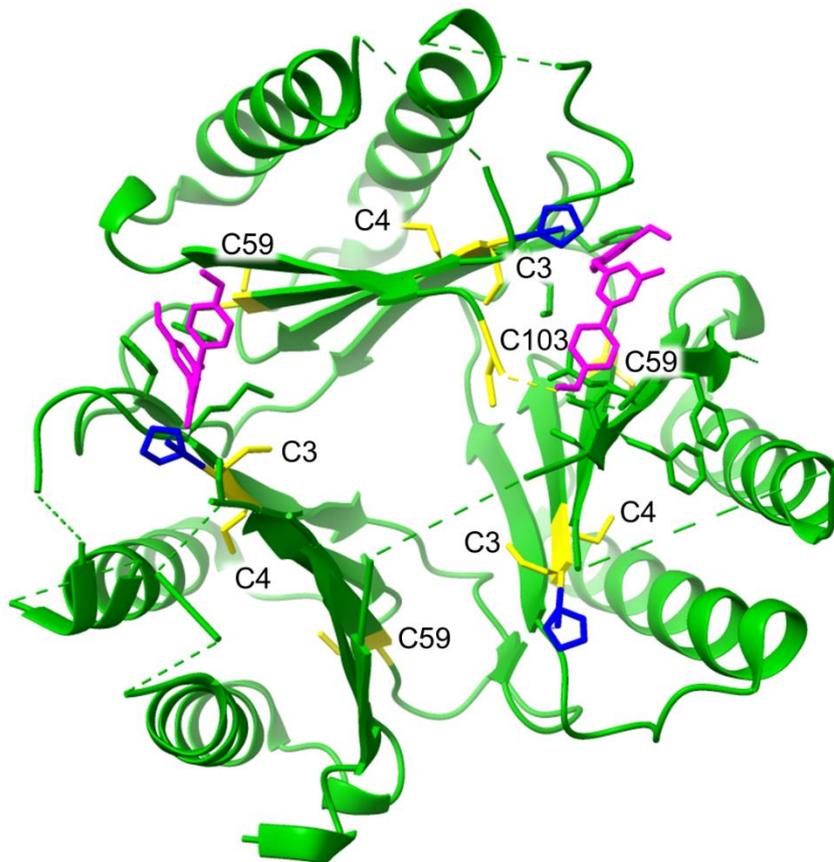


Abbildung 14 – Kristallstruktur von PfMIF im Komplex mit einem Inhibitor (4P7S)

PfMIF kristallisiert als Homotrimer. Die Monomere bilden dabei einen zentral gelegenen *solvent channel*. In gelb hervorgehoben sind die Cysteine der drei Untereinheiten. In blau markiert sind die N-terminalen Proline (P2). In magenta ist der Inhibitor 4-(3-Methoxy-5-methylphenoxy)-2-(4-methoxyphenyl)-6-methylpyridin hervorgehoben. Dieser bindet im mit der Tautomeraseaktivität assoziierten aktiven Zentrum. Aufgrund fehlender Elektronendichte in einigen Regionen fehlen C-terminale Reste der Monomere. Nur bei einem Monomer ist das vierte Cystein, C103, definiert (Pantouris *et al.*, 2014).

Dobson *et al.* identifizierten zwei Konformationen des Proteins (Dobson *et al.*, 2009). In der offenen Konformation ist das für die Tautomeraseaktivität verantwortliche aktive Zentrum am N-Terminus des Proteins zugänglich. Durch die Ausbildung eines Disulfid zwischen C3 und β -Mercaptoethanol scheint sich die Konformation des aktiven Zentrums zu ändern, sodass dieses in eine geschlossenen Konformation übergeht. PfMIF zeigt eine geringere Sequenzkonservierung im Bereich der katalytischen Domänen verglichen mit hMIF. In *in vitro* Assays zeigt PfMIF fünfmal weniger Aktivität im Tautomeraseassay und im Oxidoreduktaseassay als hMIF (Augustijn *et al.*, 2007). Das aktive Zentrum der Tautomeraseaktivität ist

insgesamt stärker negativ geladen als das von hMIF. Für die Oxidoreduktaseaktivität sind in hMIF C57 und C60 als Bestandteil eines CXXC-Motives verantwortlich. Dieses Motiv der Vertebraten ist nicht konserviert. In PfMIF befindet sich an dieser Stelle C59, welches C57 in hMIF entspricht. Dieses Cystein ist in einem hydrophoben Kern einer Seitentasche lokalisiert und somit nicht zugänglich (Dobson *et al.*, 2009). Für die beobachtete Restaktivität in PfMIF könnten C3 und C4 verantwortlich sein (Alam *et al.*, 2011). Diese bilden ein Chemokin-ähnliches CC-Motiv am N-Terminus des Proteins. Für C3 konnte bereits eine Redoxreaktivität nachgewiesen werden (Dobson *et al.*, 2009).

mif wird in allen Lebensstadien von *P. falciparum* exprimiert. Im Ringstadium ist PfMIF fast vollständig im Parasiten lokalisiert. Im Trophozoitenstadium wird das Protein auch im infizierten Erythrozyten detektiert. Wie sein humanes Homolog verfügt PfMIF über kein Signalpeptid, wird aber nach der Schizontenruptur im Plasma seines Wirtes detektiert (Han *et al.*, 2010). In diesem kann es eine Zytokinfunktion ausüben, welche vermutlich auf Protein-Protein-Interaktion beruht (Fingerle-Rowson *et al.*, 2009). PfMIF bindet mit einer ähnlich hohen Affinität wie hMIF an CD74 (Augustijn *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2012). Durch die Bindung kommt es zu einer Inhibierung der willkürlichen Migration von Makrophagen, einer verringerten chemotaktischen Antwort von Monozyten und einer reduzierten Expression von TLR2 und 4 auf Monozyten (Cordery *et al.*, 2007). In *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass das PfMIF Level im Serum positiv korreliert mit dem TNF- α Level und der Parasitämie. Des Weiteren zeigten Patienten mit SMA und ZM erhöhte PfMIF-Level (Han *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012). Diese Studien deuten auf einen schädigenden Einfluss von PfMIF auf den Wirt hin. Durch die Modulation des Wirt-Immunsystems scheint der Parasit sein eigenes Überleben positiv beeinflussen zu können (Abbildung 13). Um diesen Effekten entgegen zu wirken, wird an der Entwicklung von PfMIF spezifischen Inhibitoren geforscht. Dahlgren *et al.* gelang es, Inhibitoren mit einer hemmenden Konzentration von ca. 40 nM zu identifizieren, welche keinen hemmenden Einfluss auf hMIF zeigen (Dahlgren *et al.*, 2012). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren wurde die Interaktion mit CD74 verhindert. Zwei der potentesten Inhibitoren aus dem Screening wurden im Komplex mit PfMIF kristallisiert (4P7M und 4P7S (Pantouris *et al.*, 2014)). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung im aktiven Zentrum der Tautomeraseaktivität stattfindet (Abbildung 14). Somit wirken die PfMIF-Inhibitoren ähnlich den hMIF-Inhibitoren.

1.4 Zielsetzung

Während seines Lebenszyklus ist der Malariaerreger *Plasmodium* hohen Fluxen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und nitrosativen Spezies (RNS) ausgesetzt. Diese werden vor allem als Nebenprodukt des Metabolismus in dem sich schnell vermehrenden Parasiten gebildet. Werden diese nicht ausreichend neutralisiert, kann dies zu schweren oxidativen Schäden an DNA, Lipiden sowie Proteinen führen. In geringen Konzentrationen können ROS und RNS als Signalmoleküle wirken und Proteine an Cysteinen und/oder Methioninen modifizieren. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den oxidativen posttranslationalen Modifikationen (oxPTM) an Cysteinen. Um mit reaktiven Sauerstoffspezies und nitrosativen Spezies umgehen zu können, besitzt der Erreger ein komplexes, antioxidatives System. Zu diesem gehören unter anderem Redoxenzyme der Thioredoxinfamilie. Diese sind in der Lage, reversible oxPTM zu entfernen und so die Funktion von Proteinen zu re-/deaktivieren. Eine dieser oxPTM ist die Sulfenylierung. Diese ist oftmals ein Zwischenzustand zu stabileren oxPTM, wie beispielsweise der S-Glutathionylierung. Um ein besseres Verständnis von Redoxmodifikationen in *Plasmodium* und ihrem Zusammenspiel untereinander zu erhalten, wurden in dieser Arbeit folgende Schwerpunkte gesetzt:

- i. Identifikation von sulfenylierten Proteinen im Trophozoiten-Proteom, basierend auf Massenspektrometriedaten eines *pull-downs*
- ii. Vergleich des Sulfenyloms von *Plasmodium falciparum* mit dem Nitrosom und dem Glutathionylom
- iii. Vergleich der Sulfenylierungsmuster in verschiedenen Organismen mit dem Schwerpunkt auf redoxmodifizierten Stoffwechselwegen

Der humane *macrophage migration inhibitory factor* (hMIF) gehört mit seinem CXXC-Motiv zu den Thioredoxin-ähnlichen Proteinen und verfügt neben einer Oxidoreduktaseaktivität auch über eine Tautomeraseaktivität. Das homologe *Plasmodium falciparum* Protein PfMIF wird während der Schizontenruptur über einen unbekanntes Mechanismus freigesetzt und moduliert als Chemokin das menschliche Immunsystem. Im Gegensatz zu seinem humanen Homolog enthält es kein CXXC-Motiv, dafür aber ein N-terminales CC-Motiv. Um den Einfluss der Cysteine in PfMIF auf seine Aktivität zu analysieren, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- iv. Heterologe Überexpression, Reinigung und Charakterisierung von hMIF, PfMIF und PfMIF-Cystein-zu-Alanin-Mutanten.
- v. Analyse des Effekts von Redoxmodifikationen auf die enzymatische Aktivität von MIF, die dreidimensionale Struktur sowie auf die Interaktion mit humanen Rezeptoren.

2 Material

Prozentangaben zu Flüssigkeiten sind ausschließlich als Volumenprozent (v/v) zu verstehen. Die jeweiligen Angaben zu Lösungen von Feststoffen beziehen sich dagegen auf das Gewicht (w/v).

2.1 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Äkta FPLC System (Pumpe P-920, Monitor UPC-900, Einspritzventil INV-907, Mixer M-925, Fraktionssammler Frac-900, Säulenmaterial Superdex 200)	GE Healthcare, Freiburg
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
Autoklav VX-95	Systec, Wettenberg
Bunsenbrenner	Carl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer B1, B1A, B2	Owl Separation System Inc., Portsmouth, USA
Elektrophorese Netzteil EPS200	Pharmacie Biotec, Dübendorf, Schweiz
Fast Gene PCR Ultra Cycler Gradient	Nippon Genetics Europe, Düren
Feinwaage ABT 120-5 DM	Kern, Balingen
Flockeneisbereiter F80C	Icematic Deutschland, Meerbusch
Gel Doku Fas Digi	Nippon Genetics Europe, Düren
Heizblock neoBlock II	neoLab, Heidelberg
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Innova® 44	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Mytron	Thermo Scientific, Dreieich
Kristallisationsroboter Honeybee 961	Digilab, Marlborough, USA
Magnetrührer CAT M15	MAGV Laborbedarf, Rabenau-Londorf
Magnetrührer Color squid	IKA Werke, Staufen
Magnetrührer HI 300N	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Magnetrührer RCTbasic	IKA Werke, Staufen
PCR-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Peleusball	Deutsch & Neumann, Berlin
Peltier Cryobad System TPS 1500W	Thermo Scientific, Dreieich
pH-Meter Model Φ 350 pH/Temp/mV Meter	Beckman, Krefeld
Pipette Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipette Gilson Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipettierroboter Lissy	Zinsser Analytic, Frankfurt
Reinstwasseranlage Astacus	MembraPure, Henningsdorf
Schüttler Heidolph Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH & CO KG, Schwabach
Spektrophotometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Spannungswandler Power Pac 300 und 1000	Bio-Rad, München
Stereomikroskopiensystem (Mikroskop M165 C, Beleuchtung KL1500 LED, Kamera EC3)	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Tischzentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad, München
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD 2070	Bandelin Electronic, Berlin
Ultraschall Wasserbad Sonorex RK100	Bandelin Electronic, Berlin
UV/VIS-Spektrophotometer Evolution 300	Thermo Scientific, Dreieich
Vac Man® Laboratory Manifold	Promega, Mannheim
Vakuum Pumpe Vacubrand CVC 3000	VWR, Darmstadt
Vortex-Mixer MS2 Minishaker	IKA®-Werke, Staufen

Waage 474-32	Kern & Sohn, Balingen
Waage Bosch PE626	Bosch & Sohn, Jungingen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC 6+	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifugenrotoren SS-34 und F9S-4x1000y	Thermo Scientific, Dreieich

Software	Herkunft
ChemoStar TS	Intas, Göttingen
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Unicorn 7.1	Cytiva, Westborough, USA
VISIONlite™	Thermo Scientific, Dreieich

2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	PeqLab, Erlangen
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazindion (Luminol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bio-Gel P-6 Medium	Bio-Rad, München
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	Roth, Karlsruhe
Bradford Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cystatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Cysteine-Hydrochloride-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Dimedon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
L-DOPA Methylester (hydrochlorid)	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathiondisulfid (GSSG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstroke, England
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethanolsulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe

Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iodoacetamid (IAA)	Thermo Scientific, Dreieich
Iodoacetyl-PEG2-Biotin	Thermo Scientific, Dreieich
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol (MeOH)	Roth, Karlsruhe
Methylmethanthiosulfonat (MMTS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumascorbat (NaAsc)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natrium (meta) periodat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumnitrit (NaNO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumphosphat	Roth, Karlsruhe
Neocuproin	Merck Millipore, Burlington, USA
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(oxy-1,2-ethandiyloxy)-monodekansäure-sorbitylester (Tween 20)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
S-Nitrosoglutathion (GSNO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tyrpton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Alufolie alio	FORA Folienfabrik GmbH, Radolfzell
Blotpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
DNA-Dye NonTox	Panreac Applychem, Darmstadt
DNA ladder GeneRuler 1 kb Plus	Thermo Scientific, Dreieich
Einmalröhrchen PP 15 mL und 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe
Frischhaltefolie alio	Wentus Kunststoff GmbH, Höxter
Impföse	Thermo Scientific, Dreieich
Kristallisationsplatte 24 well, VDX Platte	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Kristallisationsplatte 96 well, MRC 2 well	Jena Bioscience, Jena
Küvette, Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht
Küvette, micro, UV	Brand GmbH, Wertheim
Membranfilter ME 25 0,45 μ m	Whatman GmbH, Dassel
Multiply® PCR Einzelgefäß 0,2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Nanosep® 3K Omega™	Pall Corporation, USA
Parafilm M PM-996	American National Can, Illinois, USA
Petrischale, 15 cm \varnothing	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg

Protein ladder Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, Dreieich
Protein ladder Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, Dreieich
Roti®-PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
SafeLock Reaktionsgefäß ambra, 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg
SafeSeal Reaktionsgefäß, 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	SARSTEDT, Nümbrecht
Serologische Pipetten, 5, 10 und 25 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sep-Pak Vac 3cc/500 mg tC18 Kartusche	Waters, Milford, USA
Zeba™ Spin Entsalzungssäulen	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 20, 10.000 MWCO	Sartorius Stedium Biotech, Göttingen

2.4 Kits

Kit	Hersteller
FastGene Plasmid Mini Kit	Nippon Genetics Europe, Düren
MSB® Spin PCRapace	Stratec, Birkenfeld

2.5 Enzyme

2.5.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Verwendung	Hersteller
DpnI	5'...GAC ^{H3} ATC...3'	Eliminierung von <i>template</i> DNA	Thermo Scientific, Dreieich
NdeI	5'...CA ^H TATG...3'	Klonierung	Thermo Scientific, Dreieich
XhoI	5'...C ^H TCGAG...3'	Klonierung	Thermo Scientific, Dreieich

2.5.2 Enzyme für die Molekularbiologie

Enzym	Funktion	Hersteller
AccuPrime™ Pfx DNA-Polymerase	DNA Amplifikation	Thermo Scientific, Dreieich
Pfu DNA Polymerase	DNA Amplifikation	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	Ligation von Nukleotidfragmenten	Thermo Scientific, Dreieich

2.5.3 Weitere Enzyme

Enzym	Funktion	Hersteller
DNase I	DNA-Verdau	Roche, Mannheim
Lysozym	Zelllyse	Sigma, Steinheim

2.6 Antikörper

Antikörper	Herkunft
Hase anti-Cystein Sulfensäure Serum	Merck, Darmstadt
Maus anti-Biotin IgG (33):sc-101339	Santa Cruz, USA
Maus anti-Glutathion IgG	Virogen, Watertown, USA

Maus anti-His₆-tag IgG
 Hase anti-Maus IgG HRP
 Ziege anti-Hase IgG HRP

Dianova, Hamburg
 Dianova, Hamburg
 Dianova, Hamburg

2.7 Zellstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
BL21 (DE)	F ['] -dcm <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue	F ['] ::Tn10 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^R) thi hdgR17 (rK ⁻ mK ⁺) glnV44 relA1 lac	Stratagene, Amsterdam, NL

2.8 Vektoren

Vektor	Basenpaare	Eigenschaften
pET-30a(+)	5.422	Kanamycinresistenz, T7 Promotor, His ₆ kodierende Sequenz N-terminal/C-terminal, T7 Terminator, <i>lacI</i> kodierende Sequenz
pEX-A128	2.450	Amp, lac Promotor, pUC ori

2.9 Oligonukleotide

Oligo-nukleotid	Sequenz
OPfMIF ^{C3A} _S	5'-GAGATATACATATGCCA <u>GCTT</u> GCGAAGTCATCACGAACGTGAATC-3'
OPfMIF ^{C3A} _{as}	5'-GATTCAaCGTTCGTGATGACTTCGCA <u>AGCT</u> TGGCATATGTATATCTC-3'
OPfMIF ^{C4A} _S	5'-GAGATATACATATGCCATGT <u>GCCG</u> AAGTCATCACGAACG-3'
OPfMIF ^{C4A} _{as}	5'-CGTTCGTGATGACTTC <u>GGC</u> ACATGGCATATGTATATCTC-3'
OPfMIF ^{C3AC4A} _S	5'-GAGATATACATATGCCA <u>GCTGCC</u> GAAAGTCATCACGAACG-3'
OPfMIF ^{C3AC4A} _{as}	5'-CGTTCGTGATGACTTC <u>GGCAGCT</u> TGGCATATGTATATCTC-3'
OPfMIF ^{C59A} _S	5'-TAGCAACGAAGCCTAT <u>GCC</u> TTCGTACGCATTACCTCGATTGGT-3'
OPfMIF ^{C59A} _{as}	5'-ACCAATCGAGGTAATGCGTACGAA <u>GGC</u> ATAGGCTTCGTTGCTA-3'
OPfMIF ^{C103A} _S	5'-TACGTGCAATTCCGCGAT <u>GCT</u> AGTGCGCAAACTTCGCGTTTTCC-3'
OPfMIF ^{C103A} _{as}	5'-GGAAAACGCGAAGTTTTGCGCACT <u>AGC</u> ATCGCGGAATTTCGACGTA-3'

2.10 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Puffer mit ddH₂O angesetzt.

2.10.1 Stocklösungen

Lösung	Konzentration	Gelöst in	Lagerung
APS	10 % (w/v)	ddH ₂ O	-20 °C
Cystatin	40 µM	ddH ₂ O	-20 °C
IPTG	1 M	ddH ₂ O, steril filtriert	-20 °C
Kanamycin	25 mg/mL	ddH ₂ O, steril filtriert	-20 °C
Pepstatin A	300 µM	DMSO	-20 °C
PMSF	100 mM	DMSO	-20 °C
SDS	10 % (w/v)	ddH ₂ O	4 °C

2.10.2 Medium für Bakterienkultur

Nach der Herstellung von Nährmedium wurde dieses für 30 min bei 120 °C autoklaviert. Antibiotika wurden erst nach dem Abkühlen zugesetzt (Agarplatten) bzw. unmittelbar vor der Inokulation (Medium). Die Lagerung von Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

Medium	Zusammensetzung
Agarplatten	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar Auf 1 L mit dH ₂ O einstellen und vor Verwendung autoklavieren
Lysogeny broth (LB)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl Auf 1 L mit dH ₂ O einstellen und vor Verwendung autoklavieren

2.10.3 Puffer für Proteinreinigung

Puffer	Zusammensetzung
Erntepuffer	50 mM Tris 500 mM NaCl 10 % Glycerol pH 8,0
MIF-Puffer	50 mM Tris, 200 mM NaCl pH 7,4
Elutionspuffer	MIF-Puffer 0,5 mM DTT 20, 50, 100, 200, 500 mM Imidazol

2.10.4 Puffer für Elektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
Coomassiefärbelösung	160 mg Coomassie Brilliant Blue R 250 ad 1 L mit dH ₂ O, 2 h rühren 3 mL rauchende HCl, 37 %
Elektrophoresepuffer (4x)	768,6 mM Glycin 100 mM Tris 0,4 % SDS (w/v) pH 8,3
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8
SDS Probenpuffer (4x)	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 8 % SDS (w/v) 40 % Glycerol (v/v) 0,03 % (w/v) Bromphenolblau (200 mM DTT)
SDS Probenpuffer (1x)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % SDS (w/v) 25 % Glycerol (v/v) 0,01 % (w/v) Bromphenolblau (50 mM DTT)

Trenngelpuffer	1.5 M Tris pH 8.8
Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (5x)	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,3 eingestellt mit HCl

2.10.5 Gele

Gel	Zusammensetzung
Agarosegel	0,7 % Agarose in TBE-Puffer
15 % SDS-PAGE Trenngel (4 Gele)	3,6 mL ddH_2O 3,75 mL Trenngelbuffer 7,5 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 0,15 mL SDS (10 %) 75 μ L APS (10 %) 7,5 μ L TEMED
4 % SDS-PAGE Sammelgel (4 Gele)	3,05 mL ddH_2O 1,25 mL Trenngelbuffer 0,65 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 0,05 mL SDS (10 %) 25 μ L APS (10 %) 5 μ L TEMED

2.10.6 Puffer für Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer (10x)	1,92 M Glycin 250 mM Tris pH 8,3
TBS	10 mM Tris 0,9 % NaCl (w/v) pH 7,4
TBS mit Tween 20 (TBST)	0,05 % Tween 20 (v/v) in TBS
Ponceau S Lösung	2 % Ponceau S 3 % TCA
Ponceau S Entfärbelösung	1 % Essigsäure
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver (w/v) in TBST
Luminol-Mix	1,25 mM Luminol 0,0093 % H_2O_2 (v/v) 100 mM Tris-HCl pH 8.6
Cumarinsäure	0,11 % Cumarinsäure in DMSO
Chemilumineszenz Mix	1 mL Luminol-Mix 10 μ L Cumarinsäure

2.10.7 Puffer Biotin Switch Technik

Puffer	Zusammensetzung
GSNO-Puffer	50 mM Tris 1 mM EDTA

	0,2 mM Neocuproin pH 7,4
Blocking-Puffer	8 M Harnstoff 50 mM Tris 1 mM EDTA 0,1 mM Neocuproin pH 8,0
Labeling-Puffer	4 M Harnstoff 50 mM Tris 1 mM EDTA 0,01 mM Neocuproin

2.10.8 Proteinkristallisationsscreens

Kristallisationsscreen	Herkunft
JBScreen Classic HTS I	Jena Bioscientific, Jena
JBScreen Classic HTS II	Jena Bioscientific, Jena
JBScreen Wizard 1 & 2 HTS	Jena Bioscientific, Jena
JBScreen Wizard 3 & 4 HTS	Jena Bioscientific, Jena
JCSG Core I Suite (NeXtal Tubes)	Qiagen, Hilden
JCSG Core II Suite (NeXtal Tubes)	Qiagen, Hilden
JCSG Core III Suite (NeXtal Tubes)	Qiagen, Hilden
JCSG Core IV Suite (NeXtal Tubes)	Qiagen, Hilden
MIF-Screen	AG Becker
PEG Teil I	AG Becker
PEG Teil 2	AG Becker

2.10.9 Assaypuffer

Puffer	Zusammensetzung
Oxidoreduktase Assay	100 mM Natriumphosphat 2 mM EDTA pH 7,2
Tautomerase Assay	50 mM BisTris 1 mM EDTA 300 µM CHAPS 0,025 % BSA pH 6,2

3 Methoden

3.1 Auswertung von Massenspektrometriedaten

Mittels *multidimensional protein identification technique* (MudPIT) generierte Massenspektrometrie (MS) Rohdaten wurden mit der Software *RawExtract* 1.9.9 (<http://fields.scripps.edu/downloads.php>) in MS1 und MS2 Dateien entpackt und von Claire Delahunty zur Verfügung gestellt (McDonald *et al.*, 2004). Diese wurden anschließend mit der Software *Integrated Proteomics Pipeline* (IP2; Integrated Proteomics Applications, Inc., San Diego, CA. <http://www.integratedproteomics.com>) analysiert. Dieser Software liegen die Algorithmen *ProLuCID* (Xu *et al.*, 2015b) und *DTASelect* 2.0 zugrunde (Cociorva *et al.*, 2006; Tabb *et al.*, 2002). Eine bereits bestehende Datenbank, welche neben den Proteinsequenzen für das *P. falciparum* Isolat 3D7 (<https://www.plasmodb.org>, exportiert am 30.03.2015), auch die *decoy* Proteinsequenzen sowie alle humanen Proteinsequenzen (<https://www.uniprot.org>) beinhaltet, wurde verwendet um den MS Spektren Peptiden zuzuordnen. Die *decoy* Proteinsequenzen wurden benötigt, um die Peptidwahrscheinlichkeiten sowie die *false discovery rates* zu berechnen.

Für die Auswertung wurden nur Peptide mit einer Zuverlässigkeit von 99,9 % sowie einer *precursor delta mass* kleiner als 20 ppm berücksichtigt. Des Weiteren betrug die Minimallänge eines Peptides mindestens 6 Aminosäuren, wobei mindestens ein Ende tryptisch gespalten vorzuliegen hatte. Nicht mehr als drei übersprungene Spaltstellen innerhalb eines Peptides wurden akzeptiert. Folgende Modifikationen an Cysteinen wurden berücksichtigt: +392,1759 (BCN-Bio1 gebunden an eine Sulfensäure) sowie +141,04261 (NEM gebunden an eine Sulfensäure). Letztere wurde in die Auswertung miteinbezogen, da Reisz *et al.* eine Affinität von NEM zu Sulfensäuren beschrieben haben (Reisz *et al.*, 2013). Die *false discovery rate* wurde berechnet als der Prozentsatz von reversen *decoy* Peptid/Spektrumübereinstimmungen zu allen Spektrumübereinstimmungen die die 99,9 % Zuverlässigkeitsschwelle überschritten haben. Die Einstellungen wurden so stringent gesetzt, dass final die *false discovery rate* der Peptide unter 1 % lag.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Plasmidpräparation

Plasmid DNA aus *Escherichie coli* (*E. coli*) wurde mittels FastGene Plasmid Mini Kit, Nippon Genetics Europe gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. Hierfür wurden die Zellen einer 3 mL Übernachtskultur lysiert, neutralisiert und zentrifugiert. Der Überstand, welcher die gewünschte Plasmid DNA enthielt, wurde anschließend mittels einer Silicamembran Säule gereinigt. Nach einem Waschschrift wurde die Plasmid DNA eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Mittels spektrophotometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die DNA-Konzentration einer Probe bestimmt. Hierbei entspricht eine Einheit OD_{260nm} einer Konzentration von 50 mg/mL. Die Reinheit der Probe wurde über das Verhältnis von A_{260nm} zu A_{280nm} bestimmt. Lag dieser Wert bei ungefähr 1,8, so wurde die Probe als „rein“ bewertet.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Mithilfe von Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente wie beispielsweise Plasmide nach einem Restriktionsverdau, anhand ihrer Größe trennen. Hierzu wurde die jeweilige DNA-Probe 5:1 mit dem DNA-Dye NonTox gemischt und anschließend auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen. Im Folgenden wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch für ca. 75 min bei 100 V in 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Zur Beurteilung der Größe der Fragmente, wurde der 1 kb DNA ladder GeneRuler Marker verwendet. DNA-Banden wurden mittels UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

3.2.4 Molekulare Klonierung

Um eventuellen Schwierigkeiten der Translationsmaschinerie von *E. coli* mit nicht-bakteriellen Genen zuvorzukommen, wurden die Gene für die zu untersuchenden Proteine hMIF und PfMIF codon-optimiert synthetisiert (Eurofins MWG, Ebersberg).

Restriktionsverdau

Zuerst wurden sowohl der Zielvektor (pET30) als auch der Vektor mit hMIF bzw. PfMIF (pEX-A128) für 1 h bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI inkubiert. Anschließend wurden die so entstandenen DNA-Fragmente mit dem MSB[®] Spin PCRapace Kit gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Die Größe der dabei entstandenen DNA-Fragmente wurde wie unter 3.2.3 beschrieben analysiert.

Ligation

Im nächsten Schritt sollten die Gene für hMIF bzw. PfMIF in den Zielvektor pET30 ligiert werden. Hierfür wurden die DNA-Fragmente mit der T4-DNA Ligase für 5-10 min bei 37 °C inkubiert. 5 µL des Ligationsprodukts wurden anschließend in kompetente XL1-Blue *E. coli* Zellen transformiert. Transformierte Bakterienzellen wurden auf einer Agarplatte, welche Kanamycin enthielt, ausplattiert. Der Rest der Ligation wurde über Nacht bei 4 °C gelagert, um gegebenenfalls die Transformation wiederholen zu können.

Überprüfen des Inserts

Um zu überprüfen, ob das gewünschte Gen erfolgreich in den Zielvektor ligiert wurde, wurden gemäß 3.2.1 Plasmidpräparationen von mehreren Klonen durchgeführt. Im Anschluss wurden die Plasmide mit NdeI und XhoI für 5 min bei 37 °C verdaut. Mittels Agarosegelelektrophorese wurden dann die Fragmente auf ihre Größe überprüft. Plasmide, welche Inserts der richtigen Größe enthielten, wurden für die weiteren Experimente verwendet.

3.2.5 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Untersuchung des Einflusses von Cystein(en) auf das Protein PfMIF wurden verschiedene Cystein-zu-Alanin-Mutanten hergestellt; PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A}, PfMIF^{C3A/C4A}, PfMIF^{C59A} und PfMIF^{C103A}. Mithilfe speziell designer Primer (Biolegio, Nijmegen, NL) wurde in einer PCR das PfMIF^{WT}-Gen entsprechend Codon-verändert amplifiziert. PfMIF^{WT}-DNA in pET30 diente als *template* und wurde mittels den jeweiligen Primern (2.9) sowie einer DNA Polymerase

amplifiziert (Tabelle 2 und Tabelle 3). Für die Doppelmutante (PfMIF^{C3A/C4A}) wurde PfMIF^{C4A} DNA als *template* verwendet. So entstandene PCR-Produkte wurden anschließend mittels MSB® Spin PCRapace gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Durch 1 h Inkubation bei 37 °C mit DpnI wurde methylierte *template*-DNA aus dem Ansatz entfernt. Anschließend erfolgte eine Transformation in XL1-Blue. Klone mit Inserts der richtigen Größe wurden vor der weiteren Verwendung mittels Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) auf die Richtigkeit der eingeführten Mutation überprüft. Die Mutagenese von PfMIF^{C103A} wurde von Eric Springer, einem Masterstudenten in unserer Gruppe, durchgeführt.

Tabelle 2 – Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR

	PfMIF ^{C4A}	PfMIF ^{C3A} , PfMIF ^{C59A} , PfMIF ^{C103A} , PfMIF ^{C3A/C4A}
Template DNA	fc 100 ng	fc 100 ng
Forward Primer	fc 400 nM	fc 400 nM
Reverse Primer	fc 400 nM	fc 400 nM
dNTP Mix (2 mM)	4 µL	-
10x Puffer	5 µL	5 µL
DMSO	2,5 µL	2,5 µL
DNA Polymerase	Pfu DNA Polymerase	AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase
	fc 2 U	fc 2,5 U
Steriles H ₂ O	fc 50 µL	fc 50 µL

Tabelle 3 – PCR-Programm für die Mutagenese-PCR

	PfMIF ^{C4A}	PfMIF ^{C3A} , PfMIF ^{C59A} , PfMIF ^{C103A} , PfMIF ^{C3A/C4A}
Denaturierung	95 °C für 3 min	94 °C für 3 min
Zyklen	24	24
Denaturierung	95 °C für 30 sec	94 °C für 30 sec
Annealing	60 °C für 1 min	65 °C für 1 min
Elongation	68 °C für 13 min	68 °C für 13 min
Finale Elongation	68 °C für 15 min	68 °C für 15 min

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* Zellen (hergestellt in der AG Becker) wurden transformiert, um das gewünschte Plasmid aufzunehmen. Hierzu wurden 125 µL kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Plasmid DNA zugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Für 90 sec erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C. Danach wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert bevor eine Zugabe von 300 µL Luria-Bertani (LB) Medium stattfand. 1 h lang wurden die Zellen dann bei 37 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert. BL21 (DE) Zellen wurden zuvor für 2 min bei 12.100 x g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in ca. 50 µL verbleibendem LB-Medium resuspendiert und komplett ausplattiert. Mit Kolonien bewachsene Platte wurden bei 4 °C gelagert und bis zu 4 Wochen verwendet.

3.3.2 Heterologe Überexpression in *E. coli*

Zur Herstellung von rekombinantem Protein wurde der *E. coli* Stamm BL21 (DE) mit dem jeweiligen Gen in pET30 verwendet. Alle Wachstumsschritte erfolgten bei 37 °C und konstantem Schütteln bei 180 rpm. Gleichzeitig erfolgte das Wachstum der Zellen stets in Anwesenheit von 50 µg/mL Kanamycin. Bei der zu Beginn durchgeführten Testsynthese wurden Proben genommen, um optimale Bedingungen für die Proteinsynthese zu ermitteln. Hierfür wurde jeweils 1 mL bewachsene Kultur (vor Induktion, nach jeweils 1 h, 2 h, 3 h und 4 h Expression) entnommen, für 3 min bei 15.700 x g zentrifugiert und anschließend in 60 µL 1x Probenpuffer (SB) mit Dithiothreitol (DTT) aufgenommen. Nachdem die Proben für 5 min bei 95 °C aufgeköcht wurden, wurden sie bei -20 °C gelagert, um sie anschließend mittels anti-His₆-tag Immunofluoreszenzdetektion zu untersuchen. Gemäß etabliertem Standardprotokoll wurden 3 mL LB-Medium mit einer Kolonie transformierter *E. coli* Zellen angeimpft. Die Zellen wurden für 6 h wachsen gelassen, bevor dann mit dieser Vorkultur eine 150 mL LB-Kultur angeimpft wurde. Diese wurde dann über Nacht wachsen gelassen, um am nächsten Tag eine 1 L LB-Kultur bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,1 anzuimpfen. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 (PfMIF^{WT} und Mutanten) bzw. 0,7 (hMIF) erfolgte die Induktion der Proteinsynthese mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (finale Konzentration (fc) 1 mM). Nach weiteren 4 h Wachstum wurde die Ernte der Zellen mittels Zentrifugation (15 min, 11.448 x g, 4 °C) vorgenommen. Das so entstandene Pellet wurde in Erntepuffer resuspendiert, mit Proteaseinhibitoren (150 nM Pepstatin A, 40 nM Cystatin, 100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid) versetzt, auf zwei Einmalröhrchen aufgeteilt, anschließend bei -20 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Schritte bei 4 °C und mit MIF-Puffer ausgeführt, um die Stabilität der Proteine zu gewährleisten.

3.4.1 Reinigung von rekombinantem Protein mittels Affinitätschromatographie

Rekombinant exprimiertes Protein wurde mittels Affinitätschromatographie aus *E. coli* Zellen isoliert. Der Hexahistidyl-tag (His₆-tag) des rekombinanten Proteins weist eine hohe Affinität zu Nickel auf, worauf das Prinzip der Affinitätschromatographie basiert. Um das zu reinigende Protein in reduziertem Zustand zu halten, erfolgten alle folgenden Schritte in der Anwesenheit von 0,5 mM DTT. Zunächst wurde das Pellet einer 0,5 L LB-Kultur aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Verdopplung des Volumens, die Zugabe von 5 mg Lysozym sowie einer Spatelspitze DNase. Im Folgenden wurden die Zellen für 1 h unter Rühren lysiert, um anschließend mittels Ultraschall (3x 30 sec, 70 % Maximalpower) final die Zellwände aufzubrechen. Der durch Zentrifugation (30 min, 38.000 x g) gewonnene Überstand enthielt neben *E. coli* Proteinen das jeweilige rekombinante Protein. Eine Nickel-Nitrilotriessigsäure Agarose (Ni-NTA) Säule mit einem Säulenvolumen (SV) von 1 mL wurde mit Puffer äquilibriert, bevor der Überstand aufgetragen wurde. Die langsame Durchflussgeschwindigkeit erlaubte eine Bindung des rekombinanten Proteins über seinen His₆-tag an das Ni-NTA Säulenmaterial. Die Säule wurde mit 10x SV gewaschen, gefolgt von mehreren Elutionsschritten mit steigender Imidazolkonzentration (20, 50, 100, 200, 500 mM) in 2x SV. Während der gesamten Reinigung wurden alle Fraktionen gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE (3.4.2) analysiert. In

den Eluaten wurde die DTT Konzentration auf 5 mM erhöht. Nach Auswertung der SDS-PAGE wurden die Eluate mit sauberem Protein in hoher Konzentration vereinigt und anschließend in 10 kDa cut off Vivaspin Säulen gewaschen, bis die Imidazolkonzentration unter 5 mM lag. Anschließend wurde die Proteinkonzentration gemäß 3.4.4 bestimmt und die gereinigten Proteine mit einer finalen Konzentration von 10 mg/mL in Anwesenheit von 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) bei -20 °C gelagert.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht getrennt. Durch SDS denaturierte und markierte Proteine trennen sich entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die SDS-PAGE verwendet, um die Reinheit von Proteinproben zu analysieren sowie als erster Schritt einer Protein Immunoblot Analyse.

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt (siehe Tabelle 4) und anschließend für 5 min bei 95 °C gekocht. Auf einem 15 % Polyacrylamidgel wurden die Proben aufgetragen und für 40 min bei 200 V getrennt. Zum Visualisieren der Proteine erfolgte eine Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue. Hierzu wurde das Gel zuerst dreimal mit Wasser gewaschen, bevor es dann für 15 min mit der Färbelösung inkubiert wurde. Mittels erneuten Waschens mit Wasser wurde überschüssiges Coomassie entfernt. Durch Erhitzen für 40 sec bei 700 W wurde die Effektivität des Waschens gesteigert. Sollten Proteine mittels Protein Immunoblot untersucht werden, wurden die Gele ohne Coomassie-Färbung weiterverwendet.

Tabelle 4 – Probenvorbereitung für SDS-PAGE

SB: Probenpuffer

	Probe	Proteinmenge	SB	Volumen SB	aufgetragen
Proteinreinigung	Pellet	Minimale Menge	1x	60 µL	5 µL
	Auftrag	10 µL	1x	15 µL	5 µL
	Durchlauf	10 µL	1x	15 µL	5 µL
	Wasch	10 µL	1x	15 µL	5 µL
	Elution	10 µL	1x	10 µL	10 µL

3.4.3 Größenausschlusschromatographie

Mittels Größenausschlusschromatographie kann die Oligomerisierung von Proteinen untersucht werden. Hierbei werden Proteine dem Molekulargewicht ihrer nativen Form entsprechend über eine Säule getrennt. Kleine Proteine gelangen tiefer in die poröse Matrix der Trennsäule und eluieren dementsprechend später.

Durchgeführt wurden die Oligomerisierungsexperimente mit einer HiLoad™ 16/600 Superdex™ *prep grade* Säule in Verbindung mit einem ÄKTA/Unicorn FPLC System. Untersucht wurde hierbei der Einfluss von TCEP auf die Oligomerisierung von hMIF und PfMIF. Dazu wurden die Proteine nach der Reinigung in 0,5 mM TCEP oder in Puffer ohne TCEP gelagert und analysiert. Die Säule wurde mit einem Größenausschluss-Kalibrierungskit kalibriert und anschließend mit entgastem MIF-Puffer äquilibriert. Gereinigter MIF wurde für 15 min bei 15.700 x g zentrifugiert, um potenziell enthaltene feste Partikel zu entfernen. 1,5 mL Probe wurden appliziert und mit einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Eluate wurden in 2 mL

Fraktionen gesammelt und bei 280 nm spektrophotometrisch auf Protein untersucht. Mithilfe der Unicorn 7.1 Software wurden die Peak-Fläche evaluiert. Die Reinheit der eluierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert (3.4.2).

3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über zwei verschiedene Methoden. Am häufigsten erfolgte die Bestimmung mittels des Bradford Assays (Bradford, 1976). Hierzu wurde zunächst eine Standardkurve aus in d_4H_2O gelöstem BSA vorbereitet. Zehn Standardwerte mit einer Konzentration von 0 bis 20 $\mu\text{g/mL}$ wurden als Duplikate angesetzt. Anschließend wurde zu jedem Standard 125 μL Bradford Reagenz zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm bestimmt. Proben wurden analog vorbereitet und stets exakt nach 10 min spektrophotometrisch gemessen. Ausgehend von der Standardkurve konnte so die Proteinkonzentration berechnet werden.

Bei der zweiten Methode erfolgte eine Absorptionsmessung der Probe bei 260 und 280 nm mittels Eppendorf BioSpectrometer basic. Ausgehend von der Messung wurde die Proteinkonzentration mit dem Molekulargewicht sowie dem Extinktionskoeffizienten berechnet (Tabelle 5).

Tabelle 5 – Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten von MIF

Molekulargewichte sowie Extinktionskoeffizienten beinhalten den His₆-tag und wurden mit dem Online Tool JustBio (www.justbio.com) berechnet.

	Molekulargewicht [kDa]	Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
PfMIF	13,9	6,64
hMIF	13,5	12,27

3.4.5 Protein Immunoblot

Nachdem Proteinproben mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht getrennt wurden (3.4.2), erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot. Hierzu wurde die PVDF-Membran zuerst mit Methanol aktiviert. Parallel wurden 12 Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt sowie das SDS-PAGE Gel und die aktivierte Membran in diesem äquilibriert. Anschließend erfolgte die luftblasenfreie Schichtung der benötigten Materialien in der Kassette des Trans-Blot Turbo Transfer System folgendermaßen: 6 Blatt Filterpapier, PVDF Membran, SDS-PAGE Gel, 6 Blatt Filterpapier. Proteine wurden aus dem Gel auf die Membran transferiert, indem für 30 min eine Spannung von 25 V angelegt wurde. Anschließend wurde die Membran entnommen und zwecks Überprüfens der Transfereffizienz für 30 sec mit PonceauS gefärbt. Nach dem Entfärben mit 1 % Essigsäure waren nur auf der Membran befindliche Proteine sichtbar. Alle folgenden Wasch- sowie Inkubationsschritte erfolgten bei konstantem Schütteln. Durch mehrfaches Waschen mit TBST wurde die Ponceau-Färbung komplett entfernt. Um zu verhindern, dass verwendete Antikörper unspezifisch an die Membran binden, wurde diese zunächst für 1 h bei RT bzw. $\bar{u}N$ bei 4 °C mit 5 % (w/v) Milch in TBST geblockt. Im Folgenden wurde die Membran zuerst dreimal für 5 min mit TBST gewaschen, bevor sie dann mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert wurde (siehe Tabelle 6). Erneut wurde die Membran mit TBST (3x für 5-8 min) gewaschen.

Für die Immunfluoreszenzdetektion erfolgte die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Erneut wurde die Membran dreimal für 5-8 min mit TBST gewaschen, bevor durch Zugabe einer Luminolmischung gebundener Antikörper sichtbar gemacht wurde. Hierbei katalysiert HRP die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophtalat, welches beim Zerfall Lichtphotonen freisetzt. Diese wurden mittels ECL ChemoStar Imager visualisiert und mit der ChemoStar TS Software ausgewertet.

Tabelle 6 – Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen für die Immunoblot Analyse

Identifizierung von	Primärantikörper	Sekundärantikörper
His ₆ -tag	1:1.000	anti-Maus, 1:10.000
S-Glutathionylierung	1:500	anti-Maus, 1:10.000
S-Nitrosierung	1:1.000	anti-Maus, 1:10.000
Sulfenylierung	1:10.000	anti-Kaninchen, 1:10.000

3.4.6 Gelfiltration zum Entsalzen von Proteinen

Um kleine Moleküle wie beispielsweise DTT aus einer Probe zu entfernen, wurde diese mittels Gelfiltration „entsalzt“. Hierfür wurde p6-Gel für mindestens eine Stunde in Puffer quellen gelassen, bevor es für jeden Versuch frisch in eine leere Säule gepackt wurde. Mittels Zentrifugation (2.220 x g, 2 min) wurde überschüssiger Puffer entfernt. Anschließend konnte eine Probe appliziert werden. Nach erneuter Zentrifugation enthielt der Durchlauf die Proteinlösung ohne niedermolekulare Substanzen der Größe 1-6 kDa. Die Proteinkonzentration wurde vor weiteren Versuchen neu bestimmt (siehe 3.4.4).

3.4.7 Sulfenylierung von rekombinanten Proteinen

Basierend auf dem Protokoll von Treffon *et al.* wurden rekombinante Proteine auf ihre Empfänglichkeit gegenüber Sulfenylierung untersucht (Treffon *et al.*, 2017). Rekombinantes Protein wurde aufgetaut und anschließend gemäß Protokoll entsalzt (3.4.6). Pro Ansatz wurden 0,8 mg/mL Protein verwendet und mit steigenden Konzentrationen an H₂O₂ (0 – 50 mM) für 10 min bei RT inkubiert, um eine Oxidation von Cysteinen herbeizuführen. Eine Probe wurde im reduzierten Zustand mitgeführt und nicht mit H₂O₂ inkubiert (Negativkontrolle 1). Anschließend erfolgte das Labeln von Sulfensäuren mittels Zugabe von Dimedon in Dimethylsulfoxid (DMSO) (fc 50 mM). Um zu überprüfen ob Dimedon unspezifisch an das Protein bindet, wurde eine weitere Negativkontrolle mitgeführt; in dieser wurde reduziertes Protein mit DMSO ohne Dimedon inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 % eiskaltem Aceton in 5-fachem Überschuss gestoppt. Die Proben wurden anschließend für 1 h bei -20 °C gelagert bevor sie für 5 min bei 8.000 x g zentrifugiert wurden. Das so entstandene Proteinpellet wurde im Folgenden 3x mit 70 % eiskaltem Aceton gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils für 5 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde das restliche Aceton verdampft, bevor das Pellet in MIF-Puffer gelöst wurde. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit dem Bradford Assay bestimmt (3.4.4). 2 µg Protein wurden mittels Protein Immunoblot (3.4.5) untersucht.

3.4.8 S-Nitrosierung von rekombinanten Proteinen

Um zu untersuchen, ob und gegebenenfalls wie Proteine auf S-Nitrosierung reagieren, wurden Proteine in einer Konzentrationsreihe modifiziert, bevor sie anschließend mittels Western Blot Analyse, MALDI-TOF MS, Rezeptorinteraktionsstudien, Chemielumineszenzdetektion (CLD) sowie Enzymaktivitätsmessung untersucht wurden. In dieser Studie wurde die Modifikation durch Inkubation mit nitrosiertem Cystein (Cys-NO) herbeigeführt. Im Gegensatz zu dem oft verwendeten S-Nitrosothiol bzw. nitrosiertem Glutathion (GSNO) werden Proteine durch Cys-NO transnitrosiert und nicht auch potenziell glutathionyliert.

Cys-NO wurde vor jedem Versuch frisch hergestellt. Dazu wurden 250 mM NaNO₂ sowie 250 mM L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat in GSNO-Puffer angesetzt und anschließend im Verhältnis 1:2 gemischt. Nach Zugabe von HCl (fc 111,1 mM) wurde die Synthese unter Ausschluss von Licht für 5 min bei 4 °C durchgeführt. Zuletzt erfolgte eine Neutralisation des pH-Wertes mit NaOH auf pH 7,5. Man erhielt somit eine 95,24 mM Cys-NO Stammlösung.

Mithilfe der Biotin Switch Technik (BST) lassen sich nitrosierte Proteine detektieren und beispielsweise mittels Protein Immunoblot visualisieren. Diese indirekte Nachweismethode wurde basierend auf den Protokollen von Forrester und Wang (Forrester *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013) wie folgt durchgeführt: Rekombinantes Protein wurde aufgetaut und gemäß Protokoll entsalzt (3.4.6). Anschließend wurden 0,8 mg/mL Protein in GSNO-Puffer mit einem 10-fachen Überschuss an Cys-NO für 1 h bei 22 °C lichtgeschützt schüttelnd inkubiert (*ad* 500 µL). Die Transnitrosierungsreaktion wurde durch Zugabe von dreifachem Volumen 100 %-iges eiskaltes Aceton gestoppt. Die Proben wurden für 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine bei 4 °C für 5 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 3x mit dem 2-fachem Volumen 70 %-iges eiskaltes Aceton gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte stets ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 5 min bei 5.000 x g. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Reaktionsgefäß für ca. 5 min geöffnet, damit verbleibendes Aceton verdampfen konnte. Im nächsten Schritt wurden freie Thiole der Proteine durch Zugabe eines Alkylanz blockiert. Hierfür wurde das Pellet in 200 µL Blocking Puffer mit NEM (fc 200 mM), IAA (fc 200 mM) oder MMTS (fc 1.88 %) gelöst. Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 50 °C im Dunkeln geschüttelt. Das Stoppen der Reaktion wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach dreifachem Waschen der Pellets wurden diese in Labeling-Puffer mit NaAsc (fc 20 mM), Iodoacetyl-PEG2-Biotin (fc 0,2 mM) resuspendiert (*ad* 250 µL). Für 1 h wurde die Reaktion bei 25 °C schüttelnd und lichtgeschützt inkubiert. Hierbei wurde durch NaAsc eine eventuelle S-Nitrosierung entfernt und somit freiwerdende Thiole durch Iodoacetyl-PEG2-Biotin markiert. Die Reaktion wurde, wie oben beschrieben, erst gestoppt und Proteine dann mit Aceton gewaschen. Zuletzt wurde das Proteinpellet in 25 µL Blocking-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration an dieser Stelle ließ sich nicht mehr bestimmen, daher wurden alle Proben analog für den anti-Biotin WB vorbereitet: Nach der Zugabe von 6,3 µL 4xSB + DTT wurden 2 µL entnommen und mit 18 µL 1xSB + DTT versetzt. Die so vorbereiteten Proben wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert bevor 2 µL auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen wurden. Anschließend wurde die SDS-PAGE sowie der Protein Immunoblot gemäß 3.4.2 und 3.4.5 durchgeführt. Zur internen Kontrolle des Versuchs wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt, bei denen jeweils ein Schritt des Protokolls ausgelassen wurde: Eine Probe wurde nicht mit Cys-NO transnitrosiert; eine Probe

wurde nicht mit NaAsc denitrosiert; eine weitere Probe wurde ohne Iodoacetyl-PEG2-Biotin inkubiert.

Mittels BST vorbereitete Proben wurden nur für Protein Immunoblot Analysen verwendet. Für alle weiteren Untersuchungen der S-Nitrosierung wurden rekombinante Proteine wie folgt aufbereitet: Gereinigte Proteine wurden aufgetaut und anschließend gemäß Protokoll entsalzt (3.4.6). Für die Konzentrationsabhängigkeit wurden pro Ansatz 0,8 mg/mL Protein verwendet. Es wurde berechnet, wie viele freie Cysteine in der Proteinlösung vorlagen und anschließend Cys-NO im Verhältnis 1:0, 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 dazugegeben (Tabelle 7). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 25 °C lichtgeschützt und wurde durch Entfernen des Cys-NO mittels Gelfiltration gestoppt (3.4.6).

Tabelle 7 – Verhältnis von Cys-NO zu freien Cysteinen in PfMIF und hMIF

Ausgehend von der Proteinkonzentration von PfMIF bzw. hMIF (jeweils 0,8 mg/mL) wurde die Anzahl an freien Cysteinen in der Lösung berechnet. Darauf basierend wurde kalkuliert, wie viel Cys-NO zugesetzt werden muss, damit die jeweiligen Verhältnisse entstehen.

	1:0	1:1	1:2	1:5	1:10
PfMIF	0 μ M	230 μ M	460 μ M	1.150 μ M	2.300 μ M
hMIF	0 μ M	170 μ M	340 μ M	850 μ M	1.700 μ M

3.4.9 Chemilumineszenzdetektion von S-Nitrosierung

Ergänzend zum BST wurden der rekombinante PfMIF^{WT} sowie hMIF mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD) auf S-Nitrosierung untersucht. Bei dieser direkten Nachweismethode wird NO aus einer Probe in einer Gasphase freigesetzt. Unter Lichtemission reagiert NO mit generiertem Ozon; hierbei ist die detektierte Lichtemission proportional zu dem enthaltenen NO (Bates, 1992).

Rekombinanter MIF wurde aufgetaut und gemäß Protokoll entsalzt (3.4.6). Anschließend wurden je 60 mM rekombinantes Protein mit DTT (fc 12 mM) und DTPA (fc 0,6 mM) für 2 h bei RT inkubiert. Zur Entfernung des Reduktionsmittels wurde die Probe auf eine Nanosep 3K Omega Säule aufgetragen. Alle im Folgenden durchgeführten Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C, 14.000 x g für 5 min vorgenommen. Vor der Nutzung wurden die Säulen mit 50 μ L PBS gewaschen. Nach dem Applizieren von 200 μ L der Proteinlösung erfolgte ein Zentrifugationsschritt. Anschließend wurde der Filterkuchen dreimal mit 50 μ L PBS/DTPA (fc 60 mM) gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zuletzt wurde das im Filterkuchen enthaltende Protein in 200 μ L PBS/DTPA (fc 60 mM) aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Cys-NO wurde gemäß den Angaben unter 3.4.8 hergestellt und mit PBS/DTPA (fc 60 mM) auf eine Konzentration von 60 mM eingestellt. 0,06 mM Protein enthielten 0,24 mM Cysteine (PfMIF) bzw. 0,18 mM Cysteine (hMIF). Davon ausgehend wurde berechnet wie viel Cys-NO einzusetzen war, um ein Verhältnis von Cys-NO zu Cysteinen von 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100 zu ergeben (siehe Tabelle 8). Die Ansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von NEM (fc 0,6 mM) gestoppt. Mittels Nanosep 3K Omega Säulen wurden die Proben wie oben beschrieben entsalzt. So vorbereitete Proben wurden bei -20 °C gelagert und auf Trockeneis verschickt. Die Durchführung der CLD erfolgte in der

Arbeitsgruppe von Prof. Miriam Cortese-Krott, Myokardinfarktforschung, Universitätsklinikum Düsseldorf. Die Proben wurden sowohl auf das Vorkommen von Nitrosothiolen (RSNO) als auch Nitrosaminen (RNNO) untersucht.

Tabelle 8 - Verhältnis von Cys-NO zu freien Cysteinen in PfMIF und hMIF

Ausgehend von der Proteinkonzentration von PfMIF bzw. hMIF (jeweils 0,06 mM) wurde die Anzahl an freien Cysteinen in der Lösung berechnet. Darauf basierend wurde kalkuliert, wie viel Cys-NO zugesetzt werden muss, damit die jeweiligen Verhältnisse entstehen.

	1:1	1:5	1:10	1:50	1:100
PfMIF	0,24 mM	1,2 mM	2,4 mM	12 mM	24 mM
hMIF	0,18 mM	0,9 mM	1,8 mM	9 mM	18 mM

3.4.10 S-Glutathionylierung von rekombinanten Proteinen

Um zu untersuchen, ob und gegebenenfalls wie Proteine auf S-Glutathionylierung reagieren, wurden Proteine in einer Zeit- sowie Konzentrationsreihe modifiziert, bevor sie anschließend mittels Protein Immunoblot-Analyse, MALDI-TOF MS, Rezeptorinteraktionsstudien sowie Enzymaktivitätsmessung untersucht wurden.

Rekombinantes Protein wurde aufgetaut und anschließend gemäß Protokoll entsalzt (3.4.6). Für die Konzentrationsabhängigkeit wurden pro Ansatz 0,8 mg/mL Protein verwendet und mit steigenden Konzentrationen Glutathiondisulfid (GSSG, 0-10 mM) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Analog dazu wurden für die Zeitabhängigkeit pro Ansatz 0,8 mg/mL Protein für 0-60 min mit 5 mM GSSG bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes PfPrx1a (AG Becker) mit 5 mM GSSG für 10 min bei 37 °C mitgeführt. Die Inkubation wurde durch Entfernung des GSSG mittels Gelfiltration gestoppt (3.4.6). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assays (3.4.4), wurden obengenannte Analysen durchgeführt. Für den Protein Immunoblot (3.4.5) wurden je 6 µg Protein (2 µg PfPrx1a) pro Probe in Probenpuffer ohne DTT verwendet.

3.4.11 Massenspektrometrie

Um zu analysieren, welche Cysteine durch S-Glutathionylierung bzw. S-Nitrosierung modifiziert wurden, erfolgte eine Analyse mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF). Rekombinanter hMIF sowie PfMIF^{WT} wurden gemäß dem Standardprotokoll gereinigt und anschließend 0,8 mg/mL Protein mit 10-fachem Überschuss an Cys-NO bzw. 5 mM GSSG gemäß dem jeweiligen Standardprotokoll (3.4.8, 3.4.10) modifiziert. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C gelagert und auf Trockeneis verschickt. Die Analyse wurde in der Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

3.4.12 Tautomeraseassay

MIF ist in der Lage das nicht-physiologische Substrat L-Dopachrom-Methylester (DCME) umzuwandeln (Abbildung 15). Diese Tauomerisierung lässt sich photometrisch bei 475 nm messen.

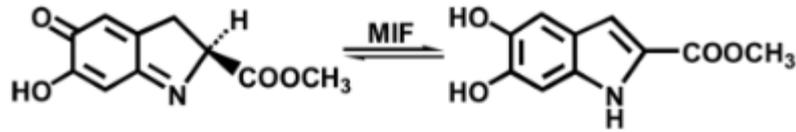


Abbildung 15 – Tautomerisierung von L-Dopachrom-Methylester

Der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) ist in der Lage das synthetische Substrat des 2-Carboxy-2,3-dihydroxyindol-5,6-quinon Methylesters (L-Dopachrom-Methylester) zu der farblosen Form 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylat zu tautomerisieren (Healy et al., 2011).

Die Herstellung von DCME erfolgte gemäß dem Protokoll von Zapatero *et al.* (Zapatero *et al.*, 2016) mit einigen Modifikationen. Gleiche Teile einer wässrigen 4 mM L-Dopa Methylester-Lösung wurden mit einer wässrigen 8 mM Natriumperiodatlösung gemischt und unter Ausschluss von Licht für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf Eis gelagert und überschüssiges Natriumperiodat entfernt. Hierfür wurden Vac 3cc Säulen (Waters) in Kombination mit dem VacMan (Promega) verwendet. Die Säule wurde zuerst mit 2 SV Methanol aktiviert, bevor sie mit 3 SV H₂O gewaschen wurde. Anschließend wurde 1x SV der DCME-Lösung appliziert und die Säule mit 10x SV H₂O gewaschen um Natriumperiodat zu entfernen. Reines DCME wurde mit Methanol eluiert; es wurden nur die intensiv farbigen Fraktionen gesammelt. Nach der Bestimmung der Konzentration (3.4.4) wurde das Substrat aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert (stabil für 3 Monate). Die Bestimmung der Tautomerase-Aktivitäten von hMIF, PfMIF sowie den PfMIF Mutanten erfolgte mit der gleichen Charge DCME.

$$c_{\text{DCME}} = \frac{(A_2 - A_1) \times 500 \mu\text{L}}{3.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10 \mu\text{L} \times 1 \text{ cm}}$$

Abbildung 16 – Berechnung der Konzentration von L-Dopachrom-Methylester nach Lambert-Beer

Vor dem Start der Messung der Tautomeraseaktivität sowie alle weiteren 30 min wurde die Konzentration des Substrats DCME ermittelt. Bei 25 °C und einer Wellenlänge von 475 nm wurde hierfür zunächst die Absorption von 490 µL des Tautomerase-Assay-Puffers gemessen (A_1). Anschließend wurden 10 µL des Substrats zugeben und erneut die Absorption bestimmt (A_2). Mithilfe des Extinktionskoeffizients sowie des Lambert Beer'schen Gesetzes konnte so die Konzentration des Substrats bestimmt werden (Abbildung 16). Die Messung der Tautomeraseaktivität von MIF wurde in einem Reaktionsvolumen von 500 µL durchgeführt. Protein wurde in verschiedenen Konzentrationen (hMIF: fc 0-0,05 µM; PfMIF: fc 0-1 µM) dem Puffer zugesetzt, bevor die Reaktion durch Zugabe von DCME gestartet wurde (fc 200 µM). Die Messung wurde bei 25 °C und einer Wellenlänge von 475 nm für 10 min alle 5 sec aufgezeichnet. Zur Beobachtung der Stabilität des Substrates wurde zusätzlich pro Messreihe Puffer mit 200 µM DCME als Kontrolle mitgeführt. Gemessen wurde die Reaktion mit dem UV/VIS-Spektrophotometer Evolution (Thermo Scientific). Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8.

3.4.13 Oxidoreduktaseassay

Zur Untersuchung der Oxidoreduktaseaktivität wurde der Insulin-Assay nach Holmgren (Holmgren, 1979), modifiziert für MIF, verwendet (Kleemann *et al.*, 1998a). Oxidoreduktasen sind in der Lage die Disulfidbrücken des Insulins zu reduzieren, sodass die unlösliche β -Kette präzipitiert. Dieses lässt sich mittels steigender Absorption bei 650 nm detektieren. Ein zugesetztes Reduktionsmittel recycelt die Oxidoreduktase, so dass die Reaktion erst endet, wenn das im Reaktionsansatz enthaltene Insulin vollständig reduziert ist.

Insulin wurde im Oxidoreduktaseassay-Puffer mit einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst. Zu 700 μ L dieses Puffers wurden 177,5 μ L Protein in steigenden Konzentrationen (PfMIF: fc 10-30 μ M) gegeben. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 22,5 μ L des jeweiligen Reduktionsmittels (DTT: fc 1 mM, GSH: fc 5 mM). Als Positivkontrolle diente hierbei der Reaktionsansatz von hTrx1^{C32S} (fc 1-7,5 μ M, zur Verfügung gestellt von der AG Becker) mit DTT als Reduktionsmittel. Die Reaktion wurde für 120 min, 25 °C bei 650 nm alle 15 sec gemessen. Laut Literatur lässt sich MIF nicht von DTT recyceln, daher wurde für diese Reaktion GSH verwendet. Gemessen wurde die Reaktion mit dem UV/VIS-Spektrophotometer Evolution 300 (Thermo Scientific). Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8.

3.4.14 CXCR2 und CXCR4 Rezeptorinteraktionstudie

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Bindung von PfMIF an seine humanen Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 darstellt, wurde rekombinantes Protein in einem β -Galaktosidaseassay untersucht. Hierfür wurde rekombinantes hMIF (Kontrolle), PfMIF^{WT} sowie alle Mutanten gemäß Standardprotokoll gereinigt (3.4.1). Zusätzlich wurde PfMIF^{WT} mit 5 mM GSSG (3.4.10) bzw. mit 10x Überschuss an Cys-NO modifiziert (3.4.8). Proben wurden bei -20 °C gelagert und zeitnah verschickt. Die weitere Analyse wurde durchgeführt von Priscila Bourilhón am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Zusammengefasst wurde der Hefestamm *Sacharomyces cerevisiae* (CY12946) verwendet, welcher einen funktionellen humanen Rezeptor (CXCR2 oder CXCR4) exprimiert (Rajasekaran *et al.*, 2016; Sachpatzidis *et al.*, 2003). Durch Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Transkription und Translation von β -Galaktosidase. Zellen wurden bei 30°C über Nacht in einem Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 mit Hefeextrakt Pepton Dextrose Medium verdünnt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erfolgte die Zugabe von 20 μ M rekombinantes Protein. Nach 1,5 h Inkubation erfolgt die Quantifizierung der β -Galaktosidaseaktivität und somit die Aktivierung des jeweiligen Rezeptors mittels dem BetaGlo Kit (Promega) (Lacy *et al.*, 2018; Sinitski *et al.*, 2019b).

3.5 Proteinkristallisation

Zur genauen Charakterisierung eines Proteins ist die Kenntnis über seine dreidimensionale Struktur essentiell. Die Struktur eines Proteins kann unter anderem durch posttranslationale Modifikationen (PTM) verändert werden, sodass vorher zugängliche Domänen verborgen oder zugänglich gemacht werden.

Zuerst muss das Protein in ausreichender Konzentration und Reinheit vorliegen. Damit sich Proteinkristalle bilden können, muss das Protein in Lösung zur Übersättigung gebracht werden, ohne dabei auszufallen. Die Zugabe von Fällungsmitteln (z. B. organische Lösungsmittel oder Polyethylenglykol (PEG)) kann die Keimbildung von Proteinkristallen begünstigen. Die Kristallisation darf dabei nicht zu schnell erfolgen, damit die Moleküle sich dreidimensional anordnen können und nicht präzipitieren. Neben dem pH-Wert des Puffers, der Proteinkonzentration sowie Konzentration und Beschaffenheit des Fällungsmittels gibt es noch zahlreiche weitere Faktoren, welche die Bildung von Proteinkristallen beeinflussen. Diese lassen sich nicht vorhersagen, sondern müssen durch intensive Vorversuche (Screenings) ermittelt werden. Generell unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Ansätzen beim Kristallisieren, der *batch* Kristallisation sowie der Dampfphasendiffusion. In dieser Arbeit wurde letztere Technik angewandt. Bei der Dampfphasendiffusion befindet sich eine Fällungsmittel-enthaltende Lösung (Reservoirlösung) in einem geschlossenen System zusammen mit einem Tropfen Proteinlösung gemischt mit Reservoirlösung. Aufgrund des Konzentrationsunterschieds nimmt die Reservoirlösung über die Dampfphase Wasser auf, sie wird also geringfügig verdünnt, während die Konzentration von Fällungsmittel sowie Protein im Tropfen langsam ansteigt. Es kann somit zu einer Keimbildung von Kristallen mit anschließendem Wachstum kommen. Bei der *sitting drop* Methode wird der Tropfen Proteinlösung auf einer Unterlage innerhalb eines Gefäßes platziert, wohingegen bei der *hanging drop* Methode der Tropfen auf einem Glasplättchen platziert wird, mit welchem gleichzeitig das Gefäß verschlossen wird (siehe Abbildung 17). Die Untersuchung eines erfolgreich gewachsenen Proteinkristalls erfolgt mittels Röntgenstrukturanalyse.

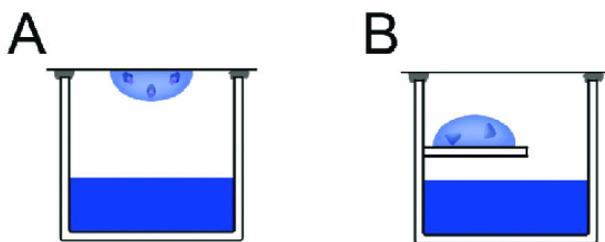


Abbildung 17 – Schematische Darstellung von Kristallisationstechniken

Mittels Dampfphasendiffusion lassen sich gute Bedingungen für das Wachstum von Proteinkristallen schaffen. In einem geeigneten Gefäß befindet sich eine Reservoirlösung mit Fällungsmittel. Proteinlösung vermischt mit Reservoirlösung wird als Tropfen innerhalb des geschlossenen Systems platziert. A: *Hanging drop* Methode, B: *Sitting drop* Methode (Krauss *et al.*, 2017).

Untersucht wurden Kristallisationsbedingungen für glutathionylierten bzw. nitrosierten PfMIF. Hierfür wurde gereinigtes, reduziertes Protein zuerst modifiziert. Für die S-Glutathionylierung wurde GSSG in 8-fachem Überschuss zu der Anzahl an Cysteinen in der Proteinlösung (ca. 15 mg/mL) dazugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 37 °C. Für die S-Nitrosierung wurde reduzierter PfMIF mit einer Konzentration von ca. 15 mg/mL mit 20 mM Cys-NO für 1 h bei 24 °C schüttelnd unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nach der jeweiligen Modifikation wurden die Proben entsalzt.

Kommerziell erworbene, sowie in der AG Becker erstellte Kristallisationsscreens (2.10.8) wurden mithilfe des Kristallisationsroboters HoneyBee 961 in 96-Well Platten mit der *sitting*

drop Methode gescreent. Im Well wurden 100 μL Reservoirlösung vorgelegt. Neben dem Well wurden zwei Tropfen auf der dafür vorgesehenen Ablage positioniert. Pro Tropfen wurden 200 nL Reservoirlösung mit 200 nL Proteinlösung bzw. 200 nL Puffer (Kontrolltropfen) gemischt. Anschließend wurden die Platten luftdicht mit Klebefolie verschlossen und bei RT gelagert. Kristallansätze wurden mit 15 und 20 mg/mL modifiziertem PfMIF durchgeführt. Mittels Stereomikroskop wurden die Tropfen regelmäßig visuell auf ein Kristallwachstum überprüft. Nachdem so günstige Bedingungen für Phasentrennung bzw. Keimbildung ermittelt wurden, wurden diese weiter variiert und mittels *hanging drop* Methode in Handansätzen untersucht. Hierbei betrug das Volumen der Reservoirlösung 800 μL . 2 μL Proteinlösung (15/20 mg/mL) wurden mit 2 μL Reservoirlösung auf einem Glasplättchen vermischt. Dieses wurde umgedreht über der Reservoirlösung positioniert. Platten wurden bei RT gelagert und Kristallwachstum wurde in regelmäßigen Abständen überprüft. Die weitere Analyse sowie Datenauswertung von Proteinkristallen wurden durchgeführt von Dr. Karin Fritz-Wolf. Proteinkristalle wurden am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg mittels einer Röntgenquelle analysiert. Konnte die Reinheit bestätigt sowie gute Beugung beobachtet werden, wurden für diese Kristalle an der Synchrotron-Lichtquelle Schweiz (SLS) am Paul-Scherrer-Institut Diffraktionsdaten erhoben.

4 Ergebnisse

4.1 Sulfenylom von *P. falciparum*

Verschiedene Studien zu Redoxmodifikation in *P. falciparum* gewähren einen ersten Einblick in die posttranslationale Regulation von Proteinen (Kehr *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Im Hinblick auf sulfenylierte Proteine in dem Parasiten sind bisher keine Informationen bekannt. Diese meist transiente oxidative Modifikation ist nicht nur ein Sensor für oxidativen Stress, sondern auch involviert im Redoxsignaling sowie im katalytischen Zyklus einiger Enzyme (Charles *et al.*, 2007). Zur Charakterisierung des Sulfenyloms von *P. falciparum* im Trophozoiten-Stadium wurde ein Massenspektrometrie (MS)-basierter *pull-down* durchgeführt. Hierbei wurden Trophozoiten in Gegenwart von boviner Katalase, NEM sowie BCN-Bio1 lysiert. Katalase wurde eingesetzt um intrazelluläres Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu neutralisieren und so Proteine vor Oxidation bzw. Hyperoxidation zu schützen. NEM bindet an Thiole und verhindert eine unspezifische Oxidation dieser während der Zelllyse. Durch den Einsatz dieser Substanzen wird das physiologische Sulfenylom weitestgehend geschützt. BCN-Bio1 bindet spezifisch an Sulfensäuren und erlaubt so die Anreicherung markierter Proteine. Mittels Avidinbeads konnten BCN-Bio1 markierte Proteine angereichert werden. Unspezifisch gebundene Proteine sowie mit sulfenylierten Proteinen interagierende Proteine wurden in intensiven Waschschritten entfernt. BCN-Bio1 markierte Proteine wurden von den Beads eluiert und mittels *multidimensional protein identification technique* (MudPIT), einem MS/MS Verfahren, analysiert (Abbildung 18). Dieser Versuch wurde im Rahmen meiner Masterarbeit durchgeführt (für weitere Details siehe (Schipper, 2015)).

Die erhobenen MS/MS-Daten wurden für diese Doktorarbeit nach neuester wissenschaftlicher Erkenntnis ausgewertet und analysiert (3.1). Tabelle 9 listet die in drei unabhängigen biologischen Replikaten identifizierten 102 sulfenylierte Proteine sowie deren 152 modifizierte Cysteine auf. Aufgrund der strikten statistischen Auswertung betrug die *false discovery rate* der identifizierten Peptide weniger als 1 %. Somit wurden auch Peptide berücksichtigt, welche nicht in allen drei Replikaten identifiziert werden konnten. Des Weiteren wurden nur Peptide berücksichtigt, für welche der spezifische Massenshift detektiert wurde, der auf eine Sulfenylierung hinweist.

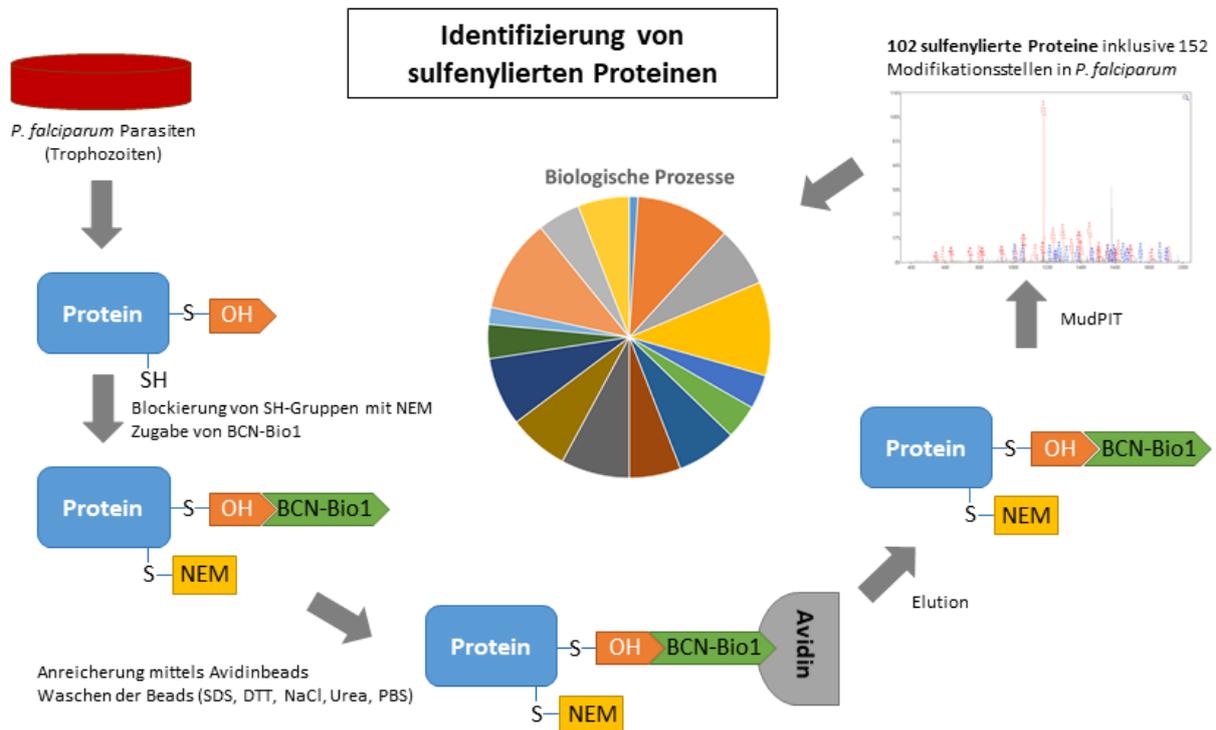


Abbildung 18 – Versuchsdurchführung des BCN-Bio1 pull-downs

Dargestellt sind die einzelnen Schritte des BCN-Bio1 pull-downs von der Zellyse über Anreicherung der markierten Proteine bis hin zur Massenspektrometrie. Es konnten 102 sulfenylierte Proteine mit 152 Modifikationsstellen identifiziert werden. Diese wurden gemäß ihrer Involvierung in biologischen Prozessen sortiert. Für weitere Details siehe Text.

Tabelle 9 – Mittels Massenspektrometrie identifizierte sulfenylierte Proteine

C: modifiziertes Cystein, kDa: Kilodalton, X: in der Probe wurde das Protein nicht identifiziert.

N°	PlasmoDB Zugangs N°	Proteinname	Molare Masse (kDa)	Sequenzabdeckung in jedem Replikat ^a	SOH Stelle ^b
1	PF3D7_0207600	Serine repeat antigen 5	111,8	48,4% / 58,8% / 57,4%	C672
2	PF3D7_0210000	Secretory complex protein 61 gamma subunit	9,3	34,6% / 34,6% / 34,6%	C19
3	PF3D7_0214000	T-complex protein 1, putative	61,0	48,2% / 51,3% / 40,8%	C184 C499
4	PF3D7_0214100	Protein transport protein SEC31	166,7	25,8% / 33,6% / 29,4%	C309
5	PF3D7_0309600	60S acidic ribosomal protein P2	11,9	92,0% / 92,0% / 82,1%	C12
6	PF3D7_0317000	Proteasome subunit alpha type-3, putative	29,3	46,0% / 42,9% / 39,3%	C222
7	PF3D7_0320300	T-complex protein 1 epsilon subunit, putative	59,2	40,4% / 25,6% / 32,7%	C458
8	PF3D7_0321800	WD repeat-containing protein, putative	322,2	X / X / 0,6%	C2321
9	PF3D7_0322000	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	19,0	64,3% / 49,1% / 49,1%	C69
10	PF3D7_0406400	Cytosolic glyoxalase II	30,5	45,6% / 42,6% / 42,2%	C4
11	PF3D7_0422300	Alpha tubulin 2	49,7	33,6% / 35,8% / 35,8%	C376
12	PF3D7_0511000	Translationally-controlled tumor protein homolog	20,0	60,2% / 60,2% / 67,3%	C14
13	PF3D7_0511800	Inositol-3-phosphate synthase	69,1	69,9% / 76,0% / 71,9%	C560
14	PF3D7_0513300	Purine nucleoside phosphorylase	26,9	71,4% / 69,8% / 82,0%	C71 C141 C208
15	PF3D7_0524000	Karyopherin beta	127,4	59,1% / 60,1% / 52,9%	C212 C452
16	PF3D7_0527500	Hsc70-interacting protein	51,1	29,7% / 30,8% / 23,4%	C17 C187
17	PF3D7_0608800	Ornithine aminotransferase	46,0	65,9% / 54,1% / 40,6%	C63
18	PF3D7_0619400	Cell division cycle protein 48 homologue, putative	92,4	56,2% / 61,4% / 67,4%	C418 + C425 C425

19	PF3D7_0621200	Pyridoxine biosynthesis protein PDX1	33,0	63,1% / 62,5% / 63,1%	C575 C16 C177
20	PF3D7_0624600	SNF2 helicase, putative	315,6	22,6% / 25,7% / 23,3%	C147 + C150*
21	PF3D7_0626800	Pyruvate kinase	55,7	60,3% / 56,6% / 58,7%	C222 C302 C343 C433
22	PF3D7_0627500	Protein DJ-1	20,3	86,2% / 86,2% / 81,5%	C85 C106/C106'
23	PF3D7_0708400	Heat shock protein 90	86,2	58,3% / 63,0% / 59,9%	C393 C616
24	PF3D7_0708800	Heat shock protein 110	100,0	50,2% / 57,4% / 59,9%	C265 C606
25	PF3D7_0711500	Regulator of chromosome condensation, putative	78,9	30,1% / 24,9% / 30,5%	C66
26	PF3D7_0717700	Serine-tRNA ligase, putative	62,5	45,1% / 60,1% / 51,0%	C247
27	PF3D7_0727400	Proteasome subunit alpha type-5, putative	28,4	82,8% / 75,0% / 82,8%	C76 C112
28	PF3D7_0802200	1-cys peroxiredoxin	25,2	58,6% / 61,4% / 45,0%	C101
29	PF3D7_0807500	Proteasome subunit alpha type-6, putative	29,5	81,9% / 77,3% / 68,8%	C172
30	PF3D7_0810800	Dihydropteroate synthetase	83,4	43,2% / 51,4% / 42,1%	C473
31	PF3D7_0811400	Conserved protein, unknown function	71,4	45,9% / 54,1% / 43,9%	C517
32	PF3D7_0812500	RNA-binding protein, putative	117,1	7,1% / 8,5% / 6,4%	C182'
33	PF3D7_0813300	Conserved Plasmodium protein, unknown function	36,3	32,4% / 32,4% / 32,4%	C61
34	PF3D7_0814900	Superoxide dismutase [Fe]	22,7	72,2% / 90,9% / 72,7%	C85 C116
35	PF3D7_0818200	14-3-3 protein	30,2	65,6% / 63,0% / 61,1%	C41
36	PF3D7_0818900	Heat shock protein 70 (PfHsp70-1)	73,9	77,3% / 65,6% / 68,5%	C28

37	PF3D7_0826700	Receptor for activated c kinase	35,7	57,6% / 58,5% / 60,4%	C583 C162 C177 C216 C384
38	PF3D7_0827900	Protein disulfide isomerase	55,5	68,1% / 69,8% / 75,2%	C384 C387
39	PF3D7_0903700	Alpha tubulin 1	50,3	45,3% / 49,0% / 43,9%	C376
40	PF3D7_0915400	6-phosphofruktokinase	159,5	55,7% / 54,5% / 53,2%	C645 C1321 C1038
41	PF3D7_0918900	Gamma-glutamylcysteine synthetase	124,5	22,8% / 29,6% / 32,8%	C1036 C1038
42	PF3D7_0922200	S-adenosylmethionine synthetase	44,8	71,9% / 73,1% / 68,4%	C264
43	PF3D7_0922600	Glutamine synthetase, putative	63,2	57,3% / 61,7% / 50,3%	C66 C346 C479
44	PF3D7_0923800.1 PF3D7_0923800.2	Thioredoxin reductase	68,7	44,7% / 34,2% / 39,7% 51,0% / 39,0% / 45,3%	C422
45	PF3D7_0926700	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase, putative	97,8	24,7% / 22,8% / 11,9%	C91
46	PF3D7_0929400	High molecular weight rhopty protein 2	162,7	61,3% / 60,4% / 62,6%	C1344/C1344'
47	PF3D7_0930300	Merozoite surface protein 1	195,7	41,5% / 60,6% / 63,7%	C173
48	PF3D7_0932300	M18 aspartyl aminopeptidase	65,6	52,6% / 52,3% / 49,5%	C226
49	PF3D7_1008700	Tubulin beta chain	49,8	42,9% / 50,8% / 43,8%	C127 C129
50	PF3D7_1011800	PRE-binding protein	131,6	49,0% / 46,8% / 51,8%	C505
51	PF3D7_1012400	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	26,4	72,7% / 81,8% / 73,2%	C134
52	PF3D7_1015900	Enolase	48,7	81,8% / 83,9% / 87,2%	C157

53	PF3D7_1023900	Chromodomain-helicase-DNA-binding homolog, putative	protein	1	381,3	16,0% / 18,4% / 19,4%	C370 C1375
54	PF3D7_1028700	Merozoite TRAP-like protein			58,1	X / 8,4% / 26,3%	C47
55	PF3D7_1029600	Adenosine deaminase			42,5	68,7% / 80,7% / 70,3%	C173 C281
56	PF3D7_1033400	Haloacid dehalogenase-like hydrolase			32,8	56,9% / 55,9% / 63,5%	C92
57	PF3D7_1103100	60S acidic ribosomal protein P1, putative			13,0	85,6% / 83,1% / 83,1%	C19
58	PF3D7_1103700	Casein kinase II beta chain			28,4	29,4% / 34,3% / 27,3%	C122
59	PF3D7_1115400	Cysteine proteinase falcipain 3			56,7	42,9% / 48,4% / 41,9%	C331
60	PF3D7_1118200	Heat shock protein 90, putative			108,5	43,2% / 48,6% / 39,2%	C556
61	PF3D7_1118300	Insulinase, putative			173,6	36,6% / 31,3% / 31,9%	C322 C1364
62	PF3D7_1124600	Ethanolamine kinase			49,9	39,5% / 53,2% / 57,4%	C283
63	PF3D7_1126000	Threonine-tRNA ligase			119,5	43,8% / 47,0% / 40,4%	C428 C589 C767
64	PF3D7_1144500	Ubiquitin activating enzyme (E1) subunit Aos1, putative			39,7	28,1% / 25,7% / 29,9%	C297
65	PF3D7_1204300	Eukaryotic translation initiation factor 5A			17,6	51,6% / 51,6% / 54,0%	C73
66	PF3D7_1205600	Conserved Plasmodium protein, unknown function			39,0	28,5% / 37,2% / 27,6%	C213
67	PF3D7_1224300	polyadenylate-binding protein, putative			97,2	40,6% / 50,3% / 48,9%	C410
68	PF3D7_1225800	Ubiquitin-activating enzyme E1			131,8	48,6% / 51,2% / 46,5%	C641
69	PF3D7_1229400	Macrophage migration inhibitory factor			12,8	94,8% / 95,7% / 95,7%	C3/C3' C4/C4' C3+C4
70	PF3D7_1242800	Rab specific GDP dissociation inhibitor			52,3	54,5% / 64,7% / 56,0%	C250
71	PF3D7_1248900	26S protease regulatory subunit 8, putative			49,5	33,1% / 32,2% / 35,6%	C391
72	PF3D7_1302800	40S ribosomal protein S7, putative			22,5	48,5% / 22,2% / 33,0%	C23

73	PF3D7_1306400	26S protease regulatory subunit 10B, putative	44,7	35,6% / 42,2% / 38,9%	C111'
74	PF3D7_1311800	M1-family alanyl aminopeptidase	126,1	76,9% / 80,0% / 78,9%	C140 C617
75	PF3D7_1311900	Vacuolar ATP synthase subunit a	68,6	72,5% / 79,5% / 67,3%	C526
76	PF3D7_1323400	60S ribosomal protein L23	22,1	31,6% / 25,3% / 19,5%	C134
77	PF3D7_1324900	L-lactate dehydrogenase	34,1	74,4% / 72,5% / 71,8%	C59 C260
78	PF3D7_1338300	Elongation factor 1-gamma, putative	47,8	46,0% / 55,2% / 54,3%	C70
79	PF3D7_1343000	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	31,0	82,0% / 82,0% / 86,1%	C70 C87 C161
80	PF3D7_1344200	Heat shock protein 110, putative	108,2	62,4% / 72,4% / 73,6%	C23
81	PF3D7_1346300	DNA/RNA-binding protein Alba 2	25,0	51,2% / 46,0% / 46,4%	C133
82	PF3D7_1347500	DNA/RNA-binding protein Alba 4	42,2	70,7% / 77,4% / 74,2%	C63 C286
83	PF3D7_1354500	Adenylosuccinate synthetase	50,1	46,4% / 52,9% / 35,5%	C283 C396
84	PF3D7_1357000 / PF3D7_1357100	Elongation factor 1-alpha	49,0	68,8% / 63,9% / 67,5%	C356
85	PF3D7_1360800	Falcylisin	138,9	51,4% / 57,3% / 61,3%	C438
86	PF3D7_1361100	Protein transport protein Sec24A	106,7	22,6% / 28,5% / 29,0%	C251
87	PF3D7_1361800	Conserved Plasmodium protein, unknown function	291,0	42,7% / 39,8% / 41,5%	C821 C1337 C1549
88	PF3D7_1402300	26S proteasome regulatory subunit RPN6	78,4	20,6% / 23,0% / 16,2%	C377
89	PF3D7_1406300	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	56,3	67,4% / 68,2% / 53,9%	C91
90	PF3D7_1407800	Plasmeprin IV	51,0	47,0% / 48,8% / 43,0%	C370
91	PF3D7_1414400	Serine/threonine protein phosphatase PP1	34,9	50,3% / 58,2% / 53,3%	C169

92	PF3D7_1434600	Methionine aminopeptidase 2	71,7	33,9% / 30,4% / 25,3%	C447
93	PF3D7_1438000	Eukaryotic translation initiation factor eIF2A, putative	76,8	36,6% / 36,9% / 31,6%	C176
94	PF3D7_1438900	Thioredoxin peroxidase 1	21,8	79,0% / 86,2% / 63,6%	C170
95	PF3D7_1439900	Triosephosphate isomerase	27,9	72,2% / 73,8% / 76,2%	C217
96	PF3D7_1444800	Fructose-bisphosphate aldolase	40,1	84,0% / 83,2% / 82,1%	C247
97	PF3D7_1446200	M17 leucyl aminopeptidase	67,8	59,0% / 53,9% / 55,4%	C121
98	PF3D7_1451100	Elongation factor 2	93,5	59,3% / 63,3% / 67,1%	C130 C362 C653 C725 C786
99	PF3D7_1461900	Valine--tRNA ligase, putative	128,1	45,0% / 53,1% / 45,2%	C428
100	PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,6	78,9% / 81,9% / 81,6%	C58 C157 C250
101	PF3D7_1468700	Eukaryotic initiation factor 4A	45,3	67,3% / 67,3% / 63,8%	C291
102	PF3D7_1473300	CKK domain-containing protein, putative	114,3	X / 1,4% / 1,4%	C456

a) Gibt an zu wie viel Prozent die Proteinsequenz in jedem der drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente in der MS Analyse abgedeckt wurde.
b) Als sulfenyliert identifizierte Cysteine und ihre Position in der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins. Cysteine wurde als sulfenyliert betrachtet, wenn sie mittels spezifischen Massenverschiebung von +141.0426 (C = SO-NEM) und +392.1759 (C' = SO-BCN-Bio1) detektiert wurden. "C+C'" bedeutet, die beiden Cysteine wurden in der gleichen Peptidsequenz als sulfenyliert identifiziert.

4.2 Macrophage migration inhibitory factor

4.2.1 Heterologe Überexpression und Reinigung von hMIF und PfMIF

Die Gensequenzen für PfMIF sowie hMIF wurden als codon-optimierte synthetische Gene bestellt (Eurofins MWG, Ebersberg), mithilfe der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI in den Expressionsvektor pET30 kloniert und anschließend für die Proteinsynthese in kompetente BL21 *E. coli* Zellen transformiert. Die Synthese und Reinigung von PfMIF und hMIF erfolgten in Anlehnung an die Protokolle von Dobson *et al.* und Zapatero *et al.* mit Modifikationen (Dobson *et al.*, 2009; Zapatero *et al.*, 2016) (siehe 3.3.2, 3.4.1). Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels C-terminalen His₆-tag über Ni-NTA Affinitätschromatographie. Hierbei lag die durchschnittliche Ausbeute von gereinigtem Protein bei 40 mg/L *E. coli* Kultur. Abbildung 19 zeigt repräsentative Gele einer Proteinreinigung. Rekombinanter hMIF zeigte eine Bande bei ungefähr 14 kDa, welches in etwa der monomeren Form des Proteins von 13,5 kDa entspricht. Für PfMIF konnte ebenfalls eine starke Bande bei 14 kDa beobachtet werden. Zusätzlich dazu zeigten sich schwächere Banden im höhermolekularen Bereich. Die saubersten Fraktionen wurden gepoolt und enthaltenes Imidazol entfernt. Gereinigtes Protein wurde mit 1 mM TCEP versetzt und bei -20 °C gelagert. Wurden Proteine längere Zeit gelagert, konnte eine Abnahme der Tautomeraseaktivität beobachtet werden. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurden Proteine innerhalb von einer Woche analysiert.

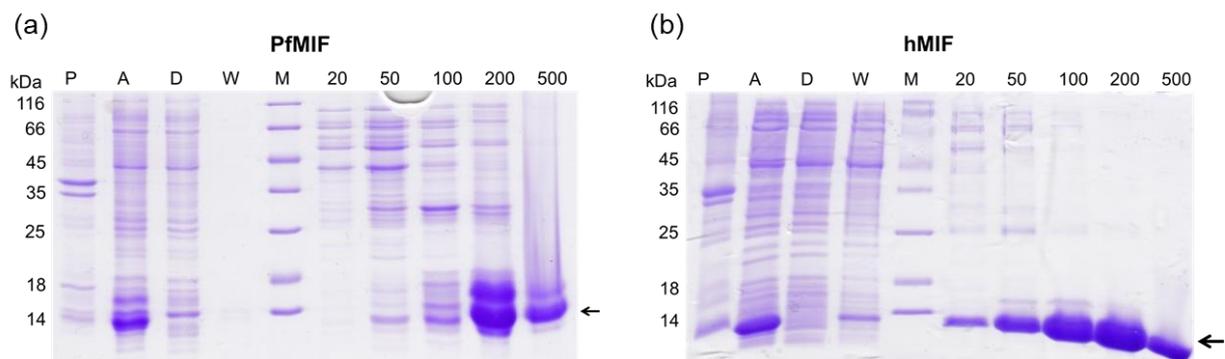


Abbildung 19 – Reinigung von PfMIF und hMIF

Coomassie-Färbung eines 15 % SDS-Page Gels der Reinigung von PfMIF (a) und hMIF (b). Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie via Ni-NTA als Säulenmaterial gereinigt. M: *Unstained Protein Molecular Weight* Marker; P: Pellet; A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Wasch. Die Zahlen oberhalb des Gels geben die jeweilige Imidazolkonzentration der Elution in mM an. Die Pfeile zeigen auf das jeweilige gereinigte Protein mit einem Molekulargewicht von 13,9 kDa (PfMIF) bzw. 13,5 kDa (hMIF).

4.2.2 Oligomerisierung von hMIF und PfMIF

Mittels Größenausschlusschromatographie wurde anschließend der Oligomerisierungszustand von rekombinantem reduzierten hMIF sowie nativem und reduziertem PfMIF untersucht. Mit 0,5 mM reduzierter PfMIF und hMIF eluierten bei ungefähr 89 mL, was einer molekularen Masse von etwa 36 kDa entspricht (Abbildung 20). Die theoretische Masse des Trimers liegt mit 41,7 kDa für PfMIF bzw. 40,5 kDa für hMIF etwas höher als der experimentell bestimmte Wert. Dieses Phänomen lässt sich oft bei der

Größenausschlusschromatographie beobachten. Reduzierter hMIF zeigte zusätzlich einen wesentlich kleineren Peak bei ungefähr 78 mL, was einem Oktamer entsprechen würde (Abbildung 20 (c)). Ohne Reduktionsmittel gereinigter und gelagerter PfMIF zeigte in der Größenausschlusschromatographie einen hohen Peak bei 86 mL, sowie zwei kleinere Peaks bei 77 und 63 mL. Erster entspricht ungefähr 47 kDa und lag damit etwas höher als der Trimerpeak von reduziertem PfMIF. Der zweite Peak entspricht mit 112 kDa der theoretischen Masse des Oktamers. Der kleinste Peak entspricht einer molekularen Masse von 427 kDa und könnte ein Oligomer aus 30 PfMIF-Untereinheiten sein. Alle gesammelten proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (3.4.2) und zeigten eine Bande bei ungefähr 14 kDa (Daten nicht gezeigt).

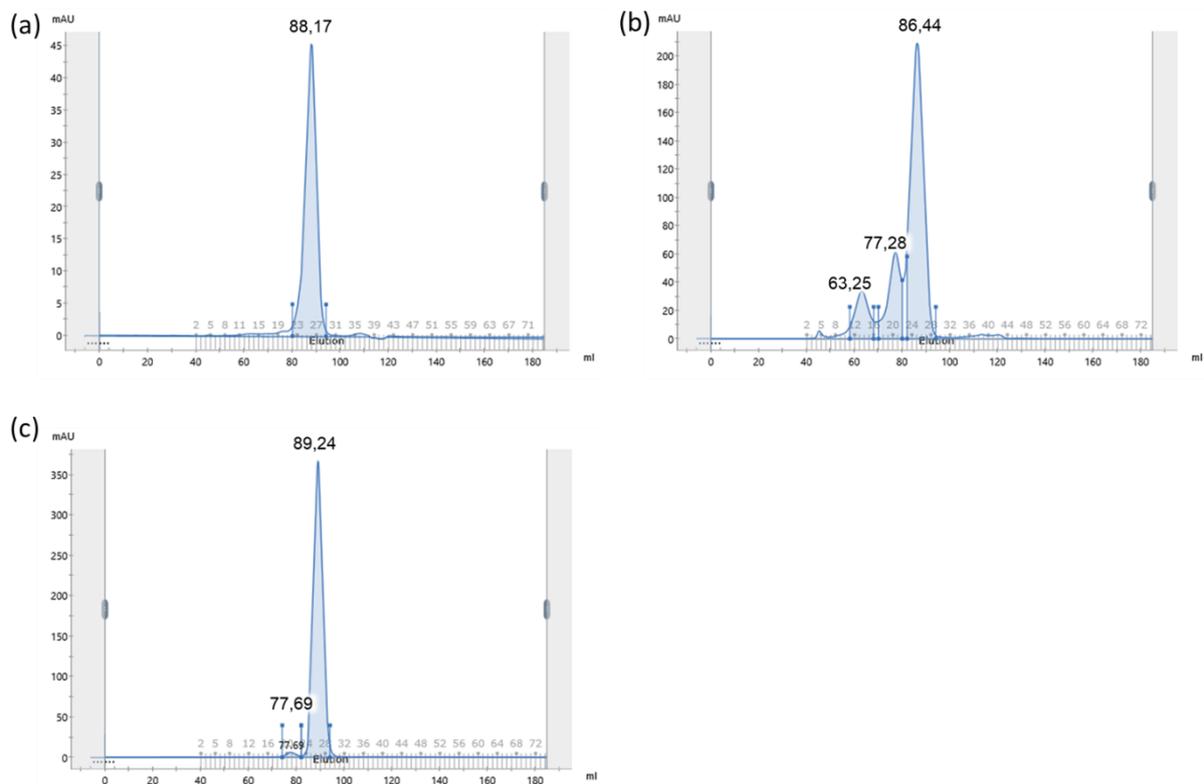


Abbildung 20 – Größenausschlusschromatographie von PfMIF und hMIF

Rekombinanter MIF wurde mittels Größenausschlusschromatographie auf den Oligomerisierungszustand untersucht. (a) PfMIF gereinigt und analysiert mit 0,5 mM TCEP, (b) PfMIF, (c) hMIF gereinigt und analysiert mit 0,5 mM TCEP. Gezeigt sind die Werte einer Messung.

4.2.3 Mutagenese

Um genauer die Funktion und den Einfluss der vier Cysteine in PfMIF zu untersuchen, wurden mehrere Cystein-Mangelmutanten generiert. Hierfür wurde mittels Mutagenese-PCR das jeweilige für Cystein-codierende Codon gegen ein für Alanin-codierendes Codon ausgetauscht. Die Effizienz der Mutagenese-PCR wurde anschließend mittels Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigt. Mit dieser Methode wurden die Mutanten PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A}, PfMIF^{C59A}, PfMIF^{C103A} sowie PfMIF^{C3A/C4A} hergestellt.

4.2.4 Heterologe Überexpression und Reinigung von PfMIF Mutanten

Basierend auf dem etablierten Proteinsyntheseprotokoll (3.3.2) für MIF wurden verschiedene Bedingungen für die Proteinsynthese der PfMIF-Mutanten getestet. Hierfür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Proteinsynthese Proben entnommen und diese im Protein Immunoblot mithilfe eines His₆-tag Antikörpers untersucht (3.4.5). Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Testsynthese von PfMIF^{C3A/C4A}. Vor der Induktion der Proteinsynthese ist eine Bande bei ungefähr 14 kDa im Protein Immunoblot sichtbar. Diese *leaky expression* ist bei allen BL21(DE3) Zelllinien zu beobachten. Zusätzlich ist eine Doppelbande bei 25 kDa zu erkennen. Während die Doppelbande nach der Induktion der Proteinsynthese nicht an Intensität zunimmt, ist eine deutliche Zunahme der Signalintensität der 14 kDa Bande erkennbar. Während der untersuchten vier Stunden der Testsynthese blieb das Signal der Banden weitestgehend konstant. Zusätzlich sind im Hintergrund des Protein Immunoblots in jeder Spur schwache Signale für höhermolekulare Proteine zu erkennen. Viele Proteine in *E. coli* enthalten *per se* Histidine, an welche der Antikörper binden kann. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Testexpressionen der anderen Mutanten (Daten nicht gezeigt).

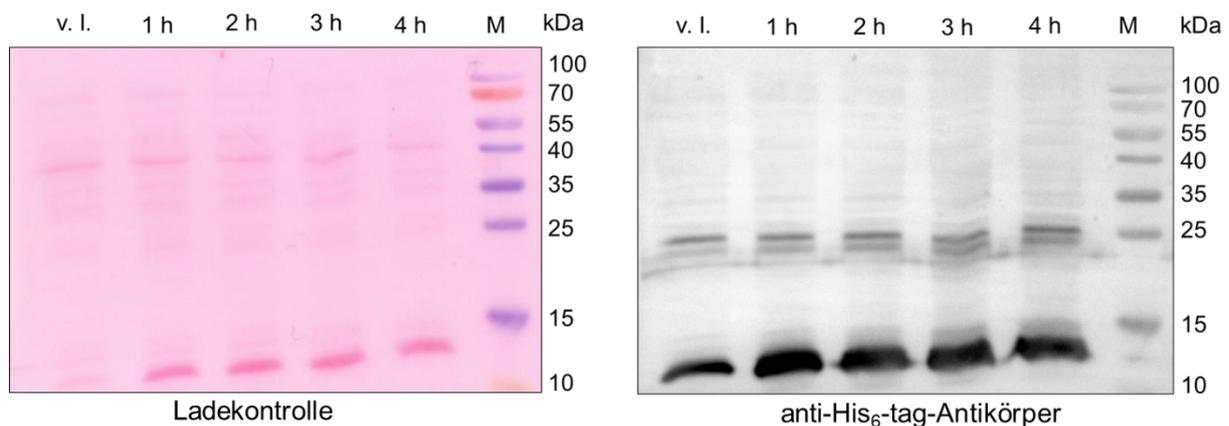


Abbildung 21 – Protein Immunoblot der PfMIF^{C3A/C4A} Testsynthese

E. coli BL21(DE) wurde mit pET30 + *Pfmif*^{C3A/C4A} transformiert. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 mit IPTG induziert. Während der Proteinsynthese wurde vier Stunden lang stündlich eine Probe entnommen. Proben wurden im Protein Immunoblot mithilfe eines anti-His₆-tag-Antikörper auf das Vorhandensein von Histidin-reichen Motiven analysiert. Die Ponceau-Färbung der PVDF-Membran diente als Ladekontrolle. v. l.: vor Induktion, 1-4 h: nach 1-4 h entnommene Probe, M: *Prestained Protein Molecular Weight Marker*.

Es konnte gezeigt werden, dass die Mutanten unter den gleichen Bedingungen wie PfMIF^{WT} exprimieren, sodass für alle Proteine ein Standardprotokoll verwendet werden konnte. Analog dazu wurde die Reinigung der Cystein-Mangelmутanten unter denselben Bedingungen wie für das WT-Protein getestet (3.4.1). Abbildung 22 zeigt repräsentative SDS-PAGE Gele der Reinigung von PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A}, PfMIF^{C59A}, PfMIF^{C103A} sowie PfMIF^{C3A/C4A}. Die Ausbeuten der Proteine waren vergleichbar mit PfMIF^{WT}. Allerdings waren die Mutanten teilweise nicht so rein wie PfMIF^{WT}. Vor allem bei PfMIF^{C59A} und PfMIF^{C3A/C4A} zeigte sich zusätzlich eine Bande bei ungefähr 25 kDa. Die Mutanten scheinen eine leichte Verunreinigung mit *E. coli* Proteinen aufzuweisen. Dies gilt es bei Assays zu beachten. Gereinigtes Protein wurde mit 1 mM TCEP

versetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Im Tautomeraseassay zeigte sich eine leichte Abnahme der Enzymaktivität nach längerer Lagerung der Proteine. Daher wurden gereinigte Proteine zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit innerhalb von einer Woche analysiert.

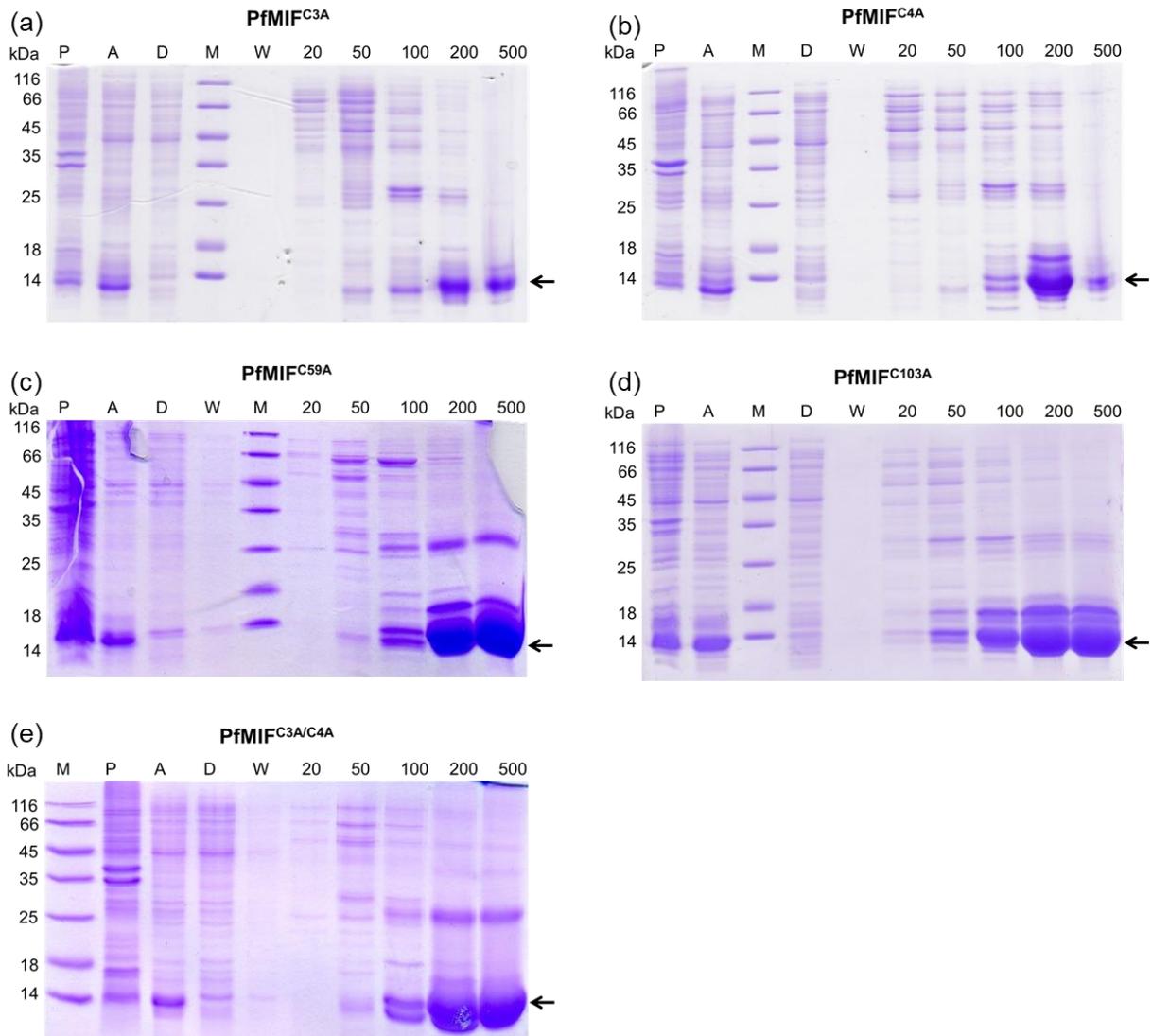


Abbildung 22 – Reinigung von PfMIF Mutanten

Coomassie-Färbung eines 15 % SDS-Page Gels der Reinigung von PfMIF Mutanten. Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie via Ni-NTA als Säulenmaterial gereinigt. (a) PfMIF^{C3A}, (b) PfMIF^{C4A}, (c) PfMIF^{C59A}, (d) PfMIF^{C103A}, (e) PfMIF^{C3A/C4A}. M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; P: Pellet; A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Wasch. Die Zahlen oberhalb des Gels geben die jeweilige Imidazolkonzentration der Elution in mM an. Die Pfeile zeigen auf das jeweilige gereinigte Protein mit einem Molekulargewicht von 13,9 kDa.

4.2.5 Oxidoreduktaseaktivität von MIF

Laut Literatur verfügt MIF über eine Oxidoreduktaseaktivität (Kleemann *et al.*, 1998b). Basierend auf dem Insulinassay nach Holmgren wurde die Bestimmung dieser durchgeführt (Holmgren, 1979) (3.4.13). Durch die Reduktion von Disulfidbrücken im Insulin präzipitiert die unlösliche β -Kette, was sich als steigende Absorption bei 650 nm verfolgen lässt. Durch die

Zugabe eines Reduktionsmittels wird die Oxidoreduktase recycelt, sodass die Reaktion nur durch die Menge an zugegebenem Insulin limitiert wird. Laut Literatur wird der Assay mit MIF als Oxidoreduktase entweder mit DTT oder mit GSH als Reduktionsmittel durchgeführt (Alam *et al.*, 2011; Kleemann *et al.*, 1998a). Somit wurden beide Protokolle parallel getestet.

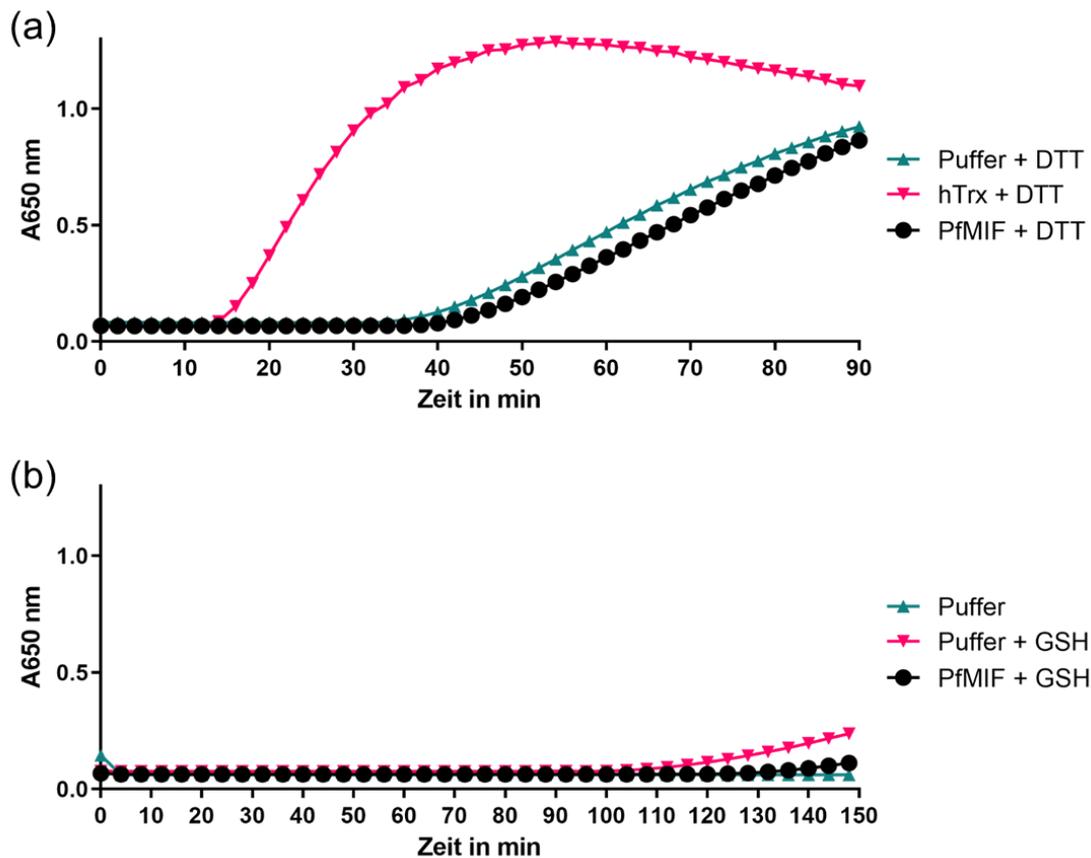


Abbildung 23 – Oxidoreduktaseassay von PfMIF

Reduziertes Protein wurde in Puffer mit Insulin und einem Reduktionsmittel inkubiert. Wurde Insulin reduziert, dann fiel die unlösliche β -Kette aus, was als Anstieg in A650 nm detektiert wurde. (a) Assaypuffer, 1 μM hTrx1^{C32S} oder 30 μM PfMIF wurden mit 1 mM DTT inkubiert. (b) 30 μM PfMIF bzw. Puffer wurden mit 5 mM GSH inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Puffer mitgeführt. In jeder gemessenen Probe war der Puffer mit Insulin versetzt. Gezeigt sind die exemplarischen Werte einer Messung.

Verschiedene Negativkontrollen wurden mitgeführt. Puffer mit Insulin aber ohne Enzym führte zu keinem Anstieg in der Absorption im Laufe der 150-minütigen Messung. Des Weiteren wurde Puffer mit 5 mM GSH sowie Puffer mit 1 mM DTT parallel untersucht. Die Kontrolle mit GSH zeigte einen Anstieg der Absorption nach 120 min (Abbildung 23 (b)). In der Kontrolle mit DTT kam es nach 38 min zu einem Anstieg in der gemessenen Absorption. Die Positivkontrolle hTrx1^{C32S} mit 1 mM DTT zeigte nach ca. 15 min einen Anstieg der Absorption. 30 μM PfMIF wurden sowohl mit 1 mM DTT als auch mit 5 mM GSH inkubiert um beide in der Literatur beschriebenen Bedingungen zu untersuchen. In der Probe mit GSH war nach ca. 140 min ein langsamer Anstieg der Absorption zu verzeichnen, dies war etwas später als in der Negativkontrolle mit GSH ohne Protein. PfMIF inkubiert mit DTT als Reduktionsmittel führte zu

einem Absorptionsanstieg nach ca. 40 min, was wiederum knapp hinter dem Anstieg der Probe Puffer mit DTT lag (siehe Abbildung 23 (a)). Somit ließ sich keine Oxidoreduktaseaktivität durch PfMIF nachweisen. Gleiches wurde für hMIF beobachtet (Daten nicht gezeigt). Für hTrx1^{C32S} konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Oxidoreduktaseaktivität beobachtet werden.

4.2.6 Tautomeraseaktivität von MIF und Mutanten

Zur Untersuchung der Tautomeraseaktivität der gereinigten Proteine wurde der Tautomeraseassay durchgeführt (3.4.12). MIF ist in der Lage das rötliche Substrat L-Dopachrom-Methylester (DCME) in die farblose Form 6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure-Methylester (DHICAME) zu tautomerisieren. In der Literatur werden für den Assay verschiedene Bedingungen beschrieben. Vortests zeigten, dass die Stabilität des Substrates DCME durch den verwendeten Assaypuffer stark beeinflusst wird. Zur Optimierung der Substratstabilität wurden drei verschiedene Puffer parallel getestet. Puffer 1 (50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 6,0 Puffer (Wang *et al.*, 2016)), Puffer 2 (50 mM Bis-Tris, pH 6,2 (Healy *et al.*, 2011)) und Puffer 3 (50 mM Bis-Tris, 0,025 % BSA, 300 µM CHAPS, 1 mM EDTA, pH 6,2 (Zapatero *et al.*, 2016)) wurden parallel mit der gleichen Menge an DCME versetzt und die Absorption bei 475 nm für zehn Minuten gemessen. Hierbei zeigte sich, dass DCME die geringste Stabilität in Puffer 1 aufwies. Puffer 2 erhöhte die Stabilität des Substrats, aber in Puffer 3 zeigte sich die geringste spontane Tautomerisierung von DCME (Abbildung 24). Für die folgenden Versuche wurde daher nur noch dieser Puffer (50 mM Bis-Tris, 0,025 % BSA, 300 µM CHAPS, 1 mM EDTA, pH 6,2) verwendet.

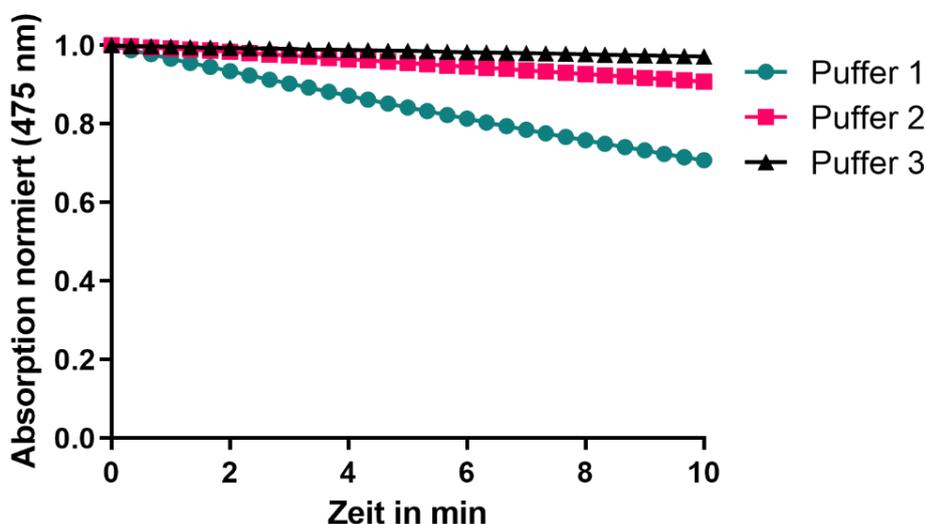


Abbildung 24 – Stabilitätstest von DCME in verschiedenen Assaypuffern

Für 10 min wurde die Absorption bei 475 nm von 200 µM DCME in verschiedenen Puffern aufgetragen. Puffer 1: 1 mM EDTA, 50mM KH₂PO₄, pH 6,0. Puffer 2: 50 mM Bis-Tris, pH 6,2. Puffer 3: 50 mM Bis-Tris, 0,025 % BSA, 300 µM CHAPS, 1 mM EDTA, pH 6,2. Die Startabsorption wurde als 1 gesetzt und alle gemessenen Werte diesbezüglich normiert.

Nachdem das Protokoll für den Tautomeraseassay etabliert wurde, wurde die Enzymaktivität des rekombinanten Proteins bestimmt. Hierfür wurde hMIF in verschiedenen Konzentrationen mit DCME inkubiert und über zehn Minuten die Absorption bei 475 nm gemessen. Abbildung 25 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion. Je mehr Protein eingesetzt wird, desto schneller findet die Tautomerisierung von DCME statt. Bei hohen Proteinkonzentrationen von 0,05 μM und 0,04 μM hMIF konnte eine sehr schnelle Tautomerisierung beobachtet werden.

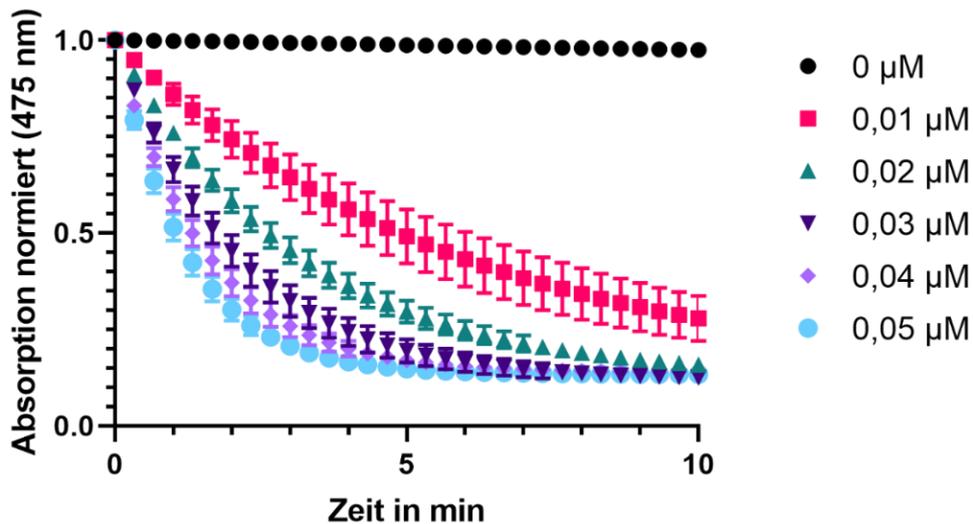


Abbildung 25 – Tautomeraseaktivitätsmessung von hMIF

Zu 0-0,05 μM hMIF wurden jeweils 200 μM DCME gegeben und die Tautomerisierung für zehn Minuten über die Absorptionänderung bei 475 nm gemessen. Die Startabsorption wurde als 1 gesetzt und alle gemessenen Werte diesbezüglich normiert. Gezeigt sind Werte von 3 unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD.

Die Enzymaktivität der Cystein-Mangelmutanten wurde parallel zu PfMIF^{WT} im Tautomeraseassay untersucht. Laut Literatur weist PfMIF, verglichen mit hMIF, eine verringerte Tautomeraseaktivität auf, daher wurden höhere Proteinkonzentrationen von 0-1 μM eingesetzt (Augustijn *et al.*, 2007). Abbildung 26 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Tautomeraseaktivität von PfMIF^{WT} sowie den fünf Cystein-zu-Alanin-Mutanten. Hierbei lässt sich erkennen, dass die Enzymaktivität der Mutanten PfMIF^{C4A} und PfMIF^{C59A} der des WT-Proteins ähnelt. Im Gegensatz dazu scheint die Fähigkeit der Mutanten PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C103A} und PfMIF^{C3A/C4A} DCME zu tautomerisieren stark verringert zu sein. Dieser Effekt ist am stärksten bei PfMIF^{C3A/C4A} zu beobachten.

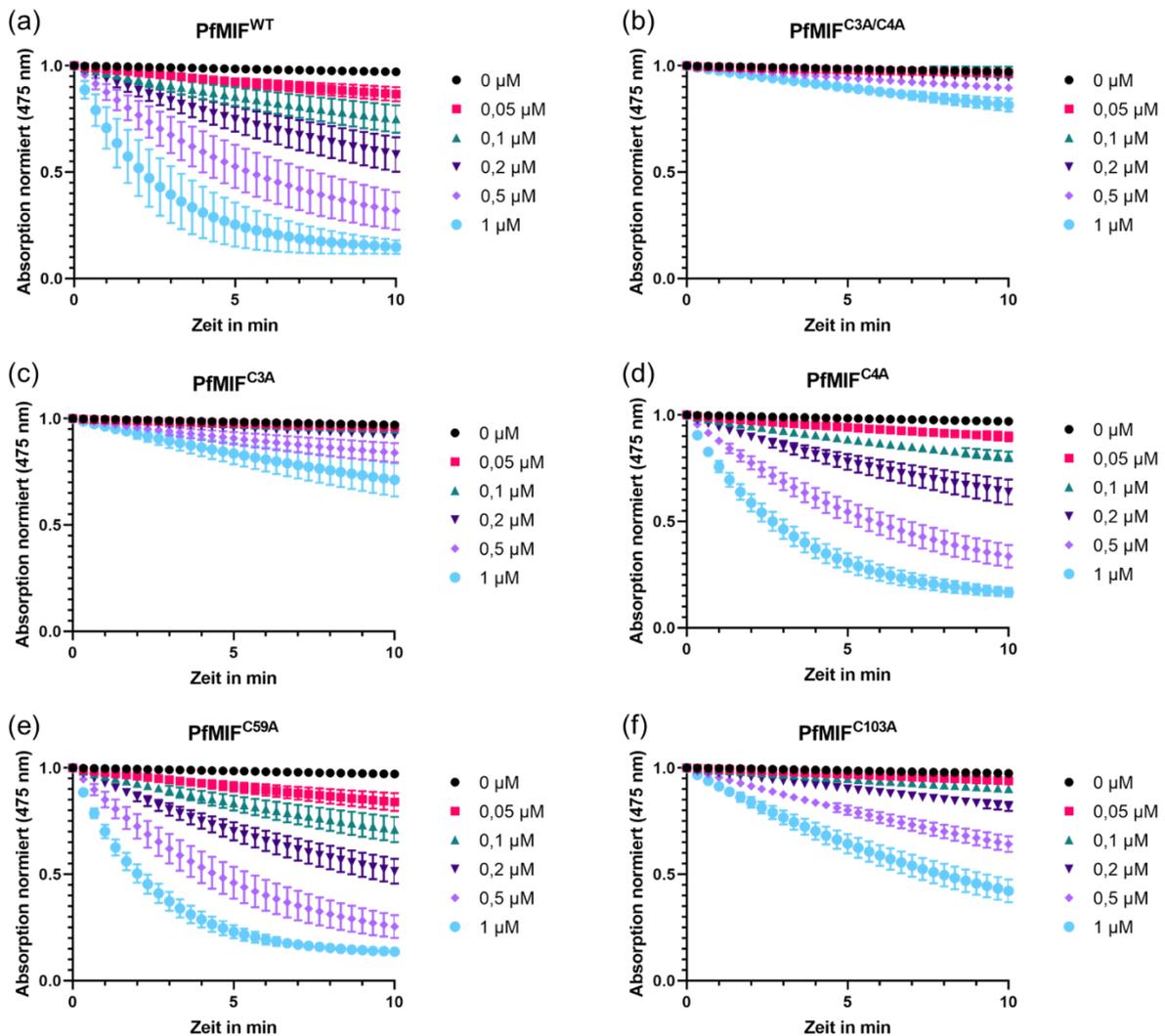


Abbildung 26 – Tautomeraseaktivitätsmessung von PfMIF^{WT} und Mutanten

Zu 0-1 μM PfMIF wurden 200 μM DCME gegeben und anschließend die Absorption bei 475 nm für zehn Minuten gemessen. Die Startabsorption wurde als 1 gesetzt und alle gemessenen Werte diesbezüglich normiert. (a) PfMIF^{WT}, (b) PfMIF^{C3A/C4A}, (c) PfMIF^{C3A}, (d) PfMIF^{C4A}, (e) PfMIF^{C59A}, (f) PfMIF^{C103A}. Gezeigt sind Werte von 3 unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD.

Zur besseren Veranschaulichung des Unterschiedes zwischen PfMIF^{WT} und den Cystein-zu-Alanin Mutanten wurden die normierten A_{475 nm}-Werte für die jeweilige Messung mit 0,5 μM Protein in einem Graphen zusammengefasst (siehe Abbildung 27 (a)). Hierbei zeigt sich der Unterschied hinsichtlich der Tautomeraseaktivität von PfMIF^{WT} sowie den Mutanten. PfMIF^{C103A} zeigt mit einer finalen Absorption von ca. 0,6 einen fast doppelt so hohen Wert im Vergleich mit dem WT-Protein. Somit tautomerisiert die Mutante DCME ungefähr halb so effektiv wie der WT. PfMIF^{C3A} sowie PfMIF^{C3A/C4A} zeigen eine um fast 70% verringerte Enzymaktivität, wohingegen die Mutanten PfMIF^{C4A} und PfMIF^{C59A} das Substrat fast genauso gut umsetzen können wie das WT-Protein. Abbildung 27 (b) zeigt, dass die Verringerung der Tautomeraseaktivität durch die Cystein-zu-Alanin Mutationen C3A, C103A und C3A/C4A signifikant ist.

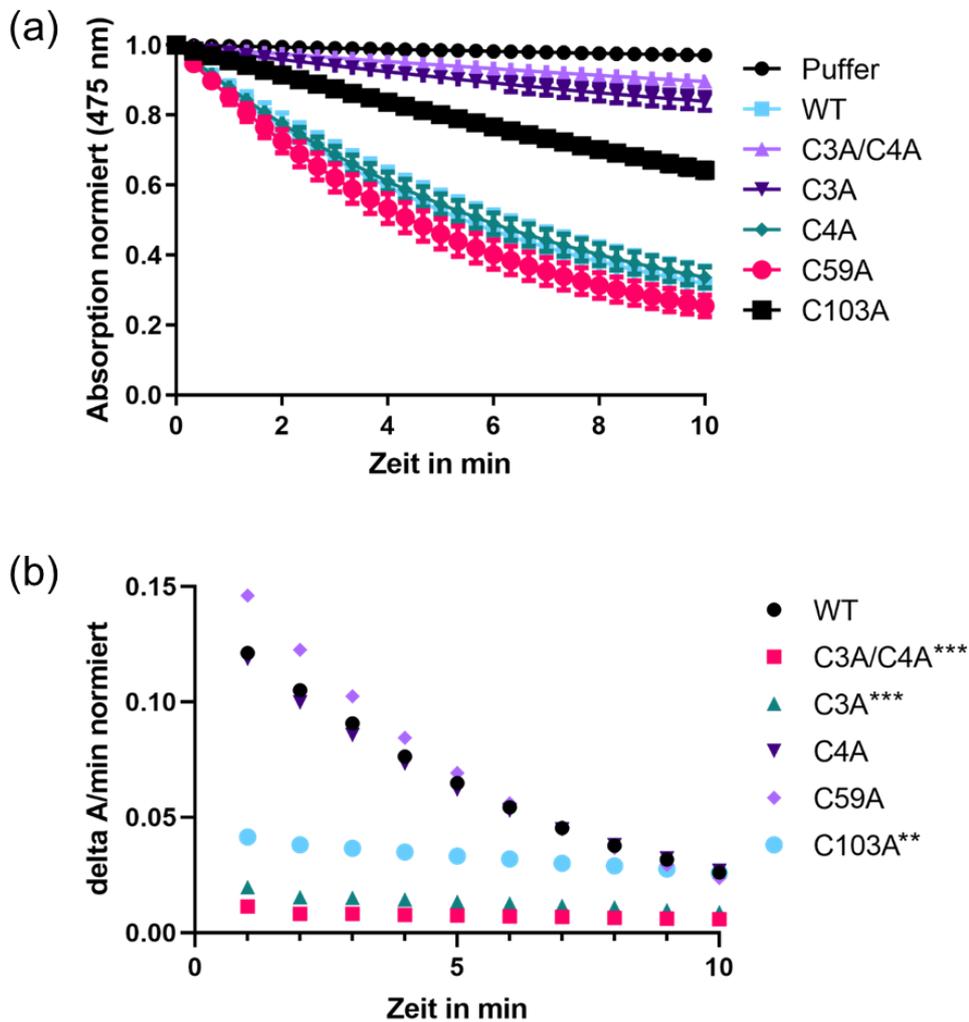


Abbildung 27 – Vergleich der Tautomeraseaktivität von PfMIF^{WT} und Mutanten

(a) Zur Bestimmung der Tautomeraseaktivität wurde je 0,5 μM PfMIF mit 200 μM DCME versetzt. Die Absorption bei 475 nm wurde für 10 min gemessen. Die Startabsorption wurde als 1 gesetzt und alle gemessenen Werte diesbezüglich normiert. Gezeigt sind Werte von 3 unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD. (b) Ausgehend vom Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen wurde delta A/min bestimmt. Anschließend wurde von diesem Wert das delta A/min von DCME in Puffer abgezogen, um normierte Werte zu erhalten. Mittels zweiseitigem ungepaartem t-Test wurden die Werte von PfMIF^{WT} mit denen der Mutanten verglichen. **** P-Wert $<0,0001$; ** P-Wert $<0,01$.

4.2.7 Posttranslationale Redoxmodifikationen von MIF

4.2.7.1 Sulfenylierung

Gemäß Protokoll gereinigtes Protein wurde, wie unter 3.4.7 beschrieben, mit steigenden Konzentrationen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sulfenyliert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Dimedon, welches spezifisch an Sulfensäuren bindet. Entsprechend vorbereitete Proben wurden mittels anti-Cystein-SOH-Antikörpers im Protein Immunoblot analysiert. hMIF zeigt mit steigender Wasserstoffperoxidkonzentration kein Sulfenylierungssignal (Abbildung 28 (a)). Im Gegensatz dazu lässt sich bei der Immunofluoreszenzdetektion von PfMIF eine Zunahme der

Signalintensität der 14 kDa Bande beobachten. Ab einer Inkubation mit 5 mM Wasserstoffperoxid wird im Protein Immunoblot zusätzlich eine 25 kDa Bande sichtbar. Wurde das Protein jedoch mit mehr als 20 mM H_2O_2 inkubiert, so nahm die Signalstärke der Banden ab. Dies spricht für eine Hyperoxidation zu Sulfin- bzw. Sulfonsäuren, welche nicht von Dimedon markiert werden. Jedoch zeigt sich bei der Analyse bereits ein schwaches Signal des Antikörpers bei reduziertem PfMIF, vergleichbar mit dem Signal des mit 0,5 mM H_2O_2 inkubierten Proteins (Abbildung 28 (b)).

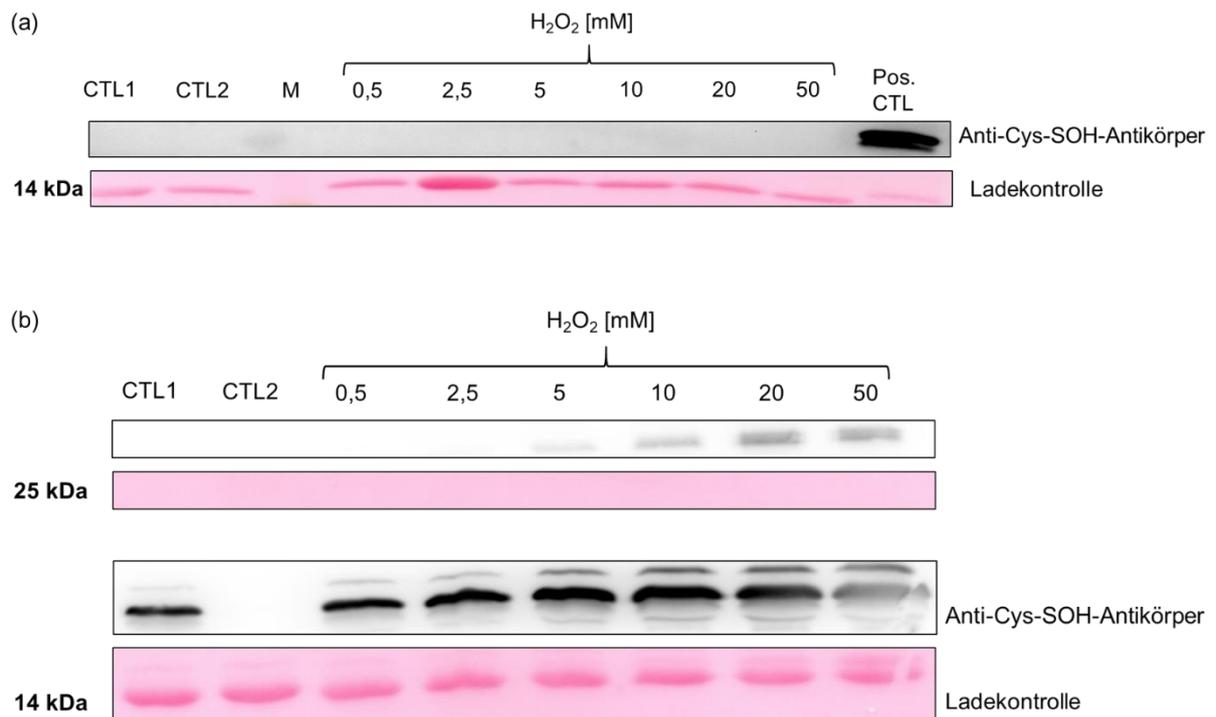


Abbildung 28 – Protein Immunoblot der Sulfenylierung von MIF

Reduzierter MIF wurde mit 0-50 mM H_2O_2 für 10 min bei RT inkubiert. Potenziell induzierte Sulfenylierung wurden mittels Dimedon markiert und anschließend mithilfe eines anti-Cystein-SOH-Antikörpers im Protein Immunoblot visualisiert. Hierbei wurden jeweils 2 μ g Protein pro Spur verwendet. Als Positivkontrolle wurde PfMIF mit 2,5 mM H_2O_2 mitgeführt. Als zusätzliche Kontrollen wurde eine Probe nicht oxidiert (CTL1) und eine nicht mit Dimedon behandelt (CTL2). (a) Sulfenylierung von hMIF. (b) Sulfenylierung von PfMIF. Die Ponceau-Färbung der PVDF-Membran diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Blots von 2 unabhängigen biologischen Replikaten. CTL: Kontrolle, Pos. CTL: Positivkontrolle.

4.2.7.2 S-Glutathionylierung

Rekombinant hergestellter MIF wurde gemäß Kapitel 3.4.10 glutathionyliert. Nach der Entfernung von überschüssigem GSSG aus den Proben, wurden diese mittels Immunofluoreszenzdetektion visualisiert. Als Positivkontrolle wurde PfPrx1a mitgeführt. Zur Untersuchung, ob die Modifikation abhängig von der Inkubationszeit bzw. der Konzentration des GSSGs ist, wurden verschiedene Bedingungen untersucht. Proteine wurden 2, 5, 10, 30 oder 60 min lang mit 5 mM GSSG inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Probe 0 min in welcher keine Zugabe von GSSG erfolgte. Für die Untersuchung der

Konzentrationsabhängigkeit der S-Glutathionylierung wurden die Konzentrationen 0,2, 0,5, 1, 5 und 10 mM GSSG eingesetzt. Mittels anti-Glutathion-Antikörper ließ sich keine Modifikation an hMIF detektieren, weder in der Zeit- noch in der Konzentrationsabhängigkeitsuntersuchung (siehe Abbildung 29).

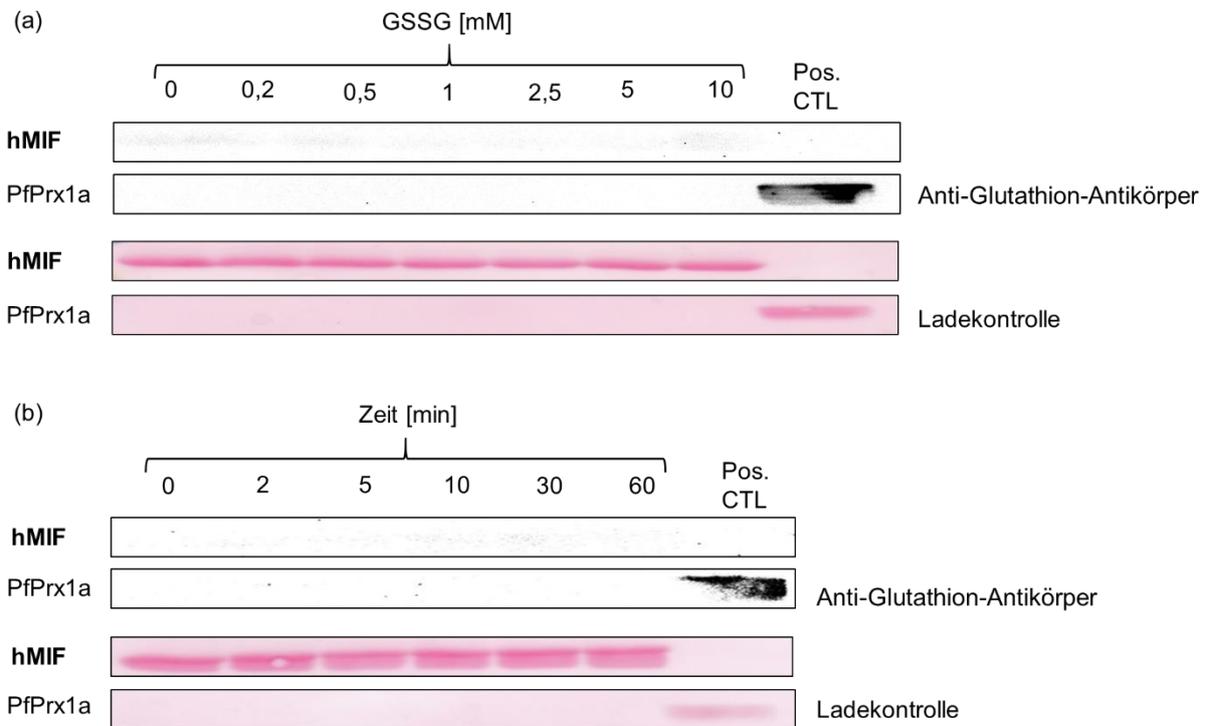


Abbildung 29 – Protein Immunoblot der S-Glutathionylierung von hMIF

Für die Konzentrationsabhängigkeitsuntersuchung wurde reduzierter hMIF mit 0-10 mM GSSG für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit von S-Glutathionylierung wurde reduzierter hMIF für 0-60 min mit 5 mM GSSG bei 37 °C inkubiert. Jeweils 6 µg Protein wurden mithilfe eines anti-Glutathion-Antikörpers auf eine potenzielle S-Glutathionylierung analysiert. PfPrx1a wurde parallel glutathionyliert und diente als Positivkontrolle (2 µg). Die Ponceau-Färbung der PVDF-Membran diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Blots von 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Pos. CTL: Positivkontrolle.

Die Immunofluoreszenzdetektion für PfMIF ergab ein Glutathionylierungssignal der 14 kDa Bande. Bei der Zeitabhängigkeit war bereits in der Negativkontrolle ein schwaches Signal detektierbar. Mit steigender Inkubationszeit nahm das Signal leicht zu (siehe Abbildung 30 (a)). Hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit war ein Anstieg in der Signalintensität mit steigender GSSG-Konzentration zu beobachten, die stärkste Bande konnte in der mit 10 mM GSSG inkubierten Probe verzeichnet werden (siehe Abbildung 30 (b)).

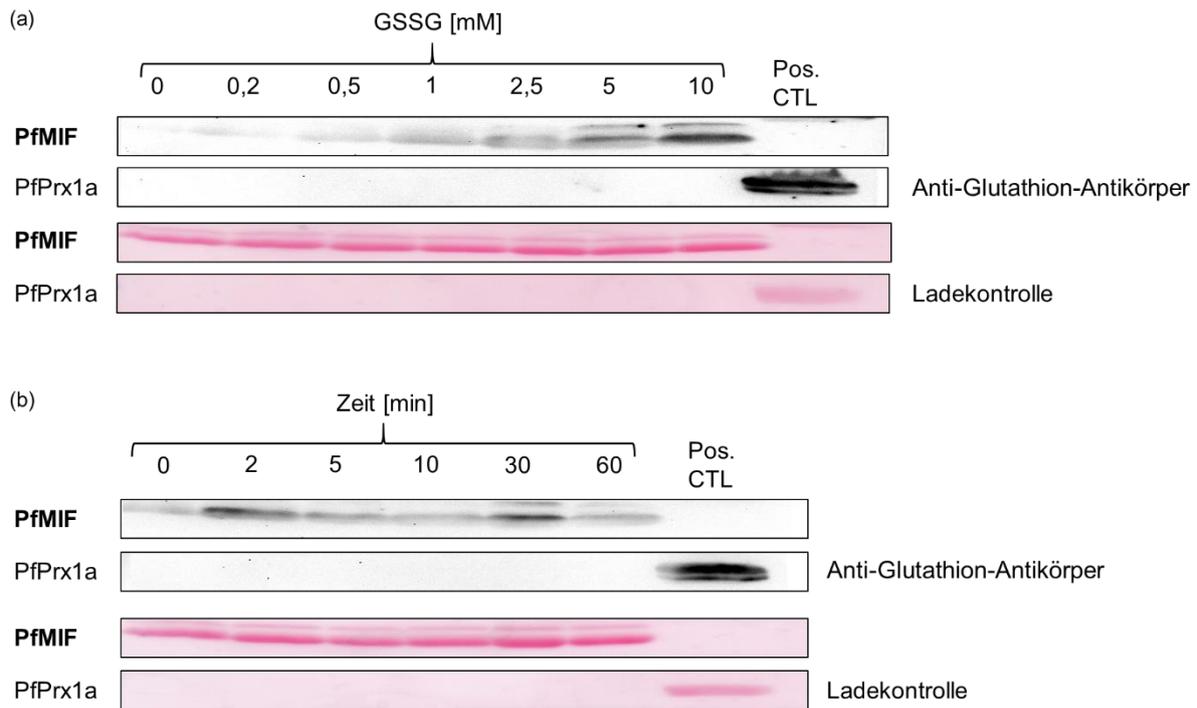


Abbildung 30 – Protein Immunoblot der S-Glutathionylierung von PfMIF

Für die Konzentrationsabhängigkeitsuntersuchung wurde reduzierter PfMIF mit 0-10 mM GSSG für 10 min bei 37 °C inkubiert (a). Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit von S-Glutathionylierung wurde reduzierter PfMIF für 0-60 min mit 5 mM GSSG bei 37 °C inkubiert (b). Mittels anti-Glutathion-Antikörpers wurde eine potentielle S-Glutathionylierung im Protein Immunoblot visualisiert (6 µg Protein aufgetragen). PfPrx1a wurde parallel glutathionyliert und diente als Positivkontrolle (2 µg). Die Ponceau-Färbung der PVDF-Membran diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Blots von 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Pos. CTL: Positivkontrolle.

Zum direkten Vergleich der Zugänglichkeit der Proteine von MIF Wildtyp sowie Mutanten, wurden diese unter den gleichen Bedingungen glutathionyliert (10 min bei 37 °C und 5 mM GSSG) und auf einem Blot untersucht (Abbildung 31). Obwohl in der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeitsuntersuchung von hMIF kein Signal detektiert wurde (Abbildung 29), konnte in diesem Blot ein S-Glutathionylierungssignal für das Protein bei 14 kDa beobachtet werden. Dieses war nur unwesentlich schwächer als das Signal für PfMIF. Die Cystein-zu-Alanin Mutanten weisen ein verändertes Bandenmuster verglichen mit dem PfMIF^{WT} Protein auf. Sowohl PfMIF^{C3A} als auch PfMIF^{C4A} zeigen ein starkes Doppelbandenmuster der 14 kDa Bande und insgesamt das stärkste Glutathionylierungssignal. Zusätzlich zeigen alle Proteine außer hMIF eine weitere Bande bei 25 kDa, welche ebenfalls glutathionyliert wird. In den Proben von PfMIF^{C59A} sowie PfMIF^{C4A} sind weitere Banden im höheren kDa-Bereich sichtbar, welche durch den anti-Glutathion-Antikörper markiert werden.

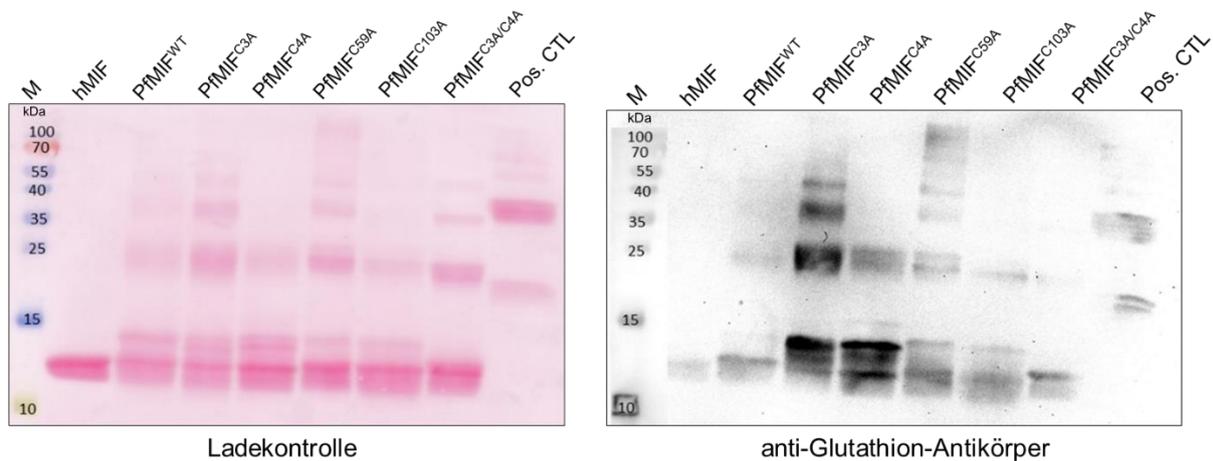


Abbildung 31 – Protein Immunoblot der S-Glutathionylierung von MIF und Mutanten

Reduzierter MIF wurde mit 5 mM GSSG für 10 min bei 37 °C inkubiert. Je 6 µg Probe wurden mittels anti-Glutathion-Antikörpers im Protein Immunoblot untersucht. PfPrx1a wurde parallel glutathionyliert und diente als Positivkontrolle (2 µg). Die Ponceau-Färbung der PVDF-Membran diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Blots von 3 unabhängigen biologischen Replikaten. WT: PfMIF^{WT}. Pos. CTL: Positivkontrolle.

Einfluss von S-Glutathionylierung auf die Tautomeraseaktivität von hMIF sowie PfMIF

Parallel zur Immunofluoreszenzdetektion wurden gemäß Kapitel 3.4.10 die glutathionylierten Proben auf ihre Enzymaktivität im Tautomeraseassay untersucht. Hierbei zeigte sich weder in der Konzentrations- noch in der Zeitabhängigkeit eine signifikante Änderung durch diese Redoxmodifikation (siehe Abbildung 32). Dies gilt sowohl für PfMIF als auch für hMIF.

Die Mutanten PfMIF^{C4A} und PfMIF^{C59A} wurden mit 0, 5 und 10 mM GSSG für 10 min inkubiert und anschließend ebenfalls hinsichtlich ihrer Tautomeraseaktivität untersucht. Hierbei ließ sich ebenfalls keine signifikante Änderung der Enzymaktivität durch die Redoxmodifikation erkennen (Daten nicht gezeigt). Da die anderen Mutanten von PfMIF eine verringerte bzw. keine Tautomeraseaktivität gezeigt haben, wurden diese nicht hinsichtlich einer Veränderung der Enzymaktivität durch S-Glutathionylierung untersucht.

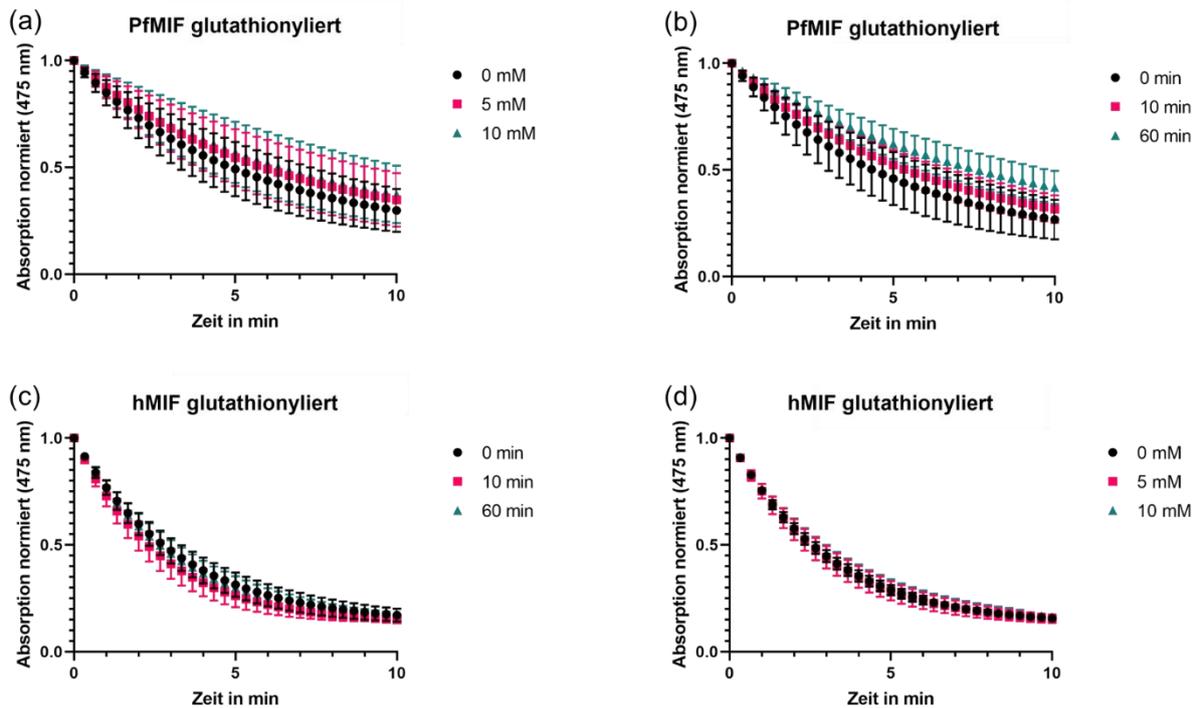


Abbildung 32 – Tautomeraseaktivitätsmessung von glutathionyliertem MIF

Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der S-Glutathionylierung wurde MIF mit 5 mM GSSG für 0, 10 und 60 min inkubiert. Für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der S-Glutathionylierung wurde MIF für 10 min mit 0, 5 und 10 mM GSSG inkubiert. Die Tautomeraseaktivität der modifizierten Proteine wurden für 10 min bei A475 nm gemessen. PfMIF wurde mit 0,5 μ M Protein pro Ansatz eingesetzt und hMIF mit 0,02 μ M Protein. Die Startabsorption wurde auf 1 normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD. (a) PfMIF Konzentrationsabhängigkeit, (b) PfMIF Zeitabhängigkeit, (c) hMIF Konzentrationsabhängigkeit, (d) hMIF Zeitabhängigkeit.

MALDI-TOF MS Analyse von glutathionyliertem MIF

Um zu überprüfen, welche Cysteine durch S-Glutathionylierung modifiziert werden, wurde PfMIF sowie hMIF gemäß Kapitel 3.4.10 in drei biologisch unabhängigen Replikaten modifiziert und anschließend mittels MALDI-TOF MS von der Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik der Philipps Universität Marburg untersucht. In der MS konnte 51 % der Aminosäuresequenz von hMIF identifiziert werden. Cystein 81 wurde als glutathionyliert identifiziert, wohingegen die Cysteine des aktiven Zentrums C57 und C60 nicht detektiert wurden. Von PfMIF wurden 62 % der Aminosäuresequenz identifiziert. Hierbei erschienen Cystein 59 und 103 als glutathionyliert. Cystein 3 und 4 wurden nicht detektiert.

4.2.7.3 S-Nitrosierung

Zur Untersuchung inwiefern hMIF und PfMIF nitrosiert werden können, wurden reduzierte Proteine für 1 h mit dem 10-fachen Überschuss an Cys-NO im Verhältnis zu den in der Probe enthaltenen Cysteinen inkubiert. So modifizierte Proteine wurden anschließend mittels Biotin Switch Technik (BST) weiter prozessiert. Hierbei wurden parallel die drei verschiedenen Blockierungsreagenzien N-Ethylmaleimid (NEM), Iodoacetamid (IAA) und Methylmethan-

thiosulfonat (MMTS) eingesetzt. Anschließend wurden Proben mittels anti-Biotin-Antikörper im Protein Immunoblot untersucht. Aufgrund der geringen eingesetzten Proteinmenge ließ sich nach dem finalen Waschschrift im BST keine Proteinkonzentration mehr bestimmen. Es wurden daher gleiche Probenvolumina anstatt Konzentrationen aufgetragen. Dadurch konnte die Ladekontrolle bei einigen Proben nur schwach in der Ponceaufärbung dargestellt werden. Abbildung 33 zeigt das Ergebnis der BST von hMIF. Hierbei zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Bandenmuster, je nach verwendetem Blockierungsreagenz. Wurde NEM verwendet, so lassen sich nur sehr schwache Banden erkennen. Blockierung von freien Thiolen mit MMTS führt zu einem schwachen Signal, allerdings auch in der Negativkontrolle in welcher hMIF nicht mit Cys-NO inkubiert wurde. Nur die zweite Negativkontrolle, in welcher kein PEG2-Biotin eingesetzt wurde, zeigt kein Signal im Protein Immunoblot. Das stärkste Signal wurde in der Positivkontrolle der BST mit IAA als Blockierungsreagenz detektiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hMIF durch Cys-NO transnitrosiert zu werden scheint.

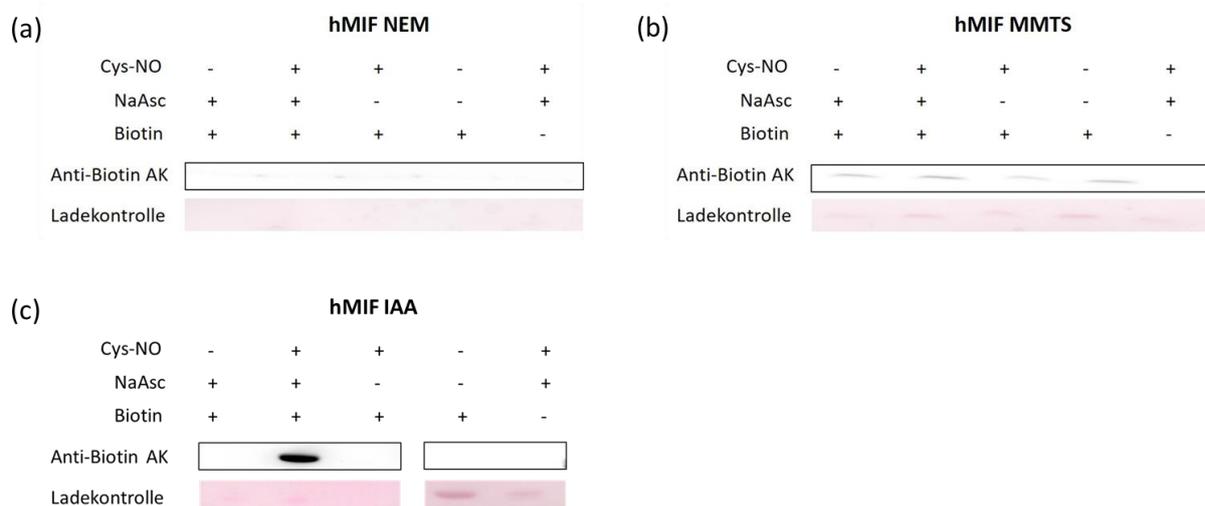


Abbildung 33 – Protein Immunoblot der Biotin Switch Technik von hMIF

Reduzierter hMIF wurde für 1 h mit 1,7 M Cys-NO inkubiert und anschließend mittels Biotin Switch Technik auf eine Sensitivität gegen Transnitrosierung durch Cys-NO untersucht. Hierfür wurden verschiedene Blockierungsmittel parallel getestet. (a) NEM, (b) MMTS, (c) IAA. Kontrollen ohne Iodoacteyl-PEG2-Biotin, ohne Cys-NO und/ oder Natriumascorbat (NaAsc) wurden parallel vorbereitet. Mithilfe eines anti-Biotin-Antikörpers wurden modifizierte Proteine im Protein Immunoblot visualisiert. Gezeigt sind repräsentative Blots aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die Ponceau-Färbung diente als Ladekontrolle.

Analog dem Ergebnis der BST von hMIF konnte für PfMIF ebenfalls ein unterschiedliches Bandenmuster im Protein Immunoblot in Abhängigkeit vom verwendeten Blockierungsreagenz beobachtet werden (Abbildung 34). Unabhängig von den eingesetzten Substanzen innerhalb der BST zeigte sich fast immer eine 14 kDa Bande nach Immunofluoreszenzdetektion, auch wenn die Probe zuvor nicht nitrosiert wurde. Sowohl für die Proben welche mit NEM blockiert wurden, als auch für die Proben welche mit MMTS blockiert wurden, lassen sich deutliche Banden detektieren. Lediglich die Negativkontrolle welche ohne Biotin inkubiert wurde, zeigte kein Signal nach Zugabe des anti-Biotin-Antikörpers. Bemerkenswerterweise zeigte die Probe,

welche weder nitrosiert noch denitrosiert wurde, das stärkste Signal nach Blockierung mit MMTS. Lediglich in dem Ansatz mit IAA als Blockierungsreagenz zeigte die Positivkontrolle das stärkste Signal. Aber auch an diesem Blot zeigte sich ein Signal für die Negativkontrollen.

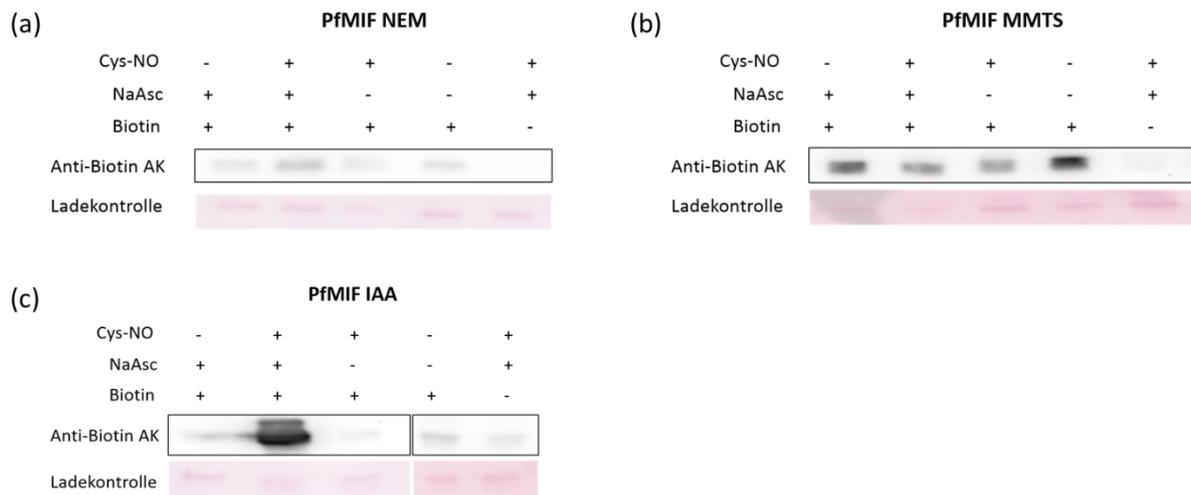


Abbildung 34 – Protein Immunblot der Biotin Switch Technik von PfMIF

Reduzierter PfMIF wurde für 1 h mit 2,3 M Cys-NO inkubiert und anschließend mittels Biotin Switch Technik auf eine Sensitivität gegen Transnitrosierung durch Cys-NO untersucht. Hierfür wurden verschiedene Blockierungsmittel parallel getestet. (a) NEM, (b) MMTS, (c) IAA. Kontrollen ohne Iodoacteyl-PEG2-Biotin, ohne Cys-NO und/ oder Natriumascorbat (NaAsc) wurden parallel vorbereitet. Mithilfe eines anti-Biotin-Antikörpers wurden modifizierte Proteine im Protein Immunoblot visualisiert. Gezeigt sind repräsentative Blots aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die Ponceau-Färbung diente als Ladekontrolle.

Einfluss von S-Nitrosierung auf Enzymaktivität

Es scheinen sowohl hMIF als auch PfMIF zugänglich für eine S-Nitrosierung durch Cys-NO zu sein. Inwiefern sich dies auf die Enzymaktivität des Proteins auswirkt, wurde im Tautomeraseassay untersucht. Hierfür wurde rekombinantes Protein gemäß 3.4.8 modifiziert. Ausgehend von der Anzahl der Cysteine in der Proteinprobe wurde Cys-NO im Verhältnis von 1:0, 1:5 und 1:10 zugesetzt. Beide Proteine wurden für 30 min bei 25 °C modifiziert, entsalzt um überschüssiges Cys-NO zu entfernen und direkt im Tautomerase-Assay gemessen. Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen unmodifiziertem MIF (1:0) sowie den modifizierten Proteinen hinsichtlich der Tautomeraseaktivität erkennen (Abbildung 35).

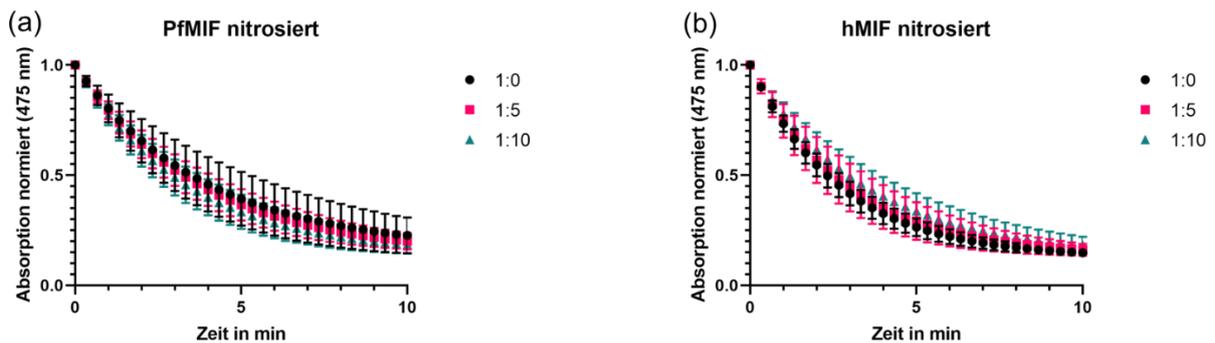


Abbildung 35 – Enzymaktivitätsmessung von nitrosiertem MIF

Zur Untersuchung des Einflusses der S-Nitrosierung auf die Enzymaktivität von MIF wurde Protein für 1 h bei 22 °C mit unterschiedlichen Verhältnissen Cys-NO zu Cysteinen inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im Tautomerase Assay untersucht. (a) PfMIF, (b) hMIF. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD.

MALDI-TOF MS Analyse von nitrosiertem MIF

Sowohl hMIF als auch PfMIF scheinen zugänglich für S-Nitrosierung zu sein, aber es ließ sich kein Einfluss auf die Tautomerase-Aktivität beobachten. Um herauszufinden welche/s Cystein/e nitrosiert werden können, wurde PfMIF sowie hMIF gemäß Kapitel 3.4.8 in drei biologisch unabhängigen Replikaten modifiziert und anschließend mittels MALDI-TOF MS von der Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik der Philipps Universität Marburg untersucht. In der MS Analyse konnte 51 % von hMIF und 62 % der Aminosäuresequenz von PfMIF abgedeckt werden. Cystein 81 von hMIF wies keine Modifikation auf. Die Cysteine des aktiven Zentrums C57 und C60 konnten nicht identifiziert werden und somit keine Aussage bezüglich eventueller Modifikation getroffen werden. Obwohl für PfMIF eine höhere Sequenzabdeckung erreicht wurde, konnten Cystein 3 und 4 nicht identifiziert werden. Cystein 103 wurde als nitrosiert detektiert.

Chemilumineszenzdetektion von S-Nitrosierung

Zusätzlich zu den oben beschriebenen durchgeführten Methoden der Identifizierung der Protein-S-Nitrosierung, wurden mit Cys-NO modifizierter hMIF und PfMIF mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD) in der Arbeitsgruppe von Prof. Miriam Cortese-Krott, am Universitätsklinikum Düsseldorf untersucht. Hierfür wurden die reduzierten Proteine wie unter 3.4.9 beschrieben modifiziert und anschließend auf freierwirdendes NO als Indikator für eine S-Nitrosierung untersucht. Die CLD-Messung erlaubt die Differenzierung zwischen Nitrosaminen (RNNO) und Nitrosothiolen (RSNO). Die Summe beider Modifikationen wird als RXNO gemessen. Tabelle 10 zeigt, dass die gemessenen RXNO fast vollständig aus Nitrosothiolen bestanden. Lediglich in der Probe 1:10 wurde ein geringer Anteil an Nitrosaminen detektiert. Obwohl das rekombinante Protein mit steigender Konzentration an Cys-NO inkubiert wurde, konnte kein starker Anstieg an S-Nitrosierung verzeichnet werden. Das höchste Nitrosierungssignal wurde erreicht als PfMIF mit dem 10-fachen Überschuss an Cys-NO transnitrosiert wurde (Probe 1:10). Mit steigender Menge an Cys-NO nahm das Signal wieder

ab. Generell konnte keine Proportionalität von eingesetztem Cys-NO zu Nitrosothiolen beobachtet werde.

Tabelle 10 – Chemilumineszenzdetektion von nitrosiertem PfMIF

PMIF wurde mit Cys-NO in steigendem Verhältnis zu den in der Probe enthaltenen Cysteinen inkubiert. Mittels CLD-Messung wurde die Menge an freigesetztem NO bestimmt. Detektiert wurde die Konzentration an Nitrosothiolen (RSNO), Nitrosaminen (RNNO) und RXNO (RNNO + RSNO). Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten.

Probe	RSNO Konzentration [μM]	RNNO Konzentration [μM]	RXNO Konzentration [μM]
1:1	6,23	0	6,23
1:5	19,36	0	19,36
1:10	36,63	0,61	37,24
1:50	6,09	0	6,09
1:100	9,31	0	9,31

Analog zu PfMIF wurde hMIF auf Nitrosothiole untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass die gemessenen RXNO nahezu zu 100 % aus Nitrosothiolen bestanden. Insgesamt konnten wesentlich höhere Mengen an Nitrosothiolen in den hMIF Proben detektiert werden, verglichen mit PfMIF. Aber auch bei hMIF zeigte sich kein klarer Zusammenhang zwischen der Menge an eingesetztem Cys-NO zu der Menge an detektieren Nitrosothiolen.

Tabelle 11 – Chemilumineszenzdetektion von nitrosiertem hMIF

hMIF wurde mit Cys-NO in steigendem Verhältnis zu den in der Probe enthaltenen Cysteinen inkubiert. Mittels CLD-Messung wurde die Menge an freigesetztem NO bestimmt. Detektiert wurde die Konzentration an Nitrosothiolen (RSNO), Nitrosaminen (RNNO) und RXNO (RNNO + RSNO). Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten.

Probe	RSNO Konzentration [μM]	RNNO Konzentration [μM]	RXNO Konzentration [μM]
1:1	22,83	0	22,83
1:5	27,33	0,5	27,84
1:10	223,71	0	223,71
1:50	10,74	0	10,74
1:100	1.163,45	0	1.163,45

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl hMIF als auch PfMIF durch Cys-NO transnitrosiert werden, sich diese Modifikation jedoch nur schwer quantifizieren lässt. Jede der verwendeten Nachweismethoden der S-Nitrosierung zeigte unterschiedliche, nicht konsistente Ergebnisse.

4.2.8 Rezeptorinteraktionsstudien

Rekombinanter hMIF, PfMIF^{WT} sowie Mutanten wurden gemäß Protokoll exprimiert und gereinigt. PfMIF^{WT} wurde im Anschluss gemäß Protokoll glutathionyliert und nitrosiert (3.4.14). Die weitere Analyse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Bernhagen am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ein rekombinanter Hefestamm, welcher einen funktionellen humanen CXCR2 oder CXCR4 Rezeptor exprimiert, wurde mit rekombinantem MIF-Protein inkubiert. Wurde der Rezeptor durch Bindung von MIF aktiviert, dann induzierte dies die Transkription und Translation von β -Galaktosidase. Die Galaktosidaseaktivität konnte anschließend mittels Luciferaseassay quantitativ bestimmt werden und erlaubt so eine Aussage über die Rezeptoraktivierung.

Vergleicht man die rekombinanten PfMIF Cystein-zu-Alanin Mutanten mit dem WT-Protein hinsichtlich ihrer Fähigkeit die humanen Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 zu aktivieren, sind Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten sowie zwischen den beiden untersuchten Rezeptoren zu erkennen. CXCR2 scheint besser als CXCR4 durch PfMIF aktiviert zu werden. Zwischen PfMIF^{WT} sowie PfMIF^{C103A} und PfMIF^{C3A/C4A} lässt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich ihrer Fähigkeit die humanen Rezeptoren zu aktivieren detektieren. Die Fähigkeit der Mutanten PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A} und PfMIF^{C59A} die humanen CXCR2 und 4 Rezeptoren zu aktivieren, sind signifikant verringert im Vergleich zum Wildtypprotein. Hierbei ist der Unterschied zwischen WT und PfMIF^{C59A} bei hCXCR2 nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei hCXCR4 (Abbildung 36). In der Abbildung nicht aufgetragen ist der parallel mituntersuchte hMIF. Dieser ist signifikant weniger in der Lage als PfMIF beide Rezeptoren zu aktivieren (Anhang 4, Anhang 5). Des Weiteren lässt sich eine signifikant verringerte Aktivierung beider humaner CXCR Rezeptoren nach vorangegangener Redoxmodifikation von PfMIF beobachten. Hierbei gibt es zwischen glutathionyliertem und nitrosiertem PfMIF ebenfalls einen signifikanten Unterschied; glutathionylierter PfMIF zeigt eine stärker verringerte Aktivierung (Statistik siehe Anhang).

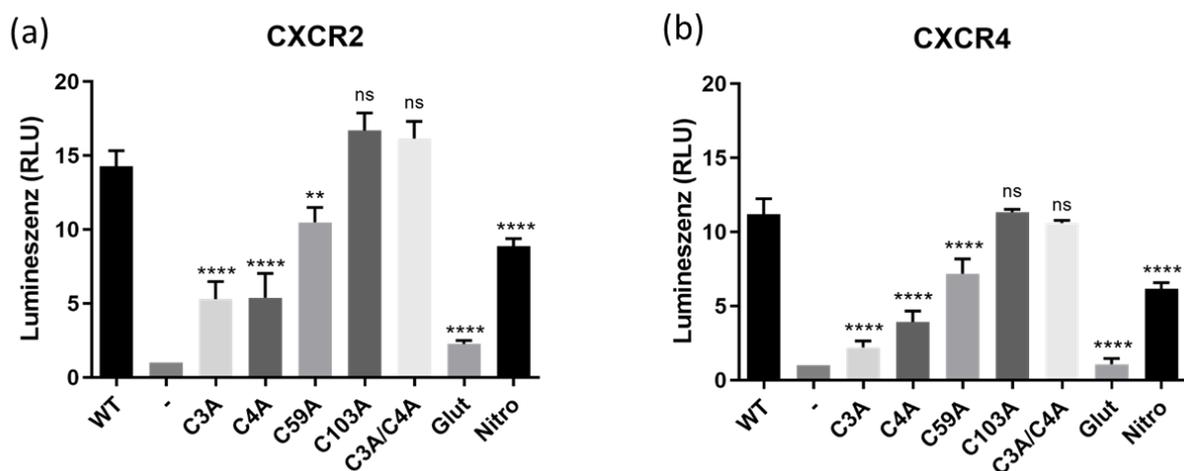


Abbildung 36 – Rezeptorinteraktionsstudie von MIF

Im Luciferaseassay wurde die Fähigkeit der rekombinanten His₆-getaggtem PfMIF-Proteine untersucht, die humanen Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 zu aktivieren. Es wurden jeweils 20 µM Protein in MIF-Puffer eingesetzt. (a): Interaktion mit CXCR2. (b): Interaktion mit CXCR4. RLU: *relative light units*, Glut: PfMIF wurde mit GSSG modifiziert, Nitro: PfMIF wurde mit Cys-NO modifiziert. -: PBS als Negativkontrolle. Die Daten wurden mit MIF-Puffer als Kontrolle normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD von je 2 technischen Replikaten aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten. Es wurde eine einseitige ANOVA mit multiplen Vergleichen durchgeführt. Abgebildet ist hier der statistische Vergleich des WT mit den einzelnen Mutanten bzw. Modifikationen. ****: P-Wert <0,0001, ns: nicht signifikant.

4.2.9 Kristallisation von redoxmodifiziertem PfMIF

Kristallisation von glutathionyliertem PfMIF

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PfMIF glutathionyliert werden kann, sollte untersucht werden, inwiefern sich die PTM auf die dreidimensionale Struktur des Proteins auswirkt. Diese Versuche erfolgten unter der Anleitung von Michaela Stumpf mit Unterstützung von Norma Schulz. Hierfür wurden elf verschiedene Proteinkristallisationsscreens (2.10.8) mit steigenden Konzentrationen an modifiziertem Protein (10-20 mg/mL) im *sitting drop* Verfahren getestet. Es konnte Phasentrennung und Keimbildung beobachtet werden, welche am ausgeprägtesten unter der Bedingung 0,2 M Kaliumnatriumtartrattetrahydrat, 20 % (w/v) PEG 3350 (JCSG Core I Suite, B10) war (siehe Abbildung 37).

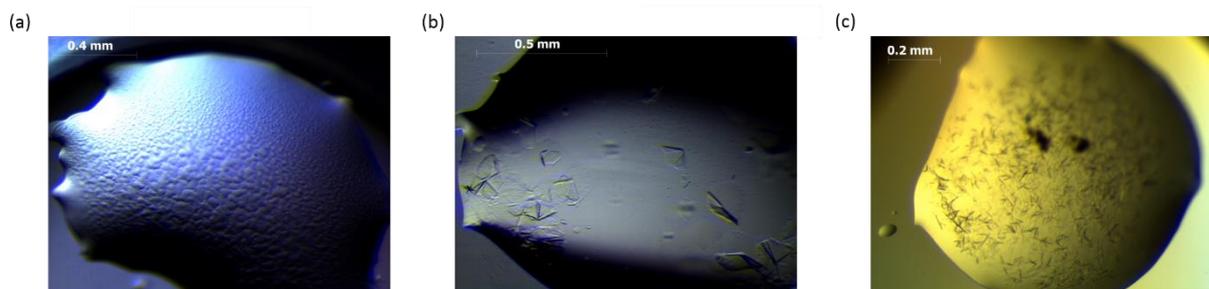


Abbildung 37 – Kristallisation von glutathionyliertem PfMIF

Eine Phasentrennung konnte beobachtet werden bei (a) 20 mg/mL glutathionyliertem PfMIF in 15 % (w/v) PEG 8000, 200 mM AmSO₄, (JBScreen Classic HTS I, G7), (b) 15 mg/mL glutathionyliertem PfMIF in 0,2 M Kaliumnatriumtartrattetrahydrat, 20 % (w/v) PEG 3350 (JCSG Core I Suite, B10) und (c) 20 mg/mL glutathionyliertem PfMIF in 0,2 M Kaliumnatriumtartrattetrahydrat, 20 % (w/v) PEG 3350 (JCSG Core I Suite, B10). Alle Ansätze wurden als *sitting drop* bei RT inkubiert.

Variationen der Screeningbedingungen, u.a. im pH-Wert des Puffers sowie die Zugabe von Additiven konnten bisher noch nicht zur Kristallisation von glutathionyliertem PfMIF führen.

Kristallisation von nitrosiertem PfMIF

Durch MALDI-TOF MS-Analysen konnte gezeigt werden, dass Cystein 103 von PfMIF unter den untersuchten Bedingungen nitrosiert wurde. Es konnte nicht gezeigt werden, ob dies das einzige modifizierte Cystein war und inwiefern diese Modifikation die Struktur des Proteins beeinflusst. Hierfür wurde nitrosierter PfMIF in verschiedenen Konzentrationen unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen im *sitting drop* gescreent (Abbildung 38). Unter der Bedingung 20 mg/mL glutathionyliert PfMIF in 15 % w/v PEG 8000 + 200 mM AmSO₄ (JBScreen Classic HTS I, G7) konnte eine effektive Keimbildung beobachtet werden.

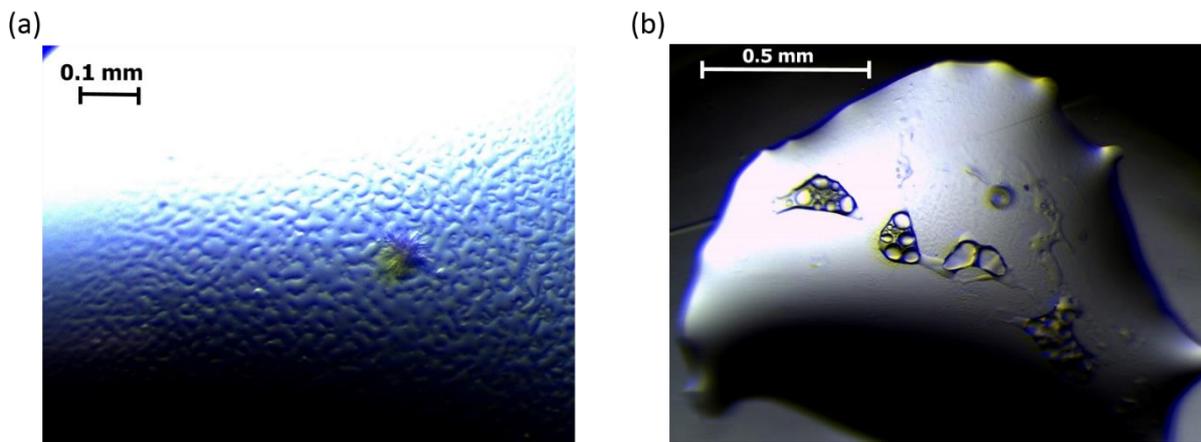


Abbildung 38 – Initiales Screening von nitrosiertem PfMIF

Keimbildung bzw. Phasentrennung konnte beobachtet werden in (a) 10 mg/mL nitrosierter PfMIF in 15 % (w/v) PEG 8000, 200 mM AmSO₄ (JBScreen Classic HTS I, G7). (b) 20 mg/mL nitrosierter PfMIF in 10 % (w/v) PEG 3000, 100 mM Natriumacetat, pH 4,5 (JBScreen Wizard 1 & 2 HTS, E1). Alle Ansätze wurden als *sitting drop* bei RT inkubiert.

Um größere und stabilere Kristalle zu erhalten, wurde sowohl die PEG als auch die AmSO₄ Konzentration variiert sowie Handansätze mit der *hanging drop* Methode vorbereitet. Innerhalb einer Woche konnte ein Kristallwachstum bei RT beobachtet werden (Abbildung 39). Die Röntgenstrukturanalyse dieser Kristalle ergab drei Datensätze für Proteinkristalle aus zwei verschiedenen Bedingungen: 10 % (w/v) PEG 8000 und 100 mM AmSO₄ (Abbildung 39 (a)) sowie 12,5 % PEG 8000 und 100 mM AmSO₄ (Abbildung 39 (b)).

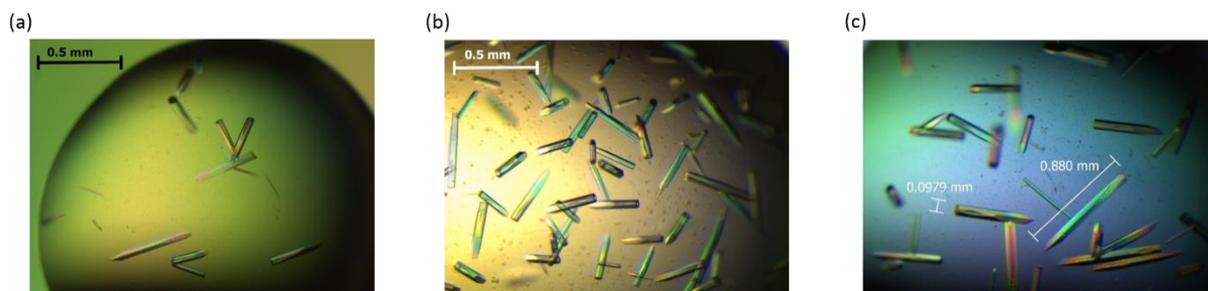


Abbildung 39 – Kristalle von nitrosiertem PfMIF

(a) 20 mg/mL nitrosierter PfMIF in 10 % PEG 8000 und 100 mM AmSO₄. (b) 20 mg/mL nitrosierter PfMIF in 12,5 % PEG 8000 und 100 mM AmSO₄. (c) 20 mg/mL nitrosierter PfMIF in 10 % PEG 8000 und 150 mM AmSO₄. Die Ansätze wurden als *hanging drop* bei RT inkubiert.

Die untersuchten Kristalle beugten bis 1,7 Å in der Röntgenstrukturanalyse. Die genauen Raumgruppen der Kristalle konnten bisher noch nicht berechnet werden, somit ist die genaue Anordnung noch nicht abschließend geklärt. Weitere Berechnung müssen durchgeführt werden.

5 Diskussion

Posttranslationale Modifikationen (PTM) erhöhen sowohl die Komplexität als auch die Diversität eines Proteoms (Yakubu *et al.*, 2018). Sie ermöglichen die Feinregulierung von Proteinaktivitäten und die rasche Anpassung eines Organismus an wechselnde Umweltbedingungen. Vor allem parasitäre Erreger wie *Plasmodium*, die sich während ihres komplexen Lebenszyklus in verschiedenen Wirtszellen entwickeln, sind auf permanente Anpassung angewiesen. Seit mehreren Jahren fokussiert daher eine steigende Anzahl von Studien auf der Identifizierung von PTM in *P. falciparum* (reviewed in (Yakubu *et al.*, 2018)). Es konnte gezeigt werden, dass *Plasmodium*-Proteine unter anderem Ziele für Phosphorylierung (Alam *et al.*, 2015), Lysin-Acetylierung (Cobbold *et al.*, 2016), sowie Ubiquitinierung (Ponts *et al.*, 2011) sind. Eine Untergruppe der PTM bilden die oxidativen PTM (oxPTM). Dies sind Modifikationen an der Thiolgruppe der Aminosäure Cystein, welche entstehen, wenn Proteine hohen Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies (ROS und RNS) ausgesetzt sind. oxPTM können die Struktur und somit die Funktion von Proteinen verändern, wodurch sie zur Modifikation von zellulären Signalwegen beitragen (Wani *et al.*, 2014).

5.1 Oxidative posttranslationale Modifikationen

5.1.1 Sulfenylierung in *Plasmodium falciparum*

Werden Cysteine einfach oxidiert, so tragen sie die oxPTM Sulfenylierung (-SOH). Diese reversible Modifikation fungiert nicht nur als Indikator für oxidativen Stress, sondern unter anderem auch als Regulator von Transkriptionsfaktoren (Salsbury *et al.*, 2008). Zur Identifizierung des Sulfenyloms eines Organismus werden sulfenylierte Proteine spezifisch markiert, angereichert und anschließend mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Aufgrund der Instabilität der Modifikation ist eine direkte Detektion nicht möglich (Fu *et al.*, 2019). Bei einem solchen Versuchsaufbau ist vor allem die Spezifität der Sulfenylierungssonde sowie die Reaktionsrate entscheidend. Aufgrund der Instabilität der Sulfenylierung sollte die Modifikation schnell markiert und dadurch vor einer potenziellen weiteren Reaktion geschützt werden. Reagiert eine Sulfensäure weiter um ein stabiles Disulfid auszubilden, würde dies falsch negative Signale generieren. Parallel müssen freie Thiole in Proteinen vor einer potenziellen Oxidation während der Probenvorbereitung geschützt werden. Zur Vermeidung solcher falsch positiven Signale sollten Alkylanzien, wie beispielsweise N-Ethylmaleimid (NEM), der Probe zugesetzt werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass auch Alkylanzien an Sulfensäuren binden und dadurch die Effizienz der eingesetzten Sonde beeinträchtigen können (Reisz *et al.*, 2013). Teilweise muss das zu untersuchende Zellmaterial lysiert werden, um die darin enthaltenen Proteine für die Sonde zugänglich zu machen. Hierbei empfiehlt sich das Entgasen des eingesetzten Lysepuffers zur Reduzierung von Sauerstoff in der Lösung. Auch die Zugabe von Wasserstoffperoxid-neutralisierender Katalase während der Lyse kann die Spezifität erhöhen (Klomsiri *et al.*, 2010; Wani *et al.*, 2011). Mittlerweile steht eine Vielzahl von Sulfenylierungssonden zur Verfügung, wobei die meisten dieser Sonden Dimedon-basiert sind (Nelson *et al.*, 2010). Der im Rahmen dieser Doktorarbeit analysierte Datensatz des *P. falciparum* Trophozoiten-Sulfenyloms wurde unter Verwendung der Sonde BCN-Bio1 (*highly strained bicyclo[6.1.0]nonyne*) generiert. Diese

Sonde weist mehr als 100 mal schnellere Reaktionsraten mit -SOH auf, als die von Dimedon-Derivaten, ist aber aufgrund ihres Biotinanteils nicht zellpermeabel (Poole *et al.*, 2014). Für den *pull-down* von sulfenylierten *P. falciparum* Proteinen wurden isolierte Trophozoiten in Anwesenheit von BCN-Bio1, Katalase und NEM lysiert und anschließend über Streptavidinbeads angereichert. Mittels MS konnten in jeweils zwei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten insgesamt 102 sulfenylierte Proteine mit 152 modifizierten Cysteinen identifiziert werden (Tabelle 9) (Schipper *et al.*, 2021). Ausgehend von den aktuell vorausgesagten 5.577 Proteinen des Isolats 3D7 entspricht dies ca. 1,8 % des gesamten Proteoms. Für *Homo sapiens* (*H. sapiens*) konnten ca. 1,7 % der Proteine als sulfenyliert detektiert werden (Li *et al.*, 2016). Mehr als doppelt so hoch liegt der Anteil der sulfenylierten Proteine in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (Huang *et al.*, 2019). Aufgrund der Kreuzreaktivität von Alkylanzien wie NEM mit der Modifikation -SOH konnten in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie möglicherweise nicht alle sulfenylierten Proteine detektiert werden (Reisz *et al.*, 2013).

Der so erhaltene Datensatz von sulfenylierten Proteine in *P. falciparum* gibt keine Information über die jeweilige Funktion der Modifikation in einem Protein. Proteine können entweder im Laufe ihres katalytischen Zyklus sulfenyliert werden, wie beispielsweise Peroxiredoxine (Prx), oder aber als Resultat von oxidativem Schaden (Akter *et al.*, 2015). Sulfenylierung kann aber auch als flexibler molekularer Schalter an nicht-enzymatischer Proteinfaltung beteiligt sein (Beedle *et al.*, 2016). Zur *in vitro* Untersuchung von Sulfenylierung am rekombinanten Protein kann der 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) Assay durchgeführt werden (Poole, 2008). Dieser Assay erlaubt eine Aussage darüber, ob ein Cystein in einem Protein als Thiol oder Sulfensäure vorliegt. Ist ein Protein reduziert, so zeigt gebundenes NBD-Cl einen Peak bei 420 nm. Liegt eine Sulfensäure vor, so verschiebt sich der Peak auf 347 nm. Sind mehrere Cysteine in einem Protein vorhanden, ist mit diesem Assay keine präzise Aussage mehr möglich. In jüngster Vergangenheit wird die Substanz aufgrund von Kreuzreaktivität vermehrt eingesetzt, um Proteinpersulfide zu identifizieren (Zivanovic *et al.*, 2019). Generell sind aufgrund der Instabilität der Modifikation *in vitro* Analysen erschwert und nur bedingt aussagekräftig. *In vivo* Sonden erlauben Aussagen über das temporäre Sulfenylierungsniveau und ermöglichen so vergleichende Studien. Hierfür sind Sonden mit einem Biotinteil wie BCN-Bio1 aufgrund der schlechten Zellpermeabilität ungeeignet (Seo and Carroll, 2009). Spezielle *in vivo* Sonden, wie zum Beispiel an Rhodamin gekoppeltes Dimedon (DCP-Rho1), erlauben eine photometrische Detektion der Modifikation (Gupta and Carroll, 2014). Untersuchungen an *P. falciparum* Trophozoiten haben gezeigt, dass das basale Sulfenylierungslevel nach Inkubation mit unterschiedlichen ROS und/oder RNS freisetzenden Substanzen sinkt (Schipper, 2015). Dieser Effekt ist vermutlich auf eine Überoxidation von sulfenylierten Proteinen durch die Stressoren zurückzuführen. In anderen Organismen, wie zum Beispiel *H. sapiens*, konnte ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden: Nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen an H₂O₂ konnte zunächst ein Anstieg der Signalintensität beobachtet werden, bevor diese anschließend abnahm (Klomsiri *et al.*, 2014). Der Parasit ist hohen Leveln an ROS und RNS (RONS) ausgesetzt und vermutlich herrscht daher bereits unter basalen Bedingungen ein höheres Level an Sulfenylierung als in anderen Organismen. Kommt es zu einer Erhöhung der RONS-Konzentrationen, könnten Proteine überoxidiert oder anderweitig redoxmodifiziert werden. Dies gilt es im Detail zu untersuchen (siehe 5.1.2). Während in anderen Organismen Sulfiredoxin (Srx) in der Lage ist, Sulfinsäuren zu reduzieren,

konnte in *Plasmodium* bisher kein Protein homolog identifiziert werden. Insofern ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, präzise Aussagen hinsichtlich der (Ir-) Reversibilität von Überoxidation in dem Parasiten zu treffen. *In vivo* Analysen von Sulfenylierung in angereicherten Trophozoiten zeigten des Weiteren eine globale Verteilung von modifizierten Proteinen sowie eine Anreicherung in Vesikel-ähnlichen Strukturen (Schipper, 2015). Eine Untersuchung der identifizierten sulfenylierten Proteine auf Signalpeptide zeigte, dass für einige der identifizierten Proteine N-terminale endoplasmatisches Retikulum-Typ Signalpeptide vorhergesagt werden. Dies deutet auf eine Sekretion bzw. eine Lokalisation im Sekretionssystem des Parasiten hin. Kollokalisationsstudien mit DCP-Rho1 sowie Antikörpern gegen subzelluläre Kompartimente müssten durchgeführt werden, um die Akkumulation von sulfenylierten Proteinen lokalisieren zu können. Bei allen Sonden, welche eingesetzt werden können, um Sulfensäuren nachzuweisen, gilt es zu beachten, dass sie aufgrund sterischer Hinderung nicht oder nur unvollständig an wenig zugängliche Sulfensäuren binden können. Die Chance eine Sulfensäure in einem Protein zu identifizieren, ist also abhängig von ihrer Zugänglichkeit und somit von der Mikroumgebung der Modifikation (Klomsiri *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014).

Die als sulfenyliert identifizierten Proteine wurden gemäß ihren Annotationen der Genontologie (GO) in biologische Prozesse bzw. nach ihrer molekularen Funktion sortiert (Abbildung 40). Hierbei wird deutlich, dass sulfenylierte Proteine in einer großen Vielzahl von biologischen Prozessen zu finden sind, wie beispielsweise Translation, Glykolyse, DNA- und RNA-Metabolismus, Proteintransport und -faltung (Abbildung 40 (a)). Jeweils 11 % der identifizierten Zielproteine sind involviert in der Translation (u. a. *elongation factor 1- α* , *1- γ*), Proteinfaltung (u. a. *heat shock protein 70*, *90* und *110*), sowie Proteine, welche an biosynthetischen Wegen beteiligt sind (u. a. *S-adenosylmethionine synthetase (SAMS)*, *adenylosuccinate synthetase* und *inositol-3-phosphate synthase*). Mit 8 % bilden Proteine involviert in DNA/RNA Metabolismus und Prozessierung die nächstgrößere Gruppe. Hierzu gehören beispielsweise *DNA/RNA binding protein Alba 2* und *4*. Besonders Proteine der Glykolyse scheinen zugänglich für Sulfenylierung zu sein (siehe 5.1.3). Eine geringere Anzahl an sulfenylierten Proteinen gehören zu Zellzyklusprozessen, der zellulären Redoxhomöostase, dem Zytoskelett, Signaltransduktion, Pathogenese, Protein- und Hämoglobin-Degradation, Proteintransport, Transkription sowie unbekanntem biologischen Prozessen. Sortiert man sulfenylierte Proteine des Trophozoiten-Stadiums nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen, zeigt sich ein anderes Muster (Abbildung 40 (b)). Die mit 25 % größte Gruppe wird durch Proteine gebildet, welche keine (unbekannte) oder diverse molekulare Funktionen haben. Obwohl das Genom von *P. falciparum* komplett sequenziert ist, konnten noch nicht allen Proteinen Funktionen zugeordnet werden (Bahl *et al.*, 2003). Die zweitgrößte Gruppe mit 23 % wird durch Proteine mit Hydrolaseaktivität gebildet. Hierzu gehören unter anderem die *adenosindeaminase*, *M17 leucyl aminopeptidase* sowie *glycerophosphodiester phosphodiesterase*. Proteine involviert in Nukleotidbindung wie *serine-* und *threonine-tRNA ligase* bilden die drittgrößte Gruppe. *Karyopherin beta* und *activated c kinase receptor* bilden, gemeinsam mit anderen an der Proteinbindung beteiligten Proteinen, die viertgrößte Gruppe. Insgesamt zeigt sich eine großflächige Verteilung von sulfenylierten Proteinen in *P. falciparum*.

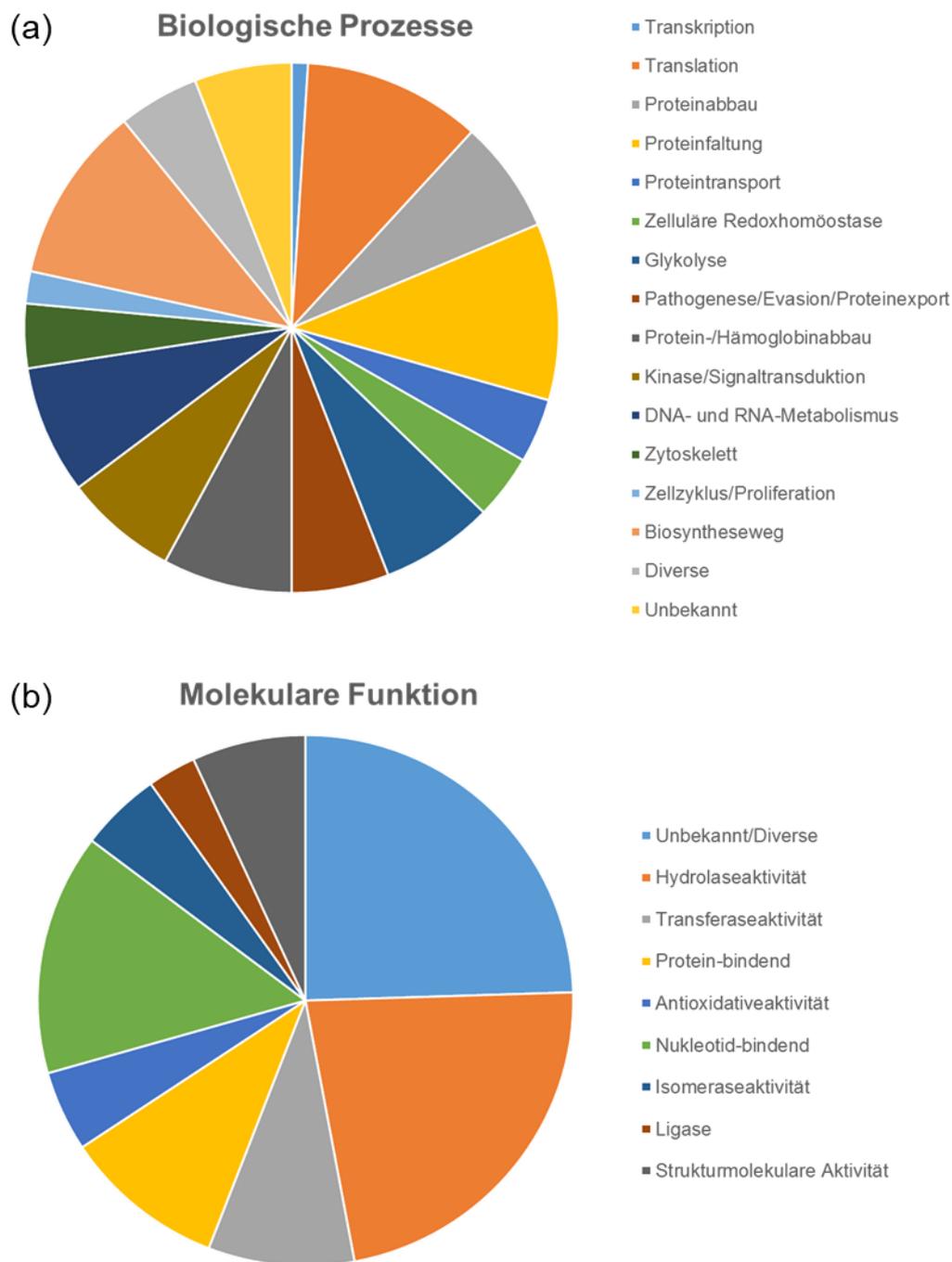


Abbildung 40 – Funktionelle Klassifikation von sulfenylierten *P. falciparum* Proteinen

Sulfenylierte Proteine wurden gemäß ihrer Zuordnung der Genontologie (GO) zu biologischen Prozessen (a) sowie molekularer Funktion (b) sortiert und zusammengefasst. Die prädominante GO Bezeichnung annotiert in UniProt (www.uniprot.org) wurde verwendet. Proteine ohne Annotation wurden als „unbekannt“ gelistet. Zur Vermeidung von Redundanz wurde jedem Protein nur eine Annotation zugeordnet.

Vergleicht man die Zielproteine für Sulfenylierung in *P. falciparum* mit denjenigen in *H. sapiens*, so lassen sich Unterschiede erkennen: Von den 102 sulfenylierten Proteinen der Trophozoiten sind 20 parasitenspezifisch und haben kein humanes Homolog. 52 der Zielproteine aus *Plasmodium* wurden auch in *H. sapiens* als sulfenyliert detektiert (Gupta *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). Die restlichen 26 Proteine wurden nicht als sulfenyliert in *H. sapiens* nachgewiesen und könnten daher einem anderen regulatorischen Mechanismus unterworfen sein. Zu diesen Proteinen gehört u. a. die M17 *leucyl aminopeptidase* (PF3D7_1446200). Diese Aminopeptidase katalysiert die Freisetzung von neutralen Aminosäuren vom N-Terminus und trägt dadurch essentiell zum Hämoglobinabbau bei (Poreba *et al.*, 2012). Die Hemmung der Peptidase führt zum Tod von *P. falciparum* in Zellkultur. Daher ist das Protein ein interessantes Ziel für die Entwicklung von antimalaria Medikamenten (Skinner-Adams *et al.*, 2010). Bisher wurde eine potenzielle Redoxregulation für dieses Protein noch nicht untersucht.

5.1.2 Vergleich der oxPTM in *P. falciparum*

Neben der Sulfenylierung haben auch die oxPTM S-Nitrosierung und S-Glutathionylierung eine wichtige Funktion in der Redoxsignalweitergabe. Bisher ist wenig über das Zusammenspiel dieser Modifikationen, auch als *cross talk* bezeichnet, bekannt. Vor diesem Hintergrund wurden in der Vergangenheit durchgeführte Studien zur S-Glutathionylierung und S-Nitrosierung in *P. falciparum* mit dem im Rahmen dieser Doktorarbeit generierten Datensatz verglichen. Hierbei gilt es zu beachten, dass für die Studie des Nitrosoms isolierte Trophozoiten mit 100 µM S-Nitrosoglutathion (GSNO) inkubiert wurden, da das basale Level an nitrosierten Proteinen keine detektierbare Anreicherung ermöglichte (Wang *et al.*, 2013). Nicht nur in *Plasmodium*, sondern auch in anderen Organismen wie dem Pflanzenmodelorganismus *A. thaliana* und dem Menschen (*H. sapiens*) konnte dies beobachtet werden (Lindermayr *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2011). Insofern beziehen sich die Angaben zum *P. falciparum* Nitrosom im Folgenden stets auf Proteine, welche unter nitrosativem Stress als nitrosiert detektiert wurden. Des Weiteren wurden sowohl nitrosierte als auch glutathionylierte Proteine mittels der indirekten Nachweismethode Biotin Switch Technik (BST) detektiert. Hierbei werden freie Thiole mit einem Alkylanz blockiert, die eigentliche Modifikation anschließend entfernt und so entstehende freie Thiole mit einem Biotin-gebundenen Alkylanz markiert. Letzteres erlaubt eine Anreicherung markierter Proteine. Für das Glutathylom von *P. falciparum* Trophozoiten wurden so 491 Proteine identifiziert (Kehr *et al.*, 2011) und für das Nitrosom 317 Proteine (Wang *et al.*, 2013). Die MS-Analysen der drei Redoxproteom-Studien wurden an dem *Scripps Research Institute* von der Arbeitsgruppe Yates durchgeführt. Aufgrund der ständigen Verbesserung der Geräte und Software ist es seit einigen Jahren möglich, die genaue Modifikationsstelle eines Proteins zu bestimmen. Daher sind für das Glutathylom keine modifizierten Cysteine bekannt, für das Nitrosom insgesamt 37 modifizierte Cysteine in 34 Proteinen und für das Sulfenylom 152 modifizierte Cysteine in 102 Proteinen. Beim Vergleich dieser drei oxPTM Studien in *P. falciparum* wird offensichtlich, dass viele Proteine als zugänglich für mehr als eine der Modifikationen scheinen (Abbildung 41). Insgesamt wurden bisher 614 Proteine als redoxmodifiziert identifiziert, dies entspricht knapp 11 % des gesamten Proteoms von *P. falciparum* (Anhang 9). Von diesen Proteinen wurden 234 mit mindestens zwei der drei oxPTM identifiziert, dies entspricht 38 % der redoxmodifizierten Proteine. 49 dieser Proteine wurden in allen drei Studien als Zielproteine detektiert. Diese Proteine scheinen besonders empfänglich zu sein für Redoxmodifikationen

und machen knapp 1 % des gesamten Proteoms aus. Vergleichende Studien an Mäusen zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Überschneidung zwischen den verschiedenen Redoxmodifikationen im Proteom beobachtet werden kann (Gould *et al.*, 2015). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Daten in *P. falciparum* und unterstreicht noch einmal die besondere Funktion von Redoxregulation in dem Parasiten. Ausgehend von diesen Daten können einzelne, redoxensible Proteine nun genauer untersucht werden. Hierbei gilt es, die Proteine auf die Funktion dieser Modifikationen im Hinblick auf eine potentielle Aktivitätsregulation, intrazelluläre Lokalisation, Proteinstabilität und Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Wang *et al.* und Kehr *et al.* haben einzelne Zielproteine rekombinant hergestellt und auf Änderungen der Aktivität nach S-Nitrosierung bzw. S-Glutathionylierung untersucht. Hierbei zeigte sich keine Aktivitätsänderung der Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) nach Inkubation mit GSNO, während die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) inhibiert wurde (Wang *et al.*, 2013). Während die S-Glutathionylierung keinen Einfluss auf die Aktivität der LDH und Thioredoxin-Reduktase zeigte, zeigten GAPDH, Ornithin-Aminotransferase (OAT) und PK Aktivitätsänderungen. Dieser Einfluss war zeitgleich abhängig von der Form des eingesetzten Glutathions. Oxidiertes Glutathion (GSSG) inhibierte die Aktivität von OAT, während reduziertes Glutathion (GSH) die Aktivität steigerte (Kehr *et al.*, 2011). Diese Daten zeigen, dass die Funktionen der Redoxmodifikationen vielfältig sind und im Einzelfall präzise analysiert werden müssen.

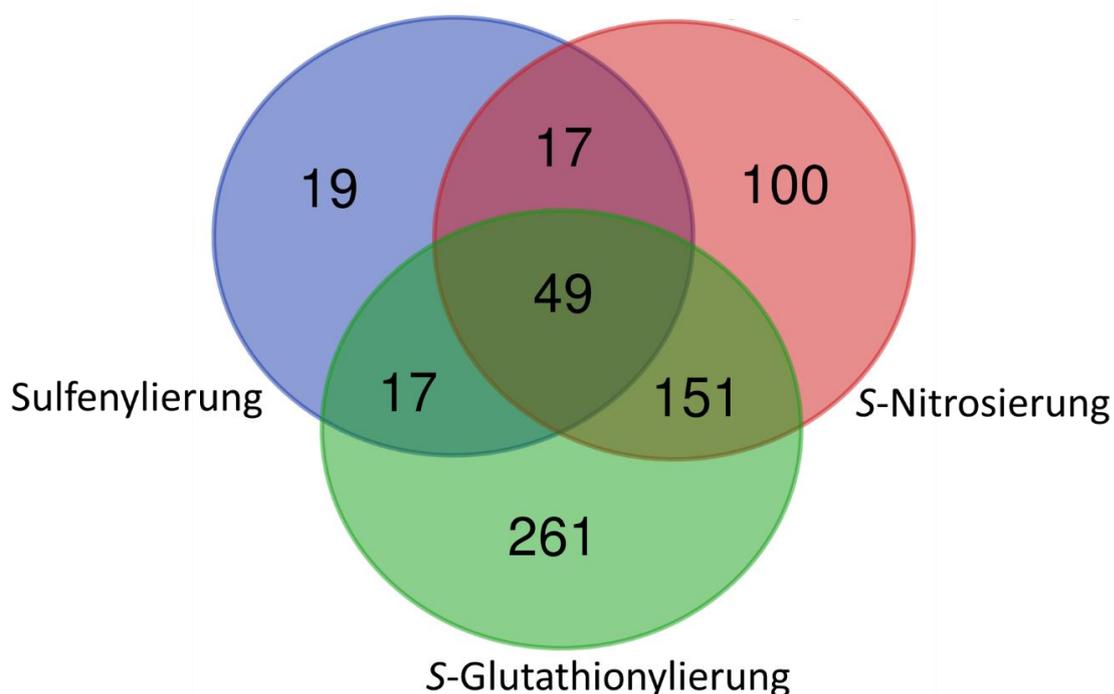


Abbildung 41 – Oxidative posttranslationale Modifikationen in *P. falciparum*

P. falciparum Proteine des Trophozoiten-Stadiums, welche über *pull-down* Experimenten als Ziel für die Redoxmodifikationen S-Glutathionylierung, S-Nitrosierung und Sulfenylierung identifiziert wurden, wurden mittels des Online Werkzeugs <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> verglichen (Kehr *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2013).

Für das Nitrosom konnten 37 modifizierte Cysteine identifiziert werden. Vergleicht man die als nitrosiert identifizierten Cysteine mit sulfenylierten Cysteinen, zeigt sich, dass in drei Proteinen dieselben Cysteine modifiziert werden: *Translationally-controlled tumor protein homologue* (PfTCTP, PF3D7_0511000), *Hsc70-interacting protein* (PfHIP, PF3D7_0527500) und *eukaryotic translation initiation factor 5A* (PfeIF-5A, PF3D7_1204300). PfTCTP enthält lediglich ein Cystein, C14. Bisher sind relativ wenige Informationen über dieses Protein verfügbar. Bekannt ist, dass das Kalzium-bindende Protein sowohl im Cytosol als auch in der Nahrungsvakuole vorliegt und mit Artemisinin Addukte bildet (Bhisutthibhan *et al.*, 1999). Über PfHIP weiß man, dass es mit Hitzeschockproteinen interagiert und deren Chaperonaktivität verstärken kann (Ramya *et al.*, 2006). Von den sechs im Protein enthaltenen Cysteinen wurde C187 als redoxmodifiziert identifiziert. PfeIF-5A ist als essentielles Protein an der Translation beteiligt (Molitor *et al.*, 2004). Insgesamt enthält das Protein drei Cysteine, von denen C73 zugänglich für oxPTM zu sein scheint. Diese Proteine scheinen unter basalen Bedingungen in dem Parasiten als sulfenyliert vorzuliegen und mit steigendem nitrosativen Stress nitrosiert zu werden. Neben der regulatorischen Funktion dient S-Nitrosierung als Schutz vor Überoxidation und einer damit verbundenen eventuellen Inaktivierung des Proteins (Sun *et al.*, 2006). Diese Daten geben einen ersten Einblick in den *cross talk* zwischen verschiedenen oxPTM. Vermutlich sind noch weitere Cysteine für mehr als eine oxPTM zugänglich, was allerdings durch ergänzende Untersuchungen bestätigt werden muss. Bisher wurde noch nicht analysiert, welche Cysteine in *P. falciparum* glutathionyliert vorliegen. Anhand von rekombinanten Proteinen kann dies *in vitro* untersucht werden und Hinweise auf *in vivo* Modifikationen geben. Verschiedene Faktoren bestimmen die Reaktivität eines Cysteins, wie zum Beispiel der pK_a -Wert und die Zugänglichkeit innerhalb eines Proteins (Marino and Gladyshev, 2012). In Abhängigkeit von der Umgebung eines Cysteins, welche sich durch strukturelle Neuordnung eines Proteins ändern kann, können Cysteine an die Oberfläche eines Proteins gelangen und somit zugänglich für weitere Modifikationen werden (Bar-Peled *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2017). Generell lässt sich beobachten, dass redox-sensitive Proteine in der Lage sind, zwischen verschiedenen Kompartimenten einer Zelle zu wandern. Somit sind sie wechselnden Umgebungen, wie zum Beispiel der Nähe zu Metallzentren sowie raschen Veränderungen im pH-Wert ausgesetzt. Diese Faktoren können den pK_a -Wert der Cysteine beeinflussen und so zur Regulation eines Proteins beitragen (Roos *et al.*, 2012).

Gleichzeitig geben die drei Datensätze zum Nitrosom, Glutathylom und Sulfenylom keine Auskunft über die Dynamik der Modifikationen. Eine Limitation in der Untersuchung von dynamischen Veränderungen liegt in dem Mangel an spezifischen *in vivo* Sonden. Mittels indirekter Nachweismethoden, wie der BST, identifizierte Proteinlisten können falsch positive Treffer enthalten. Erfolgte beispielsweise keine komplette Alkylierung von freien Thiolen, dann könnten diese als angeblich modifizierte Proteine/Cysteine detektiert werden. Ein direkter Nachweis einer Modifikation ist somit zu bevorzugen. Wie sich an der, dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie zeigt, können auch direkte Nachweismethoden Fehlerquellen enthalten. In der Sulfenylierungsstudie zeigte sich beispielsweise eine starke Kreuzreaktivität von NEM mit Sulfensäuren. Alkylanzien wie Methylsulfonyl Benzothiazol (MSBT) scheinen diese Kreuzreaktivität nicht zu zeigen (Zhang *et al.*, 2012). Zusätzlich zeigen neuere Studien eine verringerte Ionisierbarkeit von biotinylierten Peptiden (Nierves and Lange, 2020). Verschiedene Sonden, welche einen spaltbaren Biotinteil enthalten, wurden bereits entwickelt. Somit erlauben sie die gezielte Anreicherung von markierten Proteinen/Peptiden und präzisere

MS-Ergebnisse. Aktuell arbeiten unsere Kooperationspartner diesbezüglich an der Optimierung der Sonde BCN-Bio1. Eine weitere Verbesserung der Identifizierung von modifizierten Proteinen/Peptiden kann durch das *direct detection of biotin-containing tags* (DiDBiT) Verfahren erreicht werden. Bei dieser Methode werden markierte Proteine enzymatisch verdaut, bevor sie angereichert werden. Somit werden nur die markierten modifizierten Peptide mittels MS analysiert, was die Detektion um das 200-fache verbessern soll (Schiapparelli *et al.*, 2014).

Wenig ist darüber bekannt, inwiefern sich das Redoxom des Parasiten unter verschiedenen Bedingungen verändert. Wang *et al.* konnten einen Anstieg an nitrosierten Proteinen in Trophozoiten beobachten, wenn diese zuvor mit GSNO inkubiert wurden. Zur Beobachtung von Veränderungen eines Proteoms eignen sich Methoden wie das *stable isotope labeling of amino acids in cell culture* (SILAC). Dieses Verfahren erlaubt eine Quantifizierung von identifizierten Proteinen. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe des Trophozoitenproteoms nach Inkubation mit den Antimalaria-Medikamenten Artemisinin und Chloroquin zeigen eine veränderte Synthese einzelner Proteine verglichen mit ungestressten Parasiten (Prieto *et al.*, 2008). Analog zu diesem Experiment könnte man so auch Veränderungen von oxPTM im Proteom untersuchen. Im Rahmen ihrer Dissertation untersucht Katharina Schuh Veränderungen am Glutathionylom nach Inkubation von Trophozoiten mit Glukoseoxidase. Dieses Enzym oxidiert Glukose und setzt dabei H_2O_2 frei (Wozencraft *et al.*, 1984). Während Immunoblot-Analysen mit einem Glutathion-Antikörper zeigten, dass durch den Stressor das Level an glutathionylierten Proteinen zunahm, konnten parallel durchgeführte *in vivo* Untersuchungen mittels DCP-Rho1 zeigen, dass das Sulfenylierungssignal deutlich abnahm. Entweder wurden Proteine überoxidiert zu Sulfinsäuren oder glutathionyliert. Oxidativer Stress führt zu einer Veränderung des GSH/GSSG-Verhältnisses, was wiederum die S-Glutathionylierung von Proteinen begünstigt (Begara-Morales *et al.*, 2016). Diese Modifikation kann dann entweder regulatorische Funktionen ausüben und/oder Proteine vor einer irreversiblen Überoxidation schützen. Eventuell können verschiedene Modifikationen an unterschiedlichen Cysteinen im selben Protein vorkommen und miteinander interagieren. Dies gilt es, im Einzelfall zu untersuchen.

5.1.3 Redoxregulation der Glykolyse

Als besonders empfänglich für oxPTM haben sich die Proteine der Glykolyse gezeigt. Obwohl glykolytische Proteine nur knapp 0,001 % des Proteoms von *P. falciparum* repräsentieren, machen sie 7 % des identifizierten Sulfenyloms aus. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Modifikation in einem für den Parasiten essentiellen Stoffwechselweg. Da kein funktioneller Citratzyklus zur Verfügung steht, ist *Plasmodium* auf die Metabolisierung von Glukose angewiesen (Oyelade *et al.*, 2016). Die Glykolyse, welche der ATP-Gewinnung dient, ist vor allem für die intrazellulären Stadien von *P. falciparum* essentiell (Niekerk *et al.*, 2016). Die Relevanz dieses Stoffwechselweges zeigt sich auch darin, dass mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten ca. 100-mal mehr Glukose verbrauchen als nicht infizierte Erythrozyten (Roth *et al.*, 1982). Insgesamt sind zehn Enzyme an der Metabolisierung von Glukose zu Pyruvat bzw. Lactat beteiligt (Abbildung 42). Viele dieser Enzyme zeigen neben ihrer klassischen Funktion in der Glykolyse weitere Funktionen im Organismus und werden daher als *moonlighting* Enzyme bezeichnet. Unterschiedliche Funktionen sind vermutlich auf PTM zurückzuführen,

welche strukturelle Änderungen oder eine veränderte Lokalisation des jeweiligen Enzyms bewirken (Alam *et al.*, 2014).

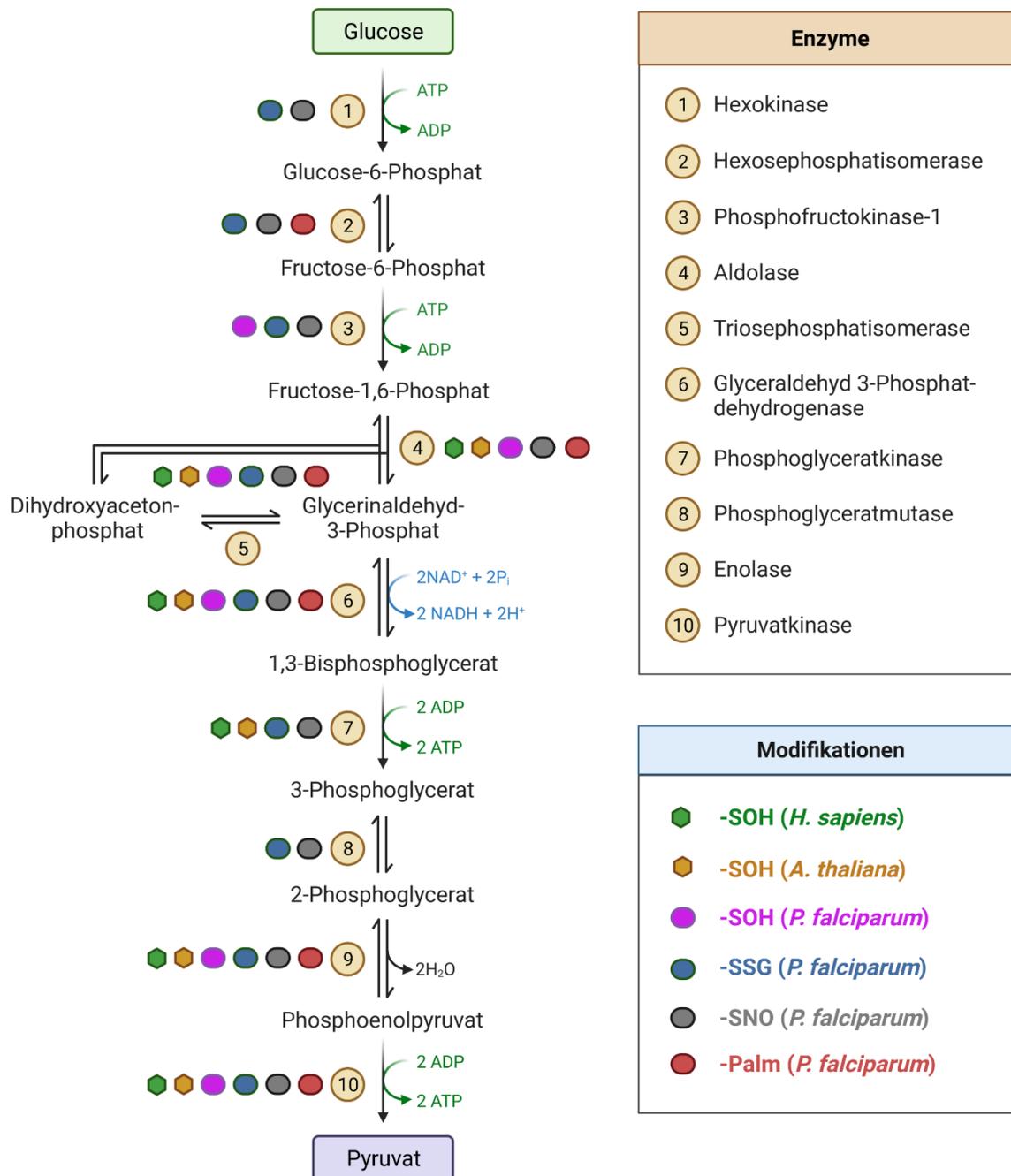


Abbildung 42 – Posttranslationale Modifikationen der glykolytischen Enzyme

Dargestellt ist die Umwandlung von Glucose zu Pyruvat. Farblich hervorgehoben sind verschiedene posttranslationale Modifikationen der an diesem Prozess beteiligten Enzyme. ADP: Adenosindiphosphat, *A. thaliana*: *Arabidopsis thaliana*, ATP: Adenosintriphosphat, *H. sapiens*: *Homo sapiens*, *P. falciparum*: *Plasmodium falciparum*, NAD⁺: oxidiertes Nicotinamadenindinukleotid; NADH: reduziertes Nicotinamadenindinukleotid, -SOH: Sulfenylierung (Huang *et al.*, 2018; Schipper *et al.*, 2021), -SNO: S-Nitrosierung (Wang *et al.*, 2013), -SSG: S-Glutathionylierung (Kehr *et al.*, 2011), -Palm: Palmitoylierung (Jones *et al.*, 2012). Die Abbildung wurde mit <https://www.app.biorender.com> erstellt.

In *P. falciparum* wurden insgesamt sieben der zehn glykolytischen Enzyme als sulfenyliert identifiziert: 6-Phosphofruktokinase (PfPFK1, PF3D7_0915400), Fructose-bisphosphat Aldolase (Pf3D7_1444800), Triosephosphatisomerase (Pf3D7_1439900), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (PfGAPDH, PF3D7_1462800), Enolase (PF3D7_1015900) und Pyruvatkinase (PfPK, PF3D7_0626800). Außer PfPFK1 wurden Homologe der anderen sechs Proteine auch in *H. sapiens* als sulfenyliert identifiziert. Das Sulfenylierungsmuster von *H. sapiens* gleicht dem von *Arabidopsis thaliana* (Huang *et al.*, 2018). Dies deutet auf eine Konservierung von Sulfenylierungsmustern der glykolytischen Enzyme in verschiedenen Spezies hin.

Alle glykolytischen Enzyme wurden ebenfalls als Ziele von S-Glutathionylierung (außer Aldolase) und S-Nitrosierung identifiziert (Abbildung 42) (Kehr *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Eine weitere Modifikation von Cysteinen ist die Palmitoylierung. Bei dieser wird reversibel das Lipid Palmitinsäure über eine Thioesterbindung an Cysteinreste gekoppelt. Diese Modifikation scheint besonderes in den Blutstadien von *P. falciparum* relevant zu sein. Es konnten bisher über 400 Zielproteine dieser Modifikation identifiziert werden (Jones *et al.*, 2012). Zu diesen gehören auch Proteine der Glykolyse (Abbildung 42). Diese Ergebnisse zeigen, wie Proteine auf vielfältige Weise modifiziert und darüber reguliert werden können. Gerade bei wichtigen Stoffwechselwegen wie der Glykolyse kommt es auf eine Feinregulation an, um den Organismus bestmöglich an wechselnde Bedingungen anzupassen. Obwohl die Enzyme des Parasiten eine hohe Sequenzkonservierung im katalytischen Zentrum zeigen, gibt es strukturelle Unterschiede zu den humanen Enzymen. Dies macht die Enzyme dieses Stoffwechselweges zu vielversprechenden Zielen der Entwicklung von Antimalaria-Medikamenten (Oyelade *et al.*, 2016).

Eines der glykolytischen Enzyme, welches im Hinblick auf Aktivitätsregulation besonders gut untersucht ist, ist die GAPDH. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Eukaryotische GAPDH ist außerdem, in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation, an Genregulation, vesikulärem Transport und Zellsignalisierung beteiligt (reviewed in (Sirover, 2011)). PTM wie Phosphorylierung, Acetylierung und S-Nitrosierung scheinen die Lokalisation des Proteins zu beeinflussen (Alam *et al.*, 2014). Die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums ist stark konserviert in verschiedenen Spezies (Abbildung 43). Ein wesentlicher Unterschied zwischen GAPDH in verschiedenen Organismen besteht in einer variierenden Anzahl an Cysteinen und für das Protein kodierenden Genen. Prokaryoten und Säugetiere besitzen lediglich ein *gapdh*-Gen, Hefe hingegen verfügt über drei und *A. thaliana* über sieben Gene. Das Besondere bei *A. thaliana* ist, dass sich die verschiedenen GAPDH nicht nur im Zytoplasma befinden wie bei den anderen Organismen, sondern dass es spezifische GAPDH im Chloroplasten (GAPA1, GAPA2, GAPB) und im Plastid (GAPCP1 und 2) gibt (Hildebrandt *et al.*, 2015). Verschiedene Studien konnten GAPDH als Zielprotein für Redoxmodifikationen in unterschiedlichen Organismen identifizieren (Akter *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2017; Kehr *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2013; Waszczak *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). Nachgewiesen werden konnten bisher Sulfenylierung, Sulfinylierung, Sulfonylierung, S-Glutathionylierung, S-Nitrosierung, Disulfidbrückenbildung sowie weitere nicht oxPTM (Zaffagnini *et al.*, 2013). Besonders zugänglich für oxPTM ist das reaktive katalytische Cystein des aktiven Zentrums, welches für die Metabolisierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat verantwortlich ist. In

H. sapiens ist dies C152 und in *P. falciparum* C153. Dieses Cystein wird im Menschen sulfenyliert, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (Muronetz *et al.*, 2019). Aufgrund hoher intrazellulärer GSH-Level kommt es anschließend zu einer S-Glutathionylierung, welche ebenfalls das Enzym inhibiert (Peralta *et al.*, 2015). In *A. thaliana* GAPC1 scheint dieses Cystein durch S-Glutathionylierung vor einer irreversiblen Inaktivierung durch Überoxidation geschützt zu werden (Bedhomme *et al.*, 2012). Auch an der GAPDH des Prokaryoten *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte eine Überoxidation am Cystein im aktiven Zentrum nachgewiesen werden (Bruckbauer *et al.*, 2020). In *P. falciparum* führen sowohl S-Glutathionylierung als auch S-Nitrosierung zu einer Inaktivierung des Enzyms (Kehr *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Auch wenn für diese beiden Modifikationen bisher noch nicht das modifizierte Cystein identifiziert wurde, ist es wahrscheinlich, dass dieses ebenfalls im aktiven Zentrum lokalisiert ist. Das zweite Cystein im aktiven Zentrum von *H. sapiens* (C156) und *P. falciparum* (C157) wurde ebenfalls als sulfenyliert detektiert (Gupta *et al.*, 2017; Schipper *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2014). Dieses Cystein ist nicht in den Katalysemechanismus involviert, sondern scheint vielmehr eine strukturgebende Funktion zu haben. Eine Cystein-zu-Serin-Mutante der humanen GAPDH zeigte normale katalytische Aktivität, aber eine verringerte Reaktivität von C152 gegenüber H₂O₂ (Hildebrandt *et al.*, 2015). Es wird vermutet, dass das zweite Cystein im aktiven Zentrum daher das katalytisch aktive Cystein vor Überoxidation schützt.



Abbildung 43 – Sequenzvergleich von GAPDH aus verschiedenen Organismen

Mittels Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) wurden die Proteinsequenzen aus verschiedenen Organismen koordiniert. Zehn Aminosäuren vor dem katalytisch aktiven Cystein (Position 11), sowie zehn Aminosäuren nach dem zweiten Cystein (Position 15) des aktiven Zentrums wurden hinsichtlich ihrer Konservierung verglichen. Untersucht wurden die Aminosäuresequenzen von Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAPDH) aus den Organismen *Homo sapiens* (P04406), *Saccharomyces cerevisiae* (P00360), *Escherichia coli* (P0A9B2), *Plasmodium falciparum* (Q8IKK7), *Arabidopsis thaliana* GAPCP1 (Plastid, Q9SAJ6) und GAPA2 (Chloroplast, Q9LPW0). Die Abbildung wurde mit dem Online Werkzeug „Weblogo“ (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) erstellt. Verwendet wird der Einbuchstabencode von Aminosäuren. Die Größe der Buchstaben gibt hierbei das Konservierungslevel an.

Wie Abbildung 43 zeigt, ist die Aminosäuresequenz von GAPDH im Bereich des aktiven Zentrums in verschiedenen Spezies stark konserviert. Unklar ist hierbei, ob diese Konservierung dem Erhalt der Modifizierungsstellen oder dem Erhalt der katalytischen Aktivität dient. Denkbar ist, dass beides miteinander im Zusammenhang steht. Vor allem das erste Cystein im aktiven Zentrum wurde bisher als modifizierbar identifiziert. Die beobachteten Modifikationen wirken sich inhibierend auf die glykolytische Aktivität des Enzyms aus

(reviewed in (Hildebrandt *et al.*, 2015)). Ausgelöst durch veränderte Lokalisation in Zellkompartimenten kann GAPDH so andere Funktionen ausüben (Zachgo *et al.*, 2013). GAPDH aus enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) wurde im Zellkulturüberstand gefunden und scheint als Virulenzfaktor wirksam zu sein (Egea *et al.*, 2007). In Säugetieren wird GAPDH nach S-Nitrosierung von C152 in den Nukleus transportiert und wirkt dort pro-apoptotisch (Hara *et al.*, 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gerade Proteine aus wichtigen Stoffwechselwegen wie der Glykolyse vielfältig modifiziert werden können. Dies erlaubt dem Organismus eine schnelle Anpassung an wechselnde Bedingungen und garantiert so sein Überleben.

5.2 *Macrophage migration inhibitory factor (MIF)*

Der humane *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) wurde in den 1960er Jahren als Zytokin identifiziert und gilt mittlerweile als pleiotropher Mediator von angeborener und erworbener Immunität (Calandra and Roger, 2003; David, 1966). Verschiedene pathologische Zustände wie Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, aber auch Protozoeninfektionen wie Malaria, sind mit veränderten Leveln an hMIF assoziiert (Sinitski *et al.*, 2019a). 2004 konnte in dem Isolat von *P. falciparum* 3D7 ein Homolog des humanen Zytokins identifiziert werden (Han *et al.*, 2004). Drei Jahre später erschien erstmals eine funktionelle Charakterisierung von rekombinantem PfMIF und *P. berghei* MIF (PbMIF) (Augustijn *et al.*, 2007). In dieser Studie konnte neben einer Tautomerase- und Oxidoreduktaseaktivität auch eine immunmodulatorische Funktion von *Plasmodium* MIF (PMIF) nachgewiesen werden. Parallel gelang es Cordery *et al.*, einen hemmenden Effekt von PfMIF auf die Migration von Makrophagen sowie auf die Oberflächenexpression von TLR2 und 4 nachzuweisen (Cordery *et al.*, 2007). 2008 wurde erstmals PfMIF im Serum von Malariapatienten nachgewiesen und deutete auf eine potenzielle Funktion als Virulenzfaktor (Shao *et al.*, 2008). Diese These wurde unterstützt durch eine positive Korrelation der Plasmakonzentration von PfMIF und *P. vivax* MIF (PvMIF) mit Parasitämie und Schwere der Krankheit (Han *et al.*, 2010). Trotz geringer Sequenzübereinstimmung zeigen die Kristallstrukturen von PfMIF und PbMIF eine ähnliche räumliche Anordnung der Aminosäuren im Vergleich zu hMIF und erlauben Screenings nach Inhibitoren (Dobson *et al.*, 2009). 2012 wurden erste für PfMIF spezifische Inhibitoren identifiziert (Alam *et al.*, 2012; Dahlgren *et al.*, 2012). Seitdem ist die Zahl der Publikationen über PMIF rückläufig. Studien an Malaria-Infizierten zeigen teilweise stark widersprüchliche Ergebnisse über den Einfluss von hMIF und PMIF auf den Verlauf einer Erkrankung. Untersuchungen am Proteom von *P. falciparum* Trophozoiten konnten PfMIF als Zielprotein für die Redoxmodifikationen der S-Glutathionylierung, S-Nitrosierung und Sulfenylierung identifizieren (Kehr *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2013). Zusätzlich kann PfMIF palmitoyliert werden (Jones *et al.*, 2012). Dies zeigt die Empfänglichkeit der Cysteine von PfMIF gegenüber verschiedenen Modifikationen, ohne dass dies einen Hinweis auf die biologische Funktion gibt. Vor diesem Hintergrund wurde, im Rahmen dieser Doktorarbeit, rekombinanter PfMIF mit dem Schwerpunkt auf die Funktion seiner vier Cysteine charakterisiert. Parallel wurde hMIF mit Hilfe der in Kapitel 3.4.7, 3.4.8 und 3.4.10 aufgeführten Assays auf potenzielle Redoxmodifikationen untersucht.

5.2.1 Rekombinante Herstellung von MIF-Wildtyp und Cystein-zu-Alanin-Mutanten

hmif und *Pfmif* wurden codonoptimiert von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert. Dies verbessert die Synthese der speziefremden Proteine in dem Prokaryoten. Gemäß der bisher vorliegenden Literatur scheint ein C-terminaler His₆-tag keinen Einfluss auf die Enzymaktivität von MIF zu haben (Augustijn *et al.*, 2007). Ein N-terminaler His₆-tag könnte jedoch die Tautomeraseaktivität des Prolins 2 (P2) beeinflussen. Publierte Proteinsynthesebedingungen konnten innerhalb dieser Arbeit optimiert und für hMIF und PfMIF vereinheitlicht werden. Unter reduzierenden Bedingungen gereinigter und gelagerter MIF wurde als Trimer in der Größenausschlusschromatographie und als Monomer in der SDS-PAGE detektiert. Wurde PfMIF nicht unter reduzierenden Bedingungen analysiert, zeigte sich zusätzlich zum Trimer ein Oktamer und ein 30-mer in der Größenausschlusschromatographie. Ein Homotrimer der Proteine wird ebenfalls in der Kristallstruktur beobachtet (Dobson *et al.*, 2009), während Studien an MIF in Lösung sowohl Trimere, Dimere und Monomere identifizierten (Mischke *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1996).

Zur Untersuchung des Einflusses der Cysteine (C) auf PfMIF wurden fünf Cystein-zu-Alanin Mutanten mittels gerichteter Mutagenese-PCR generiert (PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A}, PfMIF^{C3A/C4A}, PfMIF^{C59A}, PfMIF^{C103A}). Alanin (C₃H₇NO₂) ist etwas kleiner als Cystein (C₃H₇NO₂S), erhält aber den hydrophoben Charakter der Aminosäure in der Proteinstruktur ohne ein Schwefelatom zu besitzen. Zur Verifizierung der korrekten Substitution der Cysteine ohne zusätzliche unerwünschte Mutationen, wurde das mutierte Gen sequenziert. Im Folgenden bezieht sich der Begriff „Mutanten“ auf die veränderten Proteine. Vortests zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Proteinbiosynthese der Mutanten zeigten einen vergleichbaren Proteinertrag mit dem Standardprotokoll des Wildtypproteins (WT). Alle Mutanten ließen sich sowohl in *E. coli* synthetisieren als auch reinigen. Bei der Reinigung konnten neben der typischen Bande bei 14 kDa, welche der monomeren Form des Proteins entspricht, weitere höhermolekulare Banden visualisiert werden. Diese waren wesentlich schwächer als die 14 kDa PfMIF Banden. *E. coli* Proteine enthalten teilweise Histidin-reiche Regionen, welche zu einer unspezifischen Anreicherung bei der Proteinreinigung durch Ni-NTA führen können. Besonders eine Bande bei 25 kDa ist in den Eluaten von PfMIF^{C59A} und PfMIF^{C3A/C4A} prominent. Der anti-His₆-tag Protein Immunoblot der Proteinsynthese von PfMIF^{C3A/C4A} zeigte ebenfalls eine Bande bei 25 kDa. Da diese jedoch nach der Induktion der Proteinsynthese nicht zunahm, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um ein Dimer des Proteins, sondern vielmehr um ein *E. coli* Protein mit Histidin-reichen Regionen handelt. Bei der weiteren Analyse der Proteine müssen diese Verunreinigungen berücksichtigt werden.

Alle gereinigten Proteine wurde durch TCEP in einem reduzierten Zustand gehalten und bei -20 °C gelagert. Obwohl gereinigtes Protein auch bei längerer Lagerung bei 4 °C nicht präzipitierte, nahm die Tautomeraseaktivität ab. Die Enzymaktivität wurde daher innerhalb von zwei Tagen nach der Reinigung bestimmt.

5.2.2 Oxidoreduktaseaktivität von MIF

Sowohl für hMIF als auch für PfMIF wurde eine Oxidoreduktaseaktivität beschrieben (Augustijn *et al.*, 2007; Kleemann *et al.*, 1998a). Während bei hMIF ein klassisches Trx-ähnliches Motiv (CXXC) für diese Aktivität verantwortlich ist, konnte für PfMIF noch kein Motiv identifiziert

werden (Nguyen *et al.*, 2003b). Das klassische Oxidoreduktasemotiv ist in Protozoen nicht konserviert. Das erste Cystein dieses CXXC-Motivs entspricht C59 in PfMIF, welches in einer hydrophoben Tasche im Protein lokalisiert und daher nicht zugänglich ist (Dobson *et al.*, 2009). Verglichen mit der Oxidoreduktaseaktivität von hMIF zeigt PfMIF eine Aktivität von 20 % (Augustijn *et al.*, 2007). Daten von Alam *et al.* deuten eine Involvierung von C3 und C4 an, welche beide als sulfenyliert identifiziert werden konnten (Alam *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2021).

Das Ursprungsprotokoll von Holmgren zur Bestimmung der Oxidoreduktaseaktivität von Thioredoxin (Trx), wurde von Kleemann *et al.* für MIF optimiert (Holmgren, 1979; Kleemann *et al.*, 1998b). Trx reduziert Insulin oder 2-Hydroxyethylsulfid (HEDS) und wird dabei selbst oxidiert. Damit es für einen weiteren katalytischen Zyklus zur Verfügung steht, muss das Protein durch ein Reduktionsmittel reduziert werden. Trx wird durch Dithiothreitol (DTT) reduziert, dieses Reduktionsmittel muss in dem für MIF-optimierten Assay durch reduziertes Glutathion (GSH) ersetzt werden (Kleemann *et al.*, 1998a). Basierend auf dieser Publikation wurde der HEDS-Assay für PfMIF durchgeführt und zeigte Oxidoreduktaseaktivität (Augustijn *et al.*, 2007). Alam *et al.* publizierten einige Jahre später Ergebnisse eines PfMIF Insulinassays, welchen sie gemäß dem Trx-Assay mit DTT durchgeführt haben (Alam *et al.*, 2011). Bezüglich der Oxidoreduktaseaktivität von PfMIF gibt es nur diese beiden widersprüchlichen Publikationen. In dieser Doktorarbeit analysiertes PfMIF wurde unter reduzierenden Bedingungen gereinigt und gelagert. Vortests zeigten, dass in der Probe enthaltenes TCEP in der Lage ist, Insulin zu reduzieren und somit unspezifische Signale zu generieren. Deshalb wurde TCEP vor der Analyse aus den Proben entfernt. Das in dieser Studie hergestellte rekombinante PfMIF wurde im HEDS- und im Insulinassay sowohl mit DTT als auch mit GSH als Reduktionsmittel untersucht. Parallel untersuchtes hTrx zeigte in Anwesenheit von DTT einen funktionellen Assay. Als zusätzliche Kontrollen wurde insulinhaltiger Puffer mit und ohne DTT bzw. GSH inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass Insulin ohne Reduktionsmittel und Protein über 150 min in den gewählten Pufferbedingungen stabil ist. In Anwesenheit von 1 mM DTT konnte nach 40 min ein Signalanstieg beobachtet werden. 5 mM GSH reduzierte Insulin nach ca. 115 min. Diese beiden Reduktionsmittel können direkt Insulin reduzieren und sollten daher als Negativkontrolle stets mitanalysiert werden. Alam *et al.* setzten 2,4 μM PfMIF ein und Kleemann *et al.* 4,05 μM hMIF (Alam *et al.*, 2011; Kleemann *et al.*, 1998b). Während erstere einen Anstieg der Absorption nach 15 min bzw. zweite einen Absorptionsanstieg nach 60 min detektieren konnten, zeigten unsere Messung auch nach 150 min keine Oxidoreduktaseaktivität. Eingesetzt wurden Konzentrationen bis 30 μM PfMIF, welche die gemäß Literatur eingesetzten Konzentrationen um ein Vielfaches überstiegen. Paradoxerweise haben Alam *et al.* mit 2,4 μM PfMIF nur knapp die Hälfte der Konzentration von hMIF für ihren Assay verwendet. Trotzdem zeigt ihre Publikation einen starken Anstieg der Absorption durch Insulinreduktion, obwohl PfMIF laut Augustijn *et al.* nur 20 % Restaktivität von hMIF zeigen soll (Augustijn *et al.*, 2007). Parallel untersuchter rekombinanter hMIF zeigte ebenfalls keine Oxidoreduktaseaktivität in den beiden Assays. Zusätzlich wurde rekombinanter hMIF ohne His-tag, bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Meinhardt, untersucht. Dieser wurde mit einem anderen Expressionssystem hergestellt und gereinigt, zeigte aber ebenfalls keine messbare Oxidoreduktaseaktivität. Obwohl für hMIF bereits in den 1980er eine Oxidoreduktaseaktivität beschrieben wurde, folgten vergleichsweise nur wenige Studien an diesem Protein (Kleemann *et al.*, 1998a). Die meisten Studien untersuchen nur die

Tautomeraseaktivität von MIF, was auf einen generell schwierig zu messenden Assay hindeuten könnte.

Zusammenfassend lässt sich in unserer Studie unter verschiedenen getesteten Bedingungen keine Oxidoreduktaseaktivität von PfMIF und hMIF nachweisen. Gleichzeitig findet man in der Literatur zum Teil stark widersprüchliche Angaben diesbezüglich. PfMIF fehlt das klassische Thioredoxin-ähnliche CXXC-Motiv, welches für die Oxidoreduktaseaktivität benötigt wird. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine eventuelle Oxidoreduktaseaktivität zu charakterisieren. Ob diese, falls vorhanden, eine biologische Relevanz aufweist, gilt es zu überprüfen.

5.2.3 Tautomeraseaktivität von MIF

Alle bekannten MIF-Homologe zeigen eine starke Konservierung des N-terminalen Prolin 2 (P2) (Sparkes *et al.*, 2017). Dieses weist einen sehr niedrigen pK_a -Wert auf und ist katalytisch als Base wirksam. In einer Tautomerisierungsreaktion ist MIF in der Lage, die beiden nicht-physiologischen Substrate L-Dopachrom-Methylester (DCME) und *p*-Hydroxyphenylpyruvat (*p*-HPP) umzuwandeln. Diese Aktivität wurde sowohl für hMIF als PfMIF beschrieben (Alam *et al.*, 2012; Augustijn *et al.*, 2007; Dahlgren *et al.*, 2012). Gleichzeitig wird P2 für Protein-Protein-Interaktionen, wie der Rezeptorbindung von MIF, benötigt (Fingerle-Rowson *et al.*, 2009; Zapatero *et al.*, 2016). Unklar ist bisher, ob die starke Konservierung von P2 essentiell für eine biologisch relevante Aktivität, die dreidimensionale Struktur des Proteins, oder beides ist. Trotz der hohen Konservierung der Aminosäure, zeigen Kristallstrukturen von hMIF und PfMIF strukturelle Unterschiede in dem aktiven Zentrum der Tautomeraseaktivität. Dieses ist in PfMIF stärker negativ geladen und weiter geöffnet, als in hMIF (Dobson *et al.*, 2009). Zusätzlich scheint PfMIF nur 20 % der Tautomeraseaktivität von hMIF gegenüber *p*-HPP zu zeigen (Augustijn *et al.*, 2007).

In der Literatur werden verschiedene Protokolle für die Bestimmung der Tautomeraseaktivität beschrieben. Neben den beiden Substraten, welche unterschiedlich hergestellt werden können, unterscheiden sich diese in der Zusammensetzung der verwendeten Assaypuffer. Basierend auf diesen Informationen wurde das Protokoll von Zapatero *et al.* (Zapatero *et al.*, 2016) innerhalb dieser Arbeit für das Substrat DCME optimiert. DCME wird hergestellt, indem man L-Dopa-Methylester mit Natriumperiodat inkubiert. Überschüssiges Natriumperiodat sollte anschließend aus der Lösung entfernt werden, da es nicht nur die Stabilität des DCME beeinträchtigen, sondern auch Proteinthiole während der Reaktion oxidieren könnte. Durch die Lagerung bei -80 °C ist das Substrat mehrere Monate stabil. Zusätzlich wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Puffer hinsichtlich der Stabilität des Substrats getestet. Dabei konnte die geringste spontane Tautomerisierung (<3 %) von DCME über 10 min Messdauer mit dem Puffer 50 mM Bis-Tris, 0,025 % BSA, 300 μ M CHAPS, 1 mM EDTA, pH 6,2 erreicht werden (Zapatero *et al.*, 2016). Bei anderen getesteten Puffern betrug die spontane Tautomerisierung des DCME bis zu 30 %. In Anwesenheit von hMIF und PfMIF konnte eine konzentrationsabhängige Tautomerisierung des rötlichen DCME in seine farblose Form 6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure-Methylester (DHICAME) als Absorptionsabnahme bei 475 nm detektiert werden. Hierbei ist hMIF ungefähr 25-mal effektiver als PfMIF. Für *p*-HPP wurde eine 5-mal effektivere Tautomerisierung durch hMIF beschrieben (Augustijn *et al.*, 2007). Die Effektivität der Katalyse scheint daher substratabhängig zu sein. Zusätzlich wurden

die fünf Cystein-zu-Alanin-Mutanten in dem Assay untersucht. Obwohl nach der Reinigung der Mutanten leichte Verunreinigungen durch *E. coli* Proteine beobachtet wurden, ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Proteine ebenfalls eine Tautomeraseaktivität aufweisen und dadurch das Ergebnis der Untersuchung beeinflussen. PfMIF^{C3A} und PfMIF^{C3A/C4A} zeigten eine signifikante Verringerung der Tautomeraseaktivität um ca. 70 %. Diese scheint auf den Austausch von C3 zu Alanin zurückzugehen, da für PfMIF^{C4A} eine dem Wildtypprotein vergleichbare Aktivität gemessen wurde. C4 ist in einer hydrophoben Tasche, dem Prolin abgewandt, lokalisiert (Abbildung 44). Kristallstrukturstudien zeigen, dass C3 mit β -Mercaptoethanol ein Disulfid bilden kann, was zu einer geschlossenen Konformation des aktiven Zentrums der Tautomerase führt (Dobson *et al.*, 2009). Denkbar ist daher, dass es durch den Austausch des Cysteins mit Alanin zu einer strukturellen Veränderung in unmittelbarer Nähe zu P2 kommt, wodurch die Affinität des Enzyms zum Substrat verringert wird. C59 ist im hydrophoben Inneren des Proteins lokalisiert und scheint keinen Einfluss auf die Tautomeraseaktivität von PfMIF zu haben. In der Kristallstruktur konnte die räumliche Lokalisation von C103 nicht gelöst werden. Daher lassen sich keine direkten Rückschlüsse auf eine eventuelle Beteiligung am aktiven Zentrum der Tautomeraseaktivität schließen. Gezeigt werden konnte eine um annähernd 50 % verringerte enzymatische Aktivität. Die Ergebnisse der Tautomeraseaktivitätsbestimmung wurden durch die parallele kinetische Charakterisierung der Proteine innerhalb einer Masterarbeit (Eric Springer) bestätigt. Diese zeigen eine signifikante Erhöhung der Michaelis-Konstante K_m für PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C3A/C4A} und PfMIF^{C103A} als Maß für eine verringerte Affinität des Enzyms zum Substrat. Ergänzend erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter auch mit *p*-HPP als Substrat. Diese Messungen zeigten eine signifikante Verringerung des K_m -Wertes bei den Mutanten PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A} und PfMIF^{C3A/C4A} (Springer, 2019). Die Affinität von PfMIF zu den Substraten DCME und *p*-HPP scheint also unterschiedlich stark durch die Cysteine des Proteins beeinflusst zu werden.

5.2.4 Redoxmodifikationen von MIF

hMIF enthält drei Cysteine, von denen C57 und C60 im CXXC-Motiv lokalisiert sind; PfMIF besitzt ein Cystein mehr. Während das CXXC-Motiv in Protozoen nicht konserviert ist, enthalten diese ein N-terminales CC (C3C4) Motiv. PfMIF wurde als glutathionyliert, nitrosiert und sulfenyliert im Trophozitenstadium detektiert (Kehr *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2013). Als sulfenyliert wurden C3 und C4 identifiziert. C3 ist in der Lage ein Disulfid mit β -Mercaptoethanol einzugehen, was zu einer Schließung des aktiven Zentrums der Tautomeraseaktivität führt (Dobson *et al.*, 2009). Dies ist der erste redoxregulatorische Effekt, welcher für PfMIF beschrieben wurde. Die hohe Empfänglichkeit gegenüber weiteren oxPTM lässt vermuten, dass es weitere Mechanismen zur Feinregulierung der Proteinaktivität geben könnte. Alam *et al.* zeigten einen essentiellen Einfluss von C3 und C4 auf die Oxidoreduktaseaktivität sowie auf antioxidative Schutzmechanismen des Proteins. PfMIF^{WT} scheint Plasmid-DNA und Lipide vor oxidativer Schädigung zu schützen, während Cystein-zu-Serin Mutanten von C3 und C4 dazu nicht in der Lage sind (Alam *et al.*, 2011). Die Kristallstruktur von PfMIF gibt Aufschlüsse über die räumliche Anordnung der Cysteine innerhalb des Proteins (Abbildung 44). Während C4 und C59 in hydrophobe Taschen im Inneren des Proteins ragen und nicht direkt zugänglich sind, ragt C3 aus der Proteinstruktur heraus und ist frei zugänglich. Grundsätzlich bestimmen verschiedene Faktoren ob und wie ein Cystein modifiziert werden kann. OxPTM treten also nicht unwillkürlich und zufällig auf,

sondern finden an bestimmten Cysteinen, oftmals durch Enzyme katalysiert, statt (Hildebrandt *et al.*, 2015).

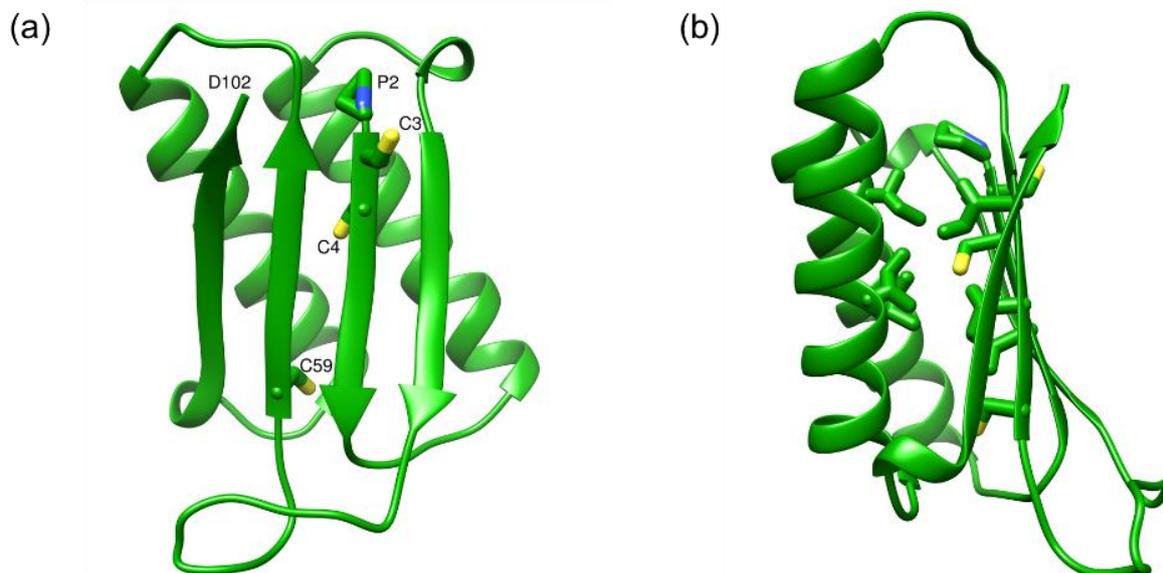


Abbildung 44 – Kristallstruktur PfMIF (2WKF)

Die Kristallstruktur PfMIF (2WKF) zeigt die Aminosäuren P2-D102. A: Hervorgehoben sind die Aminosäuren Prolin 2 (P2, blau) sowie die Cysteine C3, C4 und C59 (gelb). Aufgrund mangelnder Elektronendichte endet die Kristallstruktur mit Asparaginsäure D102; das vierte Cystein C103 ist somit nicht in dieser Struktur enthalten. B: Cystein C4 ragt in eine hydrophobe Tasche in PfMIF. Die Abbildung wurde mithilfe der Software Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Für die Cysteine von hMIF konnten bereits einige redoxregulatorische Effekte beschrieben werden. C81 kann beispielsweise nitrosiert werden, was zu einem Anstieg der Oxidoreduktaseaktivität des Proteins führt (Schindler *et al.*, 2017). Generell scheint das CXXC-Motiv für die Regulierung von inflammatorischen Funktionen eine entscheidende Funktion auszuüben. Hierbei ist allerdings unklar, ob dieser Effekt auf die katalytische Aktivität des Motivs oder vielmehr auf seine strukturgebende Rolle zurückzuführen ist (Thiele and Bernhagen, 2005).

Sulfenylierung

Sulfenylierung als oxPTM reguliert die Aktivität von verschiedenen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, ist aber auch Teil des katalytischen Zyklus von beispielsweise Peroxiredoxinen (Prx) (Devarie-Baez *et al.*, 2016; Poole and Nelson, 2008). Die Problematik bei *in vitro* Untersuchungen dieser Modifikation besteht primär in der relativ hohen Instabilität dieser. Eine schnelle und gezielte Sonde, welche spezifisch bindet und dadurch die Modifikation stabilisiert, ist daher essentiell.

Für PfMIF konnte eine Sulfenylierung von C3 und C4 unter *in vivo* Bedingungen im Trophozoiten gezeigt werden (Schipper *et al.*, 2021). Über die Empfänglichkeit der Cysteine in hMIF gegenüber dieser Modifikation lagen zu Beginn dieser Studie keine Informationen vor.

Für die *in vitro* Analyse wurden rekombinanter PfMIF und hMIF mit steigenden Konzentrationen H_2O_2 inkubiert, mit Dimedon markiert und anschließend mittels Protein Immunoblot analysiert. Hierbei wurde ein Antikörper verwendet, welcher spezifisch an sulfenylierte, mit Dimedon markierte Thiole bindet (Aker *et al.*, 2016). Getestet wurden H_2O_2 -Konzentrationen von 0,5 bis 50 mM. Während hMIF kein Sulfenylierungssignal unter den getesteten Bedingungen zeigte, konnte für PfMIF mit steigender H_2O_2 -Konzentration bis 10 mM erst eine Zunahme der Signalintensität beobachtet werden, bevor diese ab einer H_2O_2 -Konzentration von 20 mM abnahm. Oxidativer Stress führt also zunächst zur Sulfenylierung von PfMIF, bevor diese durch zu hohe H_2O_2 -Konzentrationen überoxidiert wird zu Sulfin- bzw. Sulfonsäuren. Zusätzlich zu der 14 kDa Bande, welche der monomeren Form des Proteins entspricht, konnte ab einer Konzentration von 5 mM H_2O_2 eine schwache Bande bei 25 kDa detektiert werden. Hierbei ist unklar, ob es sich um eine eventuelle Verunreinigung durch ein sulfenylierbares *E. coli* Protein handelt, oder um eine dimere Form von PfMIF. Parallel wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt. In der ersten wurde das Protein zwar oxidiert, aber es erfolgte keine Zugabe von Dimedon. Für diese Probe wurde kein Signal in dem Protein-Immunoblot detektiert, somit konnte eine Kreuzreaktivität des Antikörpers weitestgehend ausgeschlossen werden. In der zweiten Kontrolle wurde das Protein im reduzierten Zustand mitgeführt. Es lag somit TCEP in der Probe vor und es erfolgte keine Zugabe von H_2O_2 . Für diese Probe konnte ein deutliches Signal detektiert werden, welche fast so stark war wie das Signal des mit 0,5 mM H_2O_2 inkubierten Proteins. Dies könnte bedeuten, dass das Protein nicht vollständig reduziert vorlag und somit bereits Sulfensäuren im Protein waren, oder dass Dimedon nicht nur Sulfensäuren bindet. Parallel untersuchte Proteine wie GAPDH und PfPrx1 zeigten ebenfalls Signal in dieser Negativkontrolle. TCEP ist ein starkes Reduktionsmittel, so dass bei den eingesetzten Konzentrationen das Protein vollständig reduziert sein sollte. Dimedon kann mit Aldehyden und Aminen reagieren, was eine mögliche Erklärung für das Signal in der Negativkontrolle sein könnte (Klomsiri *et al.*, 2010). Um dies auszuschließen, könnte man das Protein mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen inkubieren, mit Dimedon markieren und dann mittel MS-Analysen auf sulfenylierte Cysteine untersuchen.

Inwiefern Sulfenylierung für die Aktivität von MIF benötigt wird oder diese reguliert, ist noch nicht verstanden. Für hMIF konnte bereits eine Vielzahl von Interaktionspartnern identifiziert werden. Dazu gehört hPrx1, ein typisches 2-Cys-Prx, welches über C173 eine Interaktion mit hMIF eingeht. Diese Interaktion wird durch den Redoxstatus beeinflusst: Während unter reduzierenden Bedingungen keine Interaktion stattfinden kann, verstärkt die Inkubation mit H_2O_2 diese. Möglich wäre die Bildung einer Sulfensäure in hMIF als Vorstufe für die Disulfidbindung mit hPrx1. hPrx1 wird ebenfalls über einen nicht-klassischen Sekretionsweg ausgeschüttet und könnte extrazelluläre die Funktion von hMIF regulieren (Ishii *et al.*, 2012). Gleichzeitig verringert die Protein-Protein-Interaktion die Tautomeraseaktivität und die antioxidative Funktion von hMIF (Jung *et al.*, 2001).

S-Nitrosierung

Für PfMIF konnte unter *in vivo* Bedingungen nach Inkubation mit GSNO eine S-Nitrosierung gezeigt werden (Wang *et al.*, 2013). Ebenso ist auch hMIF zugänglich für diese Modifikation (Luedike *et al.*, 2012). Obwohl S-Nitrosierung als oxPTM seit langem untersucht wird, gibt es in der Literatur verschiedene Theorien zu der Stabilität der Modifikation. Um eine

regulatorische Funktion auf ein Protein ausüben zu können, wie es für viele Proteine beschrieben wurde, muss die Modifikation stabil sein. Gleichzeitig scheint die Instabilität der S-Nitrosobindung und deren Reaktivität gegenüber Thiolen und Metallen, dieser Theorie zu widersprechen (Wolhuter *et al.*, 2018). Zusätzlich wird die Möglichkeit beschrieben, dass Proteine welche als nitrosiert identifiziert werden, eine S-Nitrosylase Aktivität aufweisen. Diese Proteine übertragen also NO auf andere Moleküle und wirken so in einer kaskadenartigen Signalweitergabe (Stomberski *et al.*, 2019). Diese Art der NO-Übertragung wird als Transnitrosierung bezeichnet. Möglicherweise kann nitrosierter MIF so NO auf Interaktionspartner übertragen. Für hMIF konnten bereits verschiedene Interaktionspartner wie hPrx1, Insulin, p53 und hTrx1 beschrieben werden (Elgass *et al.*, 2020). Dieser Mechanismus könnte mittels Interaktionsstudien genauer untersucht werden.

Mittels indirekter Nachweismethode, der Biotin Switch Technik (BST), wurden rekombinanter hMIF und PfMIF auf ihre Empfänglichkeit gegenüber einer Transnitrosierung mit S-Nitrosocystein (Cys-NO) *in vitro* untersucht. Grundsätzlich ist der Effekt der Transnitrosierung abhängig von der eingesetzten Substanz. Neben Cys-NO wird meist S-Nitrosoglutathion (GSNO) verwendet. Dieses kann neben einer S-Nitrosierung auch eine S-Glutathionylierung induzieren. Somit könnten beide Modifikationen miteinander konkurrieren, wenn das gleiche Cystein ihnen gegenüber empfänglich ist. Drei wesentliche Schritte machen die BST aus: Im ersten Schritt werden freie Cysteinthiole „geblockt“, indem man ein Alkylanz zu der Probe gibt, welches spezifisch an diese bindet. Im zweiten Schritt wird dann die S-Nitrosierung durch Ascorbat entfernt, so dass freie Thiole in der Probe vorliegen. Diese werden dann im dritten Schritt durch ein Thiol-reaktives biotinyliertes Reagenz gebunden. Der dritte Schritt erlaubt eine Anreicherung solcherart markierter Proteine oder deren Visualisierung mittels eines anti-Biotin-Antikörpers im Protein Immunoblot. Aufgrund des indirekten Nachweises der Modifikation erhöhen sich potenzielle Fehlerquellen, sodass adäquate Kontrollen mitzuführen sind. MIF wurde mit zehnfachem Überschuss an Cys-NO zu in der Probe enthaltenen Cysteinen inkubiert, um eine Transnitrosierung zu induzieren. Anschließend wurden unter denaturierenden Bedingungen freie Thiole entweder mit N-Ethylmaleimid (NEM), Iodoacetamid (IAA) oder Methylmethanthiosulfonat (MMTS) geblockt. Die durch Natriumascorbat entfernte Nitrosierung wurde mittels Iodoactyl-PEG2-Biotins markiert. Um eine Kreuzreaktivität des verwendeten anti-Biotin-Antikörpers auszuschließen, wurde eine Probe ohne Iodoactyl-PEG2-Biotin inkubiert. Zusätzlich wurde in einer Probe keine Transnitrosierung des Proteins durchgeführt. In einer Probe wurde das Protein zuerst transnitrosiert, es erfolgte aber keine Reduktion mit Natriumascorbat. Zusätzlich wurde eine Probe weder transnitrosiert, noch mit Natriumascorbat inkubiert.

Je nach verwendetem Alkylanz zeigten sich im Protein Immunoblot unterschiedliche Signale. Mit NEM inkubierter hMIF zeigte für alle Proben, außer der Kontrolle ohne Iodoactyl-PEG2-Biotin, ein schwaches Signal. In der Ponceau-gefärbten Ladekontrolle konnten aufgrund der niedrigen Proteinmenge keine deutlichen Banden detektiert werden. Es wäre daher möglich, dass unterschiedlich viel Protein aufgetragen wurde, da gleiche Volumina anstatt gleicher Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden. Dieses Phänomen konnte in allen drei Replikaten für mit NEM geblocktem hMIF beobachtet werden. Dieses Alkylanz scheint daher nicht geeignet, um eine S-Nitrosierung des Proteins im BST zu untersuchen. Mit MMTS geblockter hMIF zeigte ein stärkeres Bandenmuster als mit NEM geblockter hMIF. Hierbei konnte anhand

der Ladekontrolle eine gleichmäßige Proteinmenge bei den verschiedenen Proben gezeigt werden. Alle Proben außer der Kontrolle ohne Iodoacetyl-PEG2-Biotin zeigten ein gleichmäßig starkes Signal. Im Gegensatz dazu wurde in dem Ansatz mit IAA als Blockierungsreagenz nur ein Signal in der Probe detektiert, welche nitrosiert, reduziert und anschließend mit Iodoacetyl-PEG2-Biotin markiert wurde. Ein ähnliches Muster wurde für PfMIF gezeigt. Insgesamt schien das Signal im Protein Immunoblot etwas intensiver als für hMIF, dies ließ sich jedoch nicht quantifizieren. Im Gegensatz zum Sulfonylierungs-Protein Immunoblot, wurde hierbei nur die 14 kDa Bande detektiert. Mit NEM inkubierter PfMIF zeigte in allen Proben, außer der Kontrolle ohne Iodoacetyl-PEG2-Biotin, ein schwaches Signal. Nach Inkubation mit MMTS konnte ein ähnliches Muster detektiert werden. Hier wurde allerdings das stärkste Signal in der Probe detektiert, welche weder mit Cys-NO inkubiert, noch mit Natriumascorbat reduziert wurde. Blockierung der Thiole mit IAA führte zu einem starken Signal in der Probe, welche transnitrosiert, reduziert und mit ohne Iodoacetyl-PEG2-Biotin markiert wurde. Allerdings zeigte sich in dem Protein Immunoblot ebenfalls ein schwaches Signal in der Probe ohne Iodoacetyl-PEG2-Biotin. Dies deutet auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers hin. Da analog vorbereitete Proben für die anderen Alkylanzien kein Signal in dieser Kontrolle zeigten, könnte die Kreuzreaktivität eventuell auf die Blockierung von Thiolen durch IAA zurückzuführen sein.

Diese Ergebnisse zeigen eine allgemeine Problematik dieses Assays. Je nach eingesetztem Alkylanz, werden stark variierende Ergebnisse erzielt. Die mitgeführten Kontrollen, welche aufgrund der Probenvorbereitung eigentlich nicht zu einem detektierbaren Signal führen dürften, zeigten teilweise sehr starke Signale im Protein Immunoblot. Somit lässt sich anhand dieses Assays keine eindeutige Aussage hinsichtlich der Nitrosierbarkeit der Proteine unter den getesteten Bedingungen treffen.

Ergänzend zum BST wurden transnitrosierter hMIF und PfMIF mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD) analysiert. Bei dieser Methode wird in einer Probe enthaltenes NO freigesetzt und quantitativ bestimmt. Ungebundenes NO wird dabei vor der eigentlichen Analyse durch Sulfanilamid eliminiert. Bestimmt werden bei einer Analyse sowohl Nitrosamine (RNNO) als auch Nitrosothiole (RSNO), zusammengefasst als RXNO. Während meistens nur Zellgewebe mittels CLD auf das Vorkommen von NO analysiert werden, sollte der Versuchsaufbau prinzipiell auch NO-Analysen von rekombinanten Proteinen erlauben (Wany *et al.*, 2016). Zur Untersuchung einer eventuellen Konzentrationsabhängigkeit der Modifikation, wurden hMIF und PfMIF mit steigenden Konzentrationen an Cys-NO inkubiert. Hierbei wurde Cys-NO im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 zu der Gesamtmenge an in der Probe enthaltenen Cysteinen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine S-Nitrosierung sowohl von hMIF als auch PfMIF unter den getesteten Bedingungen induziert wurde. Diese fand zu fast 100 % an Thiolen statt. Allerdings konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse und keine Linearität zwischen eingesetzter Cys-NO Konzentration und Signalintensität erzielt werden. Während in Vortests keine S-Nitrosierung für hMIF gezeigt werden konnte, war die gemessene RSNO-Konzentration bei der finalen Messung deutlich erhöht gegenüber der RSNO-Konzentration, welche für nitrosierten PfMIF gemessen wurde. Mit steigendem Verhältnis von Cys-NO zu in der Probe enthaltenen Cysteinen, würde man einen linearen Anstieg der RSNO-Konzentration erwarten, bis diese eine Sättigung erreicht. Dieses Verhalten konnte weder für hMIF noch für PfMIF beobachtet werden. Somit erlaubt die CLD-Messung

keine Quantifizierung der S-Nitrosierung, sondern vielmehr eine Bestätigung der Ergebnisse des BST.

Zusätzlich wurde nitrosierter MIF mittels MS auf Modifikationsstellen untersucht. Hierbei wurde C103 in PfMIF als nitrosiert detektiert. Es konnte kein Peptid, welches C3 und C4 enthielt, identifiziert werden. Für hMIF konnte nur C81 detektiert werden, allerdings ohne Modifikation. Ebenfalls wurden die weiteren Cysteine C57 und C60 nicht detektiert. Gemäß Literatur kann hMIF an C81 unter *in vivo* und *in vitro* Bedingungen nitrosiert werden (Luedike *et al.*, 2012). Diese Modifikation zeigt eine kardioprotektive Funktion und ist assoziiert mit einer verstärkten Oxidoreduktaseaktivität. Mittels BST und CLD wurde eine S-Nitrosierung für hMIF gezeigt, unklar ist, warum diese in der MS nicht identifiziert werden konnte. Die Modifikation ist sensitiv gegenüber UV-Licht und könnte bei der Probenvorbereitung beschädigt worden sein. Denkbar ist auch, dass nicht alle hMIF-Moleküle nitrosiert wurden und nur Peptide von nicht-modifiziertem hMIF detektiert wurden. Der Versuch sollte wiederholt werden, unter Verwendung von anderen proteolytischen Enzymen. Diese generieren andere Peptide, wodurch C57 und C60 (bzw. C3 und C4 in PfMIF) detektiert werden könnten.

Es konnte mittels indirekter und direkter Nachweismethode eine S-Nitrosierung für hMIF und PfMIF unter *in vitro* Bedingungen gezeigt werden. Mittels MS-Analyse konnte C103 in PfMIF als Modifikationsstelle identifiziert werden. Nitrosierter MIF zeigte keine detektierbare Aktivitätsänderung im Tautomeraseassay. Weitere Studien müssen durchgeführt werden, um zu analysieren ob diese Modifikation *in vivo* stabil ist und einen direkten regulatorischen Effekt ausübt, oder ob die S-Nitrosierung von MIF nur ein kurzlebiger Übergangszustand zu einer Disulfidbrücke ist.

S-Glutathionylierung

Nachdem unter *in vivo* Bedingungen bereits eine S-Glutathionylierung von PfMIF gezeigt werden konnte, wurden diese Modifikation unter *in vitro* Bedingungen am rekombinanten Protein genauer charakterisiert. Generell ist die Modifikation sehr empfänglich gegenüber Schwankungen des GSH/GSSG-Levels. Steigt das ROS-Level, wird GSH zu GSSG oxidiert. Dieses kann dann Proteine glutathionylieren und diese so vor Überoxidation schützen und ihre Funktion verändern (Beer *et al.*, 2004). Eine ähnliche Situation wird daher in *in vitro* Untersuchungen durch die Inkubation des rekombinanten Proteins mit GSSG simuliert. Hierfür wurde in Vorversuchen getestet, ob sich MIF durch GSH oder GSSG glutathionylieren lässt. Es gibt Proteine, die für eine der beiden Formen von Glutathion zugänglich sind und andere, welche sich durch GSH und GSSG modifizieren lassen, allerdings mit unterschiedlichen Funktionen (Kehr *et al.*, 2011). Rekombinanter PfMIF wird durch GSSG konzentrationsabhängig modifiziert. Die Signalintensität des anti-Glutathion-Antikörpers im Protein Immunoblot nahm von 0,2 bis 10 mM GSSG konstant zu. In der Zeitabhängigkeitsuntersuchung zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Signalintensität, dieses war nach 2 min genauso stark wie nach 60 min Inkubation mit GSSG. Analog zum BST-Protein Immunoblot wurde die 14 kDa Bande von PfMIF detektiert. Im Folgenden wurden die Cystein-zu-Alanin Mutanten von PfMIF für 10 min mit 5 mM GSSG inkubiert und im Protein Immunoblot analysiert. Das stärkste Signal konnte bei PfMIF^{C3A} und PfMIF^{C4A} in der 14 kDa Bande verzeichnet werden. Auch die Signalintensitäten von PfMIF^{C59A} und PfMIF^{C103A} scheinen etwas stärker zu sein als die des WT-Proteins. Dies lässt sich allerdings anhand dieser

Methode nicht quantifizieren. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist eine leichte Veränderung in der Umgebung der für die Modifikation empfänglichen Cysteine, so dass diese besser zugänglich sein könnten. Zusätzlich zu der 14 kDa Bande lässt sich ein Signal des Antikörpers bei 25 kDa detektieren. Dieses ist am prominentesten bei PfMIF^{C59A} und PfMIF^{C3A/C4A}. Wie sich sowohl an der Coomassiefärbung der gereinigten Mutanten sowie dem anti-His₆-tag Protein Immunoblot der Proteinsynthese von PfMIF^{C3A/C4A} zeigt, sind die analysierten Proben der Mutanten leicht verunreinigt mit *E. coli* Proteinen. Diese können potenziell ebenfalls glutathionyliert werden und die höhermolekularen Banden im anti-Glutathion Protein Immunoblot erklären. Um zu analysieren, ob die 25 kDa Bande, welche neben der 14 kDa Bande am prominentesten erscheint, ein PfMIF Dimer oder ein anderes Protein enthält, könnte man diese Bande aus dem Gel ausschneiden und mittels MS untersuchen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich PfMIF als Wildtypprotein sowie Cystein-zu-Alanin-Mutanten durch GSSG glutathionyliert zu werden scheint. Weitere Analysen der Mutanten werden benötigt, um dies genauer spezifizieren zu können. Ergänzende Untersuchungen von glutathionyliertem PfMIF mittels MS konnten C59 und C103 als modifiziert identifizieren. Weder C3 noch C4 wurden detektiert.

Für hMIF konnte weder in der Zeit- noch in der Konzentrationsabhängigkeit ein Signal für S-Glutathionylierung detektiert werden. Getestet wurden GSSG-Konzentrationen von 0,2 bis 10 mM und Inkubationszeiten von 2 bis 60 min. Allerdings zeigte mit 5 mM für 10 min inkubierter hMIF im Übersichts-Immunoblot ein schwaches Signal. Auch die Untersuchung mittels MS zeigte eine S-Glutathionylierung am C81, während C57 und C60 nicht detektiert wurden. Dieses Cystein befindet sich außerhalb des aktiven Zentrums und scheint wichtig zu sein für die Struktur des Proteins (Kleemann *et al.*, 1999). Untersuchungen an einem 16 Aminosäuren hMIF Peptid (50-65) zeigten, dass die Cysteine des aktiven Zentrums gemischte Disulfide mit Glutathion bilden können (Nguyen *et al.*, 2003b). Peptide können jedoch die normale räumliche Struktur eines Proteins, welche maßgeblich die Zugänglichkeit eines Cysteins für Modifikationen bestimmt, nur unvollständig simulieren. Weitere MS Analysen von modifiziertem hMIF könnten über die Zugänglichkeit von C57 und C60 für S-Glutathionylierung Aufschluss geben. Durch die Verwendung eines anderen proteolytischen Enzyms können andere Spaltstellen generiert werden, wodurch andere Peptide entstehen. Somit könnte eine höhere Sequenzabdeckung des Proteins erreicht werden und C57 und C60 nachgewiesen werden.

hMIF und PfMIF können beide unter *in vitro* Bedingungen glutathionyliert werden, ohne dass dies zu einem detektierbaren Einfluss auf die Tautomeraseaktivität des Proteins führt. MS Analysen am rekombinanten Protein zeigen, dass C59 in PfMIF glutathionyliert und nitrosiert werden kann. Dies impliziert, dass teilweise dasselbe Cystein in einem Protein empfänglich gegenüber verschiedenen Modifikationen sein kann. Dies bietet eine Möglichkeit ein Protein an verschiedene Zustände anzupassen und zu regulieren. Den genauen Mechanismus gilt es unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren.

5.2.5 Rezeptorinteraktionsstudien

hMIF kann an insgesamt vier verschiedene Rezeptoren binden und so eine breite Vielfalt an biologischen Funktionen ausüben (Farr *et al.*, 2020). PfMIF kann über die Bindung an den humanen Rezeptor CD74 das Immunsystem des Wirts regulieren, um das eigene Überleben

zu verbessern (Augustijn *et al.*, 2007). Inwiefern PfMIF mit den anderen MIF-Rezeptoren CXCR2, 4 und 7 interagieren kann, wurde bisher noch nicht untersucht. Mittels eines transgenen Hefestamms, welcher CXCR2 oder alternativ CXCR4 exprimiert, wurde die Aktivierung dieser Rezeptoren durch rekombinanten PfMIF untersucht. Durch Bindung und Aktivierung des Rezeptors wird in diesem System, über den MAPK-Signalweg, die Transkription des Reportgens für β -Galaktosidase initiiert. Mittels Luciferase-Kit kann β -Galaktosidase als Maß für die Aktivierung des Rezeptors anschließend quantifiziert werden. Zusätzlich zum Wildtypprotein wurden die Cystein-zu-Alanin-Mutanten sowie nitrosierter und glutathionierter PfMIF auf die Fähigkeit der Rezeptoraktivierung untersucht. Hierbei wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten, den redoxmodifizierten Proteinen und den beiden Rezeptoren ersichtlich. Generell initiierte PfMIF eine signifikant stärkere Aktivierung beider Rezeptoren, als parallel untersuchter rekombinanter hMIF. Ein ähnliches Verhalten konnte von unseren Kooperationspartnern bereits bei der Aktivierung der Rezeptoren durch *A. thaliana* MIF beobachtet werden. Unklar ist hierbei, ob dies ein generelles unspezifisches Phänomen des *in vitro* Assays ist, oder eine physiologische Relevanz hat. Grundsätzlich werden für diesen Assay aufgrund geringer Permeabilität der Zellwand von Hefe hohe Proteinkonzentrationen benötigt. Eventuell können nicht-Säuger Homologe des Proteins die Zellwand besser passieren und daher verstärkt zu einer Rezeptoraktivierung führen. Dies wurde jedoch nicht genauer analysiert.

Verglichen mit PfMIF, sind PfMIF^{C3A}, PfMIF^{C4A} und PfMIF^{C59A} signifikant weniger in der Lage CXCR2 und CXCR4 zu aktivieren. Dabei zeigen PfMIF^{C3A} und PfMIF^{C4A} ungefähr eine halb so starke Aktivierung der Rezeptoren wie das Wildtypprotein. Die Aktivierung der Rezeptoren durch PfMIF^{C59A} ist um ungefähr 25 % verringert, verglichen mit dem Wildtypprotein. Paradoxerweise zeigt die Doppelmutante PfMIF^{C3A/C4A} keinen signifikanten Unterschied in der Rezeptoraktivierung verglichen mit dem Wildtyp. Diese Beobachtung impliziert, dass entweder C3 und C4 beide vorhanden oder beide durch Alanin ersetzt werden müssen, damit PfMIF die Rezeptoren CXCR2 und 4 aktivieren kann. Glutathionierter und nitrosierter PfMIF zeigte gegenüber dem unmodifizierten Protein eine signifikant verringerte Aktivierung beider Rezeptoren. Hierbei wurden für glutathionierten PfMIF ungefähr 20 % und für nitrosierten PfMIF 75 % der Rezeptoraktivierung von unmodifiziertem PfMIF nachgewiesen. Damit konnte erstmal eine redoxinduzierte Regulation für PfMIF detektiert werden. Mittels MS-Analysen konnte C103 als glutathioniert oder nitrosiert identifiziert werden. Für C59 konnte zusätzlich eine S-Glutathionierung detektiert werden, obwohl dieses im unmodifizierten Protein eigentlich im Proteininneren lokalisiert ist. Es wäre möglich, dass es durch oxPTM zu einer strukturellen Veränderung kommt, welche sich auf die Interaktion mit dem Rezeptor auswirken könnte. Über die genaue Lokalisation von C103 sind bisher noch keine Informationen verfügbar, daher lässt sich nicht vorhersagen, inwiefern sich eine Modifikation dieser Aminosäure auf die Struktur des Proteins auswirken könnte. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Untersuchung mit der Bestimmung der Tautomeraseaktivität, dann zeigt sich, dass beide Aktivitäten unabhängig voneinander zu sein scheinen. Die oxPTM zeigten keinen Einfluss auf die Tautomeraseaktivität, aktivierten jedoch CXCR2 und 4 signifikant weniger als unmodifizierter PfMIF. Während PfMIF^{C103A} einer verringerten Tautomeraseaktivität zeigte, konnte eine dem Wildtypprotein vergleichbare Rezeptoraktivierung detektiert werden.

Die Rezeptorinteraktionsanalyse gibt einen ersten Einblick hinsichtlich der Aktivierbarkeit von CXCR2 und 4 durch Bindung eines Proteins. Allerdings lassen sich so noch keine Aussagen treffen, ob eine verminderte Aktivierung durch eine verminderte Bindung an den Rezeptor oder durch verringerte Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade initiiert wird. Gezeigt werden konnte eine verminderte Aktivierung der Translation des Reportergens durch eine S-Nitrosierung oder S-Glutathionylierung von PfMIF. Ob dieser Effekt nur unter *in vitro* Bedingungen zu beobachten ist, oder ob PfMIF im Wirt diese Modifikationen aufzeigt, gilt es zu untersuchen. Bisher wurde der Redoxstatus von sezerniertem PfMIF noch nicht analysiert. Zwei Szenarien scheinen möglich: PfMIF könnte in reduzierter Form sezerniert werden und anschließend von dem Wirtsorganismus nitrosiert werden. Eine Infektion mit *Plasmodium* ist für den Wirtsorganismus ein Zustand, welche mit erhöhten Leveln an oxidativen und nitrosativen Spezies verbunden ist. Denkbar wäre daher eine nicht-enzymatische S-Nitrosierung von PfMIF, welche zu einer signifikant schlechteren Aktivierung der humanen Rezeptoren und damit zu einem besseren Überleben des Wirtsorganismus führt. Hierfür sprechen würde die gesteigerte Produktion von NO durch die iNOS, welche durch die Infektion mit *Plasmodium* stimuliert wird (Ranjan *et al.*, 2016). Dies ist Teil des Abwehrmechanismus des Wirts, um den Parasiten zu eliminieren. Für den Wirt wäre es von Vorteil, nicht nur den Parasiten direkt zu bekämpfen, sondern auch dessen Virulenzfaktoren, wie PfMIF, zu neutralisieren. Das zweite Szenario ist die Sezernierung von bereits nitrosiertem oder glutathionylierten PfMIF, welche der Feinregulierung des Wirtsimmunsystems dienen könnten. *Plasmodium* ist in der Lage durch eine Modulation des Immunsystems sein Überleben zu verbessern (Ghosh *et al.*, 2019). Eine zu starke Aktivierung des Immunsystems könnte nicht nur den Parasiten komplett eliminieren, sondern auch zu einer Schädigung des Wirtsorganismus führen. Eine lange Persistenz im Wirt erhöht insgesamt die Ausbreitung des Erregers und ist daher erstrebenswert für den Parasiten. Welcher Mechanismus *in vivo* auftritt, muss im Detail untersucht werden.

CXCR2 scheint etwas stärker durch PfMIF aktiviert zu werden als CXCR4. Gleiches gilt für die Aktivierung durch Cystein-zu-Alanin Mutanten sowie redoxmodifizierten PfMIF. Die Bindung an einen Rezeptor wird durch bestimmte Motive im Protein vermittelt, welche mit dem Rezeptor interagieren müssen. Für die Bindung an CXCR2 benötigt hMIF ein pseudo ELR-Motiv und einen N-loop (Krammer *et al.*, 2020; Weber *et al.*, 2008). Damit hMIF wiederum mit CXCR4 interagieren kann, wird ebenfalls der N-loop benötigt, aber auch P2 sowie ein RLR-Motiv, welches den loop erweitert (Kontos *et al.*, 2020; Lacy *et al.*, 2018). Obwohl in PfMIF diese Motive nicht stark konserviert sind, enthält es aber den N-loop. Weitere Untersuchungen, beispielsweise über Interaktions-Modellierung, werden benötigt um ein besseres Verständnis der Bindung von PfMIF an die Rezeptoren zu erlangen. Die unterschiedlich starke Aktivierung von verschiedenen Rezeptoren könnte einer Feinregulierung der induzierten biologischen Reaktionen dienen. Bisher noch nicht untersucht wurde eine mögliche Interaktion zwischen CXCR7 und PfMIF, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen dieses Modell noch nicht etabliert war. Parallel wären ebenfalls Interaktionsstudien mit CD74 interessant, da für die Bindung von MIF an diesen P2 besonders wichtig zu sein scheint (Kontos *et al.*, 2020). Unsere Kooperationspartner arbeiten aktuell an einer Etablierung von CD74 für die Oberflächenplasmonresonanzanalyse. Mittels dieser lassen sich in Echtzeit Interaktionen messen und Kinetik- und Affinitätsparameter bestimmen. Dies könnte wichtige Hinweise auf den Einfluss von Redoxmodifikationen auf Protein-Protein-Interaktionen geben. Obwohl sich

mit Hilfe dieser *in vitro* Untersuchungen erste Rückschlüsse auf mögliche biologische Effekte ziehen lassen, werden ergänzende *in vivo* Studien benötigt. Eine Möglichkeit außerhalb von Tiermodellen zu arbeiten, bietet die Kokultivierung von verschiedenen Zellspezies. Hierfür könnte man beispielsweise die direkten Auswirkungen von PfMIF auf Immunzellen untersuchen, indem mononukleäre Zellen des peripheren Bluts mit *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten kokultiviert werden (Aitken, 2020).

In dieser Studie lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Cysteine in PfMIF. Nachdem für dieses Protein ein Effekt von Redoxmodifikationen auf die Rezeptoraktivierung beschrieben wurde, wäre es von Interesse diesen Effekt ebenfalls an hMIF zu untersuchen. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist dieses Protein ebenfalls zugänglich für S-Nitrosierung und S-Glutathionylierung, ohne dass diese einen messbaren Einfluss auf die Tautomeraseaktivität des Proteins haben. Beschrieben wurde ein kardioprotektiver Effekt von an C81 nitrosiertem hMIF (Luedike *et al.*, 2012). Dieses Cystein scheint auch für S-Glutathionylierung *in vitro* zugänglich zu sein. Eine durch diese oxPTM veränderte Proteinstruktur könnte für hMIF zu einer verringerten Rezeptoraktivierung und dadurch bedingt zu einer verringerten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führen. Somit könnte es zu einer verminderten Entzündung und Gewebeschädigung als kardioprotektiver Effekt kommen. Um einen solchen Effekt zu untersuchen, bedarf es weiterer Studien. Generell ist noch wenig über das komplexe Zusammenspiel zwischen hMIF und PfMIF im Menschen bekannt. Beide können die gleichen Rezeptoren aktivieren, allerdings muss untersucht werden, inwiefern sich die jeweilige Bindung auf die Rezeptoraktivierung auswirkt. Klinische Studien lieferten bisher zum Teil stark widersprüchliche Aussagen hinsichtlich eines protektiven oder schädlichen Effektes des Zytokins. So kann sich zum einen die Neutralisierung von PfMIF positiv auf den Erkrankungsverlauf des Wirts ausüben (Baeza Garcia *et al.*, 2018), während in einer anderen Studie die Sezernierung von MIF NETose auslöst, welche die Ausbreitung des Erregers minimiert (Rodrigues *et al.*, 2020). Hierbei scheint es einen Einfluss zu haben, ob MIF als Ganzes neutralisiert wird, oder ob selektiv einzelne Funktionen gehemmt werden. Dies unterstreicht die Komplexität des Zusammenspiels von verschiedensten Faktoren in einem mehrzelligen Organismus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Bindung von PfMIF an die humanen Rezeptoren CXCR2 und 4 nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sowohl die Cysteine des Proteins, als auch deren Redoxmodifikationen einen signifikanten Einfluss auf die Interaktion haben. Die Aktivierung der Rezeptoren scheint unabhängig von der Tautomeraseaktivität zu sein. Weitere Studien werden benötigt, um die biologische Relevanz dieses Regulationsmechanismus zu untersuchen.

5.2.6 Kristallisation von redoxmodifiziertem PfMIF

Dobson *et al.* veröffentlichten 2009 die erste Kristallstruktur für PfMIF mit einer Auflösung von 2,2 Å (Dobson *et al.*, 2009). In dieser zeigte sich, dass sich das aktive Zentrum der Tautomeraseaktivität durch die Disulfidbindung zwischen C3 und β -Mercaptoethanol verändert und in einen geschlossenen Zustand übergehen kann. Diese Beobachtung impliziert, dass sich durch Redoxmodifikationen die räumliche Struktur von PfMIF verändern kann. Untersuchungen zur S-Nitrosierung und S-Glutathionylierung an PfMIF zeigen eine

Empfänglichkeit gegenüber dieser Modifikation *in vitro* (5.2.4) und *in vivo* (Kehr *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Während diese Modifikation keinen Einfluss auf die Tautomeraseaktivität des Proteins zu haben scheinen, konnten weitere Untersuchungen eine signifikant verringerte Aktivierung der humanen Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 verglichen mit unmodifiziertem PfMIF zeigen. Durch die oxPTM könnte sich die Struktur von PfMIF ändern, so dass die Affinität des Proteins zum Rezeptor verringert ist, oder PfMIF diesen trotz Bindung nicht mehr ausreichend aktivieren kann um die intrazelluläre Signalkaskade zu initiieren. Um dies genauer zu untersuchen, wird die dreidimensionale Struktur des modifizierten Proteins benötigt. Ausgehend von publizierten Bedingungen für PfMIF bzw. PfMIF im Komplex mit einem Inhibitor, wurden verschiedene Bedingungen getestet um glutathionylierten und nitrosierten PfMIF zu kristallisieren und deren Struktur zu lösen (Dobson *et al.*, 2009; Pantouris *et al.*, 2014).

Für nitrosierten PfMIF konnte ein Strukturmodell mit einer Auflösung von 1,7 Å in der Röntgenstrukturanalyse generiert werden. Um ein modifiziertes Cystein in einer Kristallstruktur darstellen zu können, sollte die Auflösung mindesten 2,5 Å betragen. Aufgrund einer Überschneidung von Raumgruppen, konnte die genaue Anordnung bisher noch nicht final berechnet werden. Sobald die Berechnung abgeschlossen ist, kann man mithilfe dieser Struktur nicht nur eventuelle Veränderungen der räumlichen Anordnung des Proteins analysieren, sondern auch modellieren, wie sich diese auf die Bindung an einen Rezeptor auswirken kann. Voraussetzung hierfür ist, dass die Struktur des Rezeptors bekannt ist und idealerweise Informationen über die an einer Interaktion beteiligten Motive der Interaktionspartner vorhanden sind.

Bisher konnten trotz zahlreicher getesteter Bedingungen noch keine optimalen Kristallisationsbedingungen für glutathionylierten PfMIF identifiziert werden. Unter verschiedenen Bedingungen wurde eine Phasentrennung als Vorstufe der Keimbildung beobachtet. Generell ist die Identifizierung von optimalen Kristallisationsbedingungen für ein Protein meist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auf dem Weg zu einer Proteinstruktur. Ausgehend von den bisher getesteten Bedingungen können jetzt weitere Faktoren variiert werden, um eine Kristallisation von glutathionyliertem PfMIF zu induzieren. Neben dem pH-Wert des Kristallisationspuffers und dessen Zusammensetzung, können auch Faktoren wie die Konzentration des Proteins sowie die Inkubationstemperatur variiert werden (McPherson and Cudney, 2014). Obwohl Bedingungen beschrieben sind, unter denen PfMIF kristallisiert, lassen sich diese nicht auf modifizierten PfMIF übertragen. Auch die Komplexbildung mit einem Inhibitor führt zu veränderten Kristallisationsbedingungen für PfMIF (Dobson *et al.*, 2009; Pantouris *et al.*, 2014). Dies unterstreicht die Komplexität dieser Methode. Modifikationen in einem Protein können unter anderem zum Aufspalten von intermolekularen Brücken führen, welche so eine Destabilisierung des Moleküls induzieren. Eine erhöhte Flexibilität verringert die Neigung eines Proteins zu kristallisieren.

Literaturverzeichnis

- Aitken, E.H. (2020). Assessing the role of MIF in *Plasmodium spp.* infections using *ex vivo* models. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2080, 185–192.
- Akter, S., Huang, J., Bodra, N., De Smet, B., Wahni, K., Rombaut, D., Pauwels, J., Gevaert, K., Carroll, K., Van Breusegem, F., and Messens, J. (2015). DYN-2 based identification of *Arabidopsis* sulfenomes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 14, 1183–1200.
- Akter, S., Carpentier, S., Van Breusegem, F., and Messens, J. (2016). Identification of dimedone-trapped sulfenylated proteins in plants under stress. *Biochem. Biophys. Rep.* 9, 106–113.
- Akter, S., Fu, L., Jung, Y., Conte, M.L., Lawson, J.R., Lowther, W.T., Sun, R., Liu, K., Yang, J., and Carroll, K.S. (2018). Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase. *Nat. Chem. Biol.* 14, 995–1004.
- Alam, A., Goyal, M., Iqbal, Mohd.S., Bindu, S., Dey, S., Pal, C., Maity, P., Mascarenhas, N.M., Ghoshal, N., and Bandyopadhyay, U. (2011). Cysteine-3 and cysteine-4 are essential for the thioredoxin-like oxidoreductase and antioxidant activities of *Plasmodium falciparum* macrophage migration inhibitory factor. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1659–1668.
- Alam, A., Haldar, S., Thulasiram, H.V., Kumar, R., Goyal, M., Iqbal, M.S., Pal, C., Dey, S., Bindu, S., Sarkar, S., Pal, U., Maiti, N.C., and Bandyopadhyay, U. (2012). Novel anti-inflammatory activity of epoxyazadiradione against macrophage migration inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* 287, 24844–24861.
- Alam, A., Neyaz, Md.K., and Hasan, S.I. (2014). Exploiting unique structural and functional properties of malarial glycolytic enzymes for antimalarial drug development. *Malar. Res. Treat.* 2014, 451065.
- Alam, M.M., Solyakov, L., Bottrill, A.R., Flueck, C., Siddiqui, F.A., Singh, S., Mistry, S., Viskaduraki, M., Lee, K., Hopp, C.S., Chitnis, C.E., Doerig, C., Moon, R.W., Green, J.L., Holder, A.A., Baker, D.A., and Tobin, A.B. (2015). Phosphoproteomics reveals malaria parasite Protein Kinase G as a signalling hub regulating egress and invasion. *Nat. Commun.* 6, 7285.
- Alampour-Rajabi, S., El Bounkari, O., Rot, A., Müller-Newen, G., Bachelier, F., Gawaz, M., Weber, C., Schober, A., and Bernhagen, J. (2015). MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J* 29, 4497–4511.
- Allison, W.S. (1976). Formation and reactions of sulfenic acids in proteins. *Acc. Chem. Res.* 9, 293–299.
- Aquilano, K., Baldelli, S., and Ciriolo, M.R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* 5, 196.
- Ashley, E.A., Pyae Phyo, A., and Woodrow, C.J. (2018). Malaria. *The Lancet* 391, 1608–1621.
- Augustijn, K.D., Kleemann, R., Thompson, J., Kooistra, T., Crawford, C.E., Reece, S.E., Pain, A., Siebum, A.H.G., Janse, C.J., and Waters, A.P. (2007). Functional characterization of the *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* homologues of macrophage migration inhibitory factor. *Infect. Immun.* 75, 1116–1128.

- Awandare, G.A., Hittner, J.B., Kreamsner, P.G., Ochiel, D.O., Keller, C.C., Weinberg, J.B., Clark, I.A., and Perkins, D.J. (2006). Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 119, 219–225.
- Awandare, G.A., Ouma, Y., Ouma, C., Were, T., Otieno, R., Keller, C.C., Davenport, G.C., Hittner, J.B., Vulule, J., Ferrell, R., Ong'echa, J.M., and Perkins, D.J. (2007). Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. *Infect. Immun.* 75, 201–210.
- Baeza Garcia, A., Siu, E., Sun, T., Exler, V., Brito, L., Hekele, A., Otten, G., Augustijn, K., Janse, C.J., Ulmer, J.B., Bernhagen, J., Fikrig, E., Geall, A., and Bucala, R. (2018). Neutralization of the *Plasmodium*-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection. *Nat. Commun.* 9, 2714.
- Bahl, A., Brunk, B., Crabtree, J., Fraunholz, M.J., Gajria, B., Grant, G.R., Ginsburg, H., Gupta, D., Kissinger, J.C., Labo, P., Li, L., Mailman, M.D., Milgram, A.J., Pearson, D.S., Roos, D.S., Schug, J., Stoeckert, C.J., and Whetzel, P. (2003). PlasmoDB: the *Plasmodium* genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Res.* 31, 212–215.
- Bar-Peled, L., Kemper, E.K., Suci, R.M., Vinogradova, E.V., Backus, K.M., Horning, B.D., Paul, T.A., Ichu, T.-A., Svensson, R.U., Olucha, J., Chang, M.W., Kok, B.P., Zhou, Z., Ihle, N., Dix, M.M., Jiang, P., Hayward, M.M., Saez, E., Shaw, R.J., and Cravatt, B.F. (2017). Chemical proteomics identifies druggable vulnerabilities in a genetically defined cancer. *Cell* 171, 696–709.e23.
- Bates, J.N. (1992). Nitric oxide measurement by chemiluminescence detection. *Neuroprotocols* 1, 141–149.
- Becker, K., Kanzok, S.M., Iozef, R., Fischer, M., Schirmer, R.H., and Rahlfs, S. (2003a). Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites. *Eur. J. Biochem.* 270, 1057–1064.
- Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C., and Schirmer, R.H. (2003b). Glutathione – Functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.* 384, 551–566.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S., and Ginsburg, H. (2004). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 34, 163–189.
- Bedhomme, M., Adamo, M., Marchand, C.H., Couturier, J., Rouhier, N., Lemaire, S.D., Zaffagnini, M., and Trost, P. (2012). Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins in vitro. *Biochem. J.* 445, 337–347.
- Beedle, A.E.M., Lynham, S., and Garcia-Manyes, S. (2016). Protein S-sulfenylation is a fleeting molecular switch that regulates non-enzymatic oxidative folding. *Nat. Commun.* 7, 12490.
- Beer, S.M., Taylor, E.R., Brown, S.E., Dahm, C.C., Costa, N.J., Runswick, M.J., and Murphy, M.P. (2004). Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of

mitochondrial membrane thiol proteins: Implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* 279, 47939–47951.

Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., Corpas, F.J., and Barroso, J.B. (2016). Protein S-nitrosylation and S-glutathionylation as regulators of redox homeostasis during abiotic stress response. In *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*, D.K. Gupta, J.M. Palma, and F.J. Corpas, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 365–386.

Belcastro, E., Gaucher, C., Corti, A., Leroy, P., Lartaud, I., and Pompella, A. (2017). Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: processes and targets in cardiovascular pathophysiology. *Biol. Chem.* 398, 1267–1293.

Bendrat, K., Al-Abed, Y., Callaway, D.J.E., Peng, T., Calandra, T., Metz, C.N., and Bucala, R. (1997). Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* 36, 15356–15362.

Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zerneck, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., and Weber, C. (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* 13, 587–596.

Bhisutthibhan, J., Philbert, M.A., Fujioka, H., Aikawa, M., and Meshnick, S.R. (1999). The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 665–670.

Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M.B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984.

Boddey, J.A., and Cowman, A.F. (2013). *Plasmodium* nesting: Remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 243–269.

Bousema, T., and Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 377–410.

Bozza, M.T., Martins, Y.C., Carneiro, L.A.M., and Paiva, C.N. (2012). Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections. *J. Parasitol. Res.* 2012, 413052.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Bruckbauer, S.T., Minkoff, B.B., Yu, D., Cryns, V.L., Cox, M.M., and Sussman, M.R. (2020). Ionizing radiation-induced proteomic oxidation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Proteomics* 19, 1375–1395.

Bucala, R., and Geall, A. (2021). United States Patent Application: 0210030859 - Uses of parasite macrophage migration inhibitory factors.

Bui, V.-M., Lu, C.-T., Ho, T.-T., and Lee, T.-Y. (2016). MDD-SOH: exploiting maximal dependence decomposition to identify S-sulfenylation sites with substrate motifs. *Bioinformatics* 32, 165–172.

- Calandra, T., and Bucala, R. (2017). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* *37*, 359–370.
- Calandra, T., and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 791–800.
- Chaiyaroj, S.C., Rutta, A.S.M., Muenthaisong, K., Watkins, P., Na Ubol, M., and Looareesuwan, S. (2004). Reduced levels of transforming growth factor- β 1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta Trop.* *89*, 319–327.
- Charles, R.L., Schröder, E., May, G., Free, P., Gaffney, P.R.J., Wait, R., Begum, S., Heads, R.J., and Eaton, P. (2007). Protein sulfenation as a redox sensor: Proteomics studies using a novel biotinylated dimedone analogue. *Mol. Cell. Proteomics* *6*, 1473–1484.
- Chatterjee, S. (2016). Chapter two - Oxidative stress, inflammation, and disease. In *Oxidative Stress and Biomaterials*, T. Dziubla, and D.A. Butterfield, eds. (Cambridge: Academic Press), pp. 35–58.
- Chaudhari, R., Sharma, S., and Patankar, S. (2017). Glutathione and thioredoxin systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: Partners in crime? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *488*, 95–100.
- Chung, H.S., Sheng-Bing, W., Venkatraman Vidya, Murray Christopher I., and Van Eyk Jennifer E. (2013). Cysteine oxidative posttranslational modifications. *Circ. Res.* *112*, 382–392.
- Cobbold, S.A., Santos, J.M., Ochoa, A., Perlman, D.H., and Llinás, M. (2016). Proteome-wide analysis reveals widespread lysine acetylation of major protein complexes in the malaria parasite. *Sci. Rep.* *6*, 19722.
- Cociorva, D., Tabb, D.L., and Yates, J.R. (2006). Validation of tandem mass spectrometry database search results using DTASelect. *Curr. Protoc. Bioinforma.* *16*, 13.4.1-13.4.14.
- Conrad, M.D., and Rosenthal, P.J. (2019). Antimalarial drug resistance in Africa: the calm before the storm? *Lancet Infect. Dis.* *19*, e338–e351.
- Cordery, D.V., Kishore, U., Kyes, S., Shafi, M.J., Watkins, K.R., Williams, T.N., Marsh, K., and Urban, B.C. (2007). Characterisation of *Plasmodium falciparum* macrophage migration inhibitory factor homologue. *J. Infect. Dis.* *195*, 905–912.
- Cowman, A.F., Healer, J., Marapana, D., and Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and disease. *Cell* *167*, 610–624.
- Cox, F.E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* *3*, 5.
- Dahlgren, M.K., Garcia, A.B., Hare, A.A., Tirado-Rives, J., Leng, L., Bucala, R., and Jorgensen, W.L. (2012). Virtual screening and optimization yield low-nanomolar inhibitors of the tautomerase activity of *Plasmodium falciparum* macrophage migration inhibitory factor. *J. Med. Chem.* *55*, 10148–10159.

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., and Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 883–898.
- David, J.R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *56*, 72–77.
- Deng, J.-R., Chung, S.-F., Leung, A.S.-L., Yip, W.-M., Yang, B., Choi, M.-C., Cui, J.-F., Kung, K.K.-Y., Zhang, Z., Lo, K.-W., Leung, Y.-C., and Wong, M.-K. (2019). Chemoselective and photocleavable cysteine modification of peptides and proteins using isoxazoliniums. *Commun. Chem.* *2*, 1–10.
- Deponte, M., Rahlfs, S., and Becker, K. (2007). Peroxiredoxin systems of protozoal parasites. *Subcell. Biochem.* *44*, 219–229.
- Devarie-Baez, N.O., Silva Lopez, E.I., and Furdui, C.M. (2016). Biological chemistry and functionality of protein sulfenic acids and related thiol modifications. *Free Radic. Res.* *50*, 172–194.
- de Dios Rosado, J., and Rodriguez-Sosa, M. (2011). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A key player in protozoan infections. *Int. J. Biol. Sci.* *7*, 1239–1256.
- Dobson, S.E., Augustijn, K.D., Brannigan, J.A., Schnick, C., Janse, C.J., Dodson, E.J., Waters, A.P., and Wilkinson, A.J. (2009). The crystal structures of macrophage migration inhibitory factor from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *18*, 2578–2591.
- Egan, T.J., Combrinck, J.M., Egan, J., Hearne, G.R., Marques, H.M., Ntenti, S., Sewell, B.T., Smith, P.J., Taylor, D., van Schalkwyk, D.A., and Walden, J.C. (2002). Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* *365*, 343–347.
- Egea, L., Aguilera, L., Giménez, R., Sorolla, M.A., Aguilar, J., Badía, J., and Baldoma, L. (2007). Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 1190–1203.
- Elgass, K.D., Creed, S.J., and Rudloff, I. (2020). Microscopy methods for imaging MIF and its interaction partners. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *2080*, 93–114.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 820–832.
- Farr, L., Ghosh, S., and Moonah, S. (2020). Role of MIF cytokine/CD74 receptor pathway in protecting against injury and promoting repair. *Front. Immunol.* *11*, 1273.
- Fernandes, A.A.M., de Moura Carvalho, L.J., Zanini, G.M., da Silva Ventura, A.M.R., Souza, J.M., Cotias, P.M., Silva-Filho, I.L., and Daniel-Ribeiro, C.T. (2008). Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* *15*, 650–658.
- Fingerle-Rowson, G., Kaleswarapu, D.R., Schlander, C., Kabgani, N., Brocks, T., Reinart, N., Busch, R., Schütz, A., Lue, H., Du, X., Liu, A., Xiong, H., Chen, Y., Nemajerova, A., Hallek, M., Bernhagen, J., Leng, L., and Bucala, R. (2009). A tautomerase-null macrophage migration-

- inhibitory factor (MIF) gene knock-in mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1922–1932.
- Forrester, M.T., Foster, M.W., Benhar, M., and Stamler, J.S. (2009). Detection of protein S-nitrosylation with the biotin switch technique. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 119–126.
- Fu, L., Liu, K., Sun, M., Tian, C., Sun, R., Morales Betanzos, C., Tallman, K.A., Porter, N.A., Yang, Y., Guo, D., Liebler, D.C., and Yang, J. (2017). Systematic and quantitative assessment of hydrogen peroxide reactivity with cysteines across human proteomes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **16**, 1815–1828.
- Fu, L., Liu, K., Ferreira, R.B., Carroll, K.S., and Yang, J. (2019). Proteome-wide analysis of cysteine S-sulfenylation using a benzothiazine-based probe. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **95**, e76.
- Fu, X., Kassim, S.Y., Parks, W.C., and Heinecke, J.W. (2001). Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of Pro-matrilysin (MMP-7) - A mechanism for matrix metalloproteinase activation and arteriosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 41279–41287.
- Fukuzawa, J., Nishihira, J., Hasebe, N., Haneda, T., Osaki, J., Saito, T., Nomura, T., Fujino, T., Wakamiya, N., and Kikuchi, K. (2002). Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 24889–24895.
- Galardon, E., and Padovani, D. (2015). Reactivity of persulfides toward strained bicyclo[6.1.0]nonyne derivatives: Relevance to chemical tagging of proteins. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1013–1016.
- Ghazanfari, N., Mueller, S.N., and Heath, W.R. (2018). Cerebral malaria in mouse and man. *Front. Immunol.* **9**, 2016.
- Ghosh, S., Jiang, N., Farr, L., Ngoben, R., and Moonah, S. (2019). Parasite-produced MIF cytokine: Role in immune evasion, invasion, and pathogenesis. *Front. Immunol.* **10**, 1995.
- Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J., and Krugliak, M. (1998). Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 1305–1313.
- Gould, N.S., Evans, P., Martinez-Acedo, P., Marino, S.M., Gladyshev, V.N., Carroll, K.S., and Ischiropoulos, H. (2015). Site-specific proteomic mapping identifies selectively modified regulatory cysteine residues in functionally distinct protein networks. *Chem. Biol.* **22**, 965–975.
- Gupta, V., and Carroll, K.S. (2014). Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 847–875.
- Gupta, V., Yang, J., Liebler, D.C., and Carroll, K.S. (2017). Diverse redoxome reactivity profiles of carbon nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 5588–5595.
- Hamann, M., Zhang, T., Hendrich, S., and Thomas, J.A. (2002). Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. *Methods Enzymol.* **348**, 146–156.

- Han, C., Lin, Y., Shan, G., Zhang, Z., Sun, X., Wang, Z., Wei, C., Deng, Y., Zhang, L., Bu, L., Shao, D., and Wang, H. (2010). Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity. *Clin. Vaccine Immunol.* *17*, 1524–1532.
- Han, Z., Shao, D., and Wang, H. (2004). Cloning and expression of a homologue of human macrophage migration inhibitory factor from *P. falciparum* 3D7. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* *26*, 515–518.
- Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., and Sawa, A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* *7*, 665–674.
- Harwaldt, P., Rahlfs, S., and Becker, K. (2002). Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: Characterization of a potential drug target. *Biol. Chem.* *383*, 821–830.
- Hawkins, C.L., and Davies, M.J. (2019). Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J. Biol. Chem.* *294*, 19683–19708.
- Healy, Z.R., Liu, H., Holtzclaw, W.D., and Talalay, P. (2011). Inactivation of tautomerase activity of macrophage migration inhibitory factor by sulforaphane: A potential biomarker for anti-inflammatory intervention. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 1516–1523.
- Hening Lin and Kate S. Caroll (2018). Introduction: Posttranslational protein modification. *Chem. Rev.* *118*, 887–888.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 150–166.
- Hildebrandt, T., Knesting, J., Berndt, C., Morgan, B., and Scheibe, R. (2015). Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? *Biol. Chem.* *396*, 523–537.
- Holmgren, A. (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* *254*, 9627–9632.
- Hoshi, T., and Heinemann, S.H. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol.* *531*, 1–11.
- Huang, J., Willems, P., Van Breusegem, F., and Messens, J. (2018). Pathways crossing mammalian and plant sulfenomic landscapes. *Free Radic. Biol. Med.* *122*, 193–201.
- Huang, J., Willems, P., Wei, B., Tian, C., Ferreira, R.B., Bodra, N., Gache, S.A.M., Wahni, K., Liu, K., Vertommen, D., Gevaert, K., Carroll, K.S., Montagu, M.V., Yang, J., Breusegem, F.V., and Messens, J. (2019). Mining for protein S-sulfenylation in *Arabidopsis* uncovers redox-sensitive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *116*, 21256–21261.
- Huang, W.-S., Duan, L.-P., Huang, B., Wang, K.-J., Zhang, C.-L., Jia, Q.-Q., Nie, P., and Wang, T. (2016). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) family in arthropods: Cloning

- and expression analysis of two MIF and one D-dopachrome tautomerase (DDT) homologues in mud crabs, *Scylla paramamosain*. *Fish Shellfish Immunol.* *50*, 142–149.
- Ishii, T., Warabi, E., and Yanagawa, T. (2012). Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* *50*, 91–105.
- Jain, V., McClintock, S., Nagpal, A.C., Dash, A.P., Stiles, J.K., Udhayakumar, V., Singh, N., and Lucchi, N.W. (2009). Macrophage migration inhibitory factor is associated with mortality in cerebral malaria patients in India. *BMC Res. Notes* *2*, 36.
- Jones, M.L., Collins, M.O., Goulding, D., Choudhary, J.S., and Rayner, J.C. (2012). Analysis of protein palmitoylation reveals a pervasive role in *Plasmodium* development and pathogenesis. *Cell Host Microbe* *12*, 246–258.
- Jortzik, E., and Becker, K. (2012). Thioredoxin and glutathione systems in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Med. Microbiol.* *302*, 187–194.
- Jortzik, E., Wang, L., and Becker, K. (2011). Thiol-based posttranslational modifications in parasites. *Antioxid. Redox Signal.* *17*, 657–673.
- Jung, H., Kim, T., Chae, H.Z., Kim, K.-T., and Ha, H. (2001). Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction. *J. Biol. Chem.* *276*, 15504–15510.
- Kalinina, E.V., Chernov, N.N., and Novichkova, M.D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochem. Mosc.* *79*, 1562–1583.
- Kamir, D., Zierow, S., Leng, L., Cho, Y., Diaz, Y., Griffith, J., McDonald, C., Merk, M., Mitchell, R.A., Trent, J., Chen, Y., Kwong, Y.-K.A., Xiong, H., Vermeire, J., Cappello, M., McMahon-Pratt, D., Walker, J., Bernhagen, J., Lolis, E., and Bucala, R. (2008). A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 8250–8261.
- Kanzok, S.M., Schirmer, R.H., Türbachova, I., Iozef, R., and Becker, K. (2000). The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. *J. Biol. Chem.* *275*, 40180–40186.
- Kehr, S., Sturm, N., Rahlfs, S., Przyborski, J.M., and Becker, K. (2010). Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLoS Pathog.* *6*, e1001242.
- Kehr, S., Jortzik, E., Delahunty, C., Yates, J.R., Rahlfs, S., and Becker, K. (2011). Protein S-glutathionylation in malaria parasites. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 2855–2865.
- Khan, S., Parrillo, M., Gutierrez, A.H., Terry, F.E., Moise, L., Martin, W.D., and De Groot, A.S. (2020). Immune escape and immune camouflage may reduce the efficacy of RTS,S vaccine in Malawi. *Hum. Vaccines Immunother.* *16*, 214–227.
- Kim, G., Weiss, S.J., and Levine, R.L. (2014). Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 901–905.

- Kleemann, R., Mischke, R., Kapurniotu, A., Brunner, H., and Bernhagen, J. (1998a). Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes. *FEBS Lett.* **430**, 191–196.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R.W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Jüttner, S., Brunner, H., and Bernhagen, J. (1998b). Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase1. *J. Mol. Biol.* **280**, 85–102.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Mischke, R., Held, J., and Bernhagen, J. (1999). Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF. *Eur. J. Biochem.* **261**, 753–766.
- Klomsiri, C., Nelson, K.J., Bechtold, E., Soito, L., Johnson, L.C., Lowther, W.T., Ryu, S.-E., King, S.B., Furdui, C.M., and Poole, L.B. (2010). Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection: Evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins. *Methods Enzymol.* **473**, 77–94.
- Klomsiri, C., Rogers, L.C., Soito, L., McCauley, A.K., King, S.B., Nelson, K.J., Poole, L.B., and Daniel, L.W. (2014). Endosomal H₂O₂ production leads to localized cysteine sulfenic acid formation on proteins during lysophosphatidic acid-mediated cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **71**, 49–60.
- Koncarevic, S., Rohrbach, P., Deponte, M., Krohne, G., Prieto, J.H., Yates, J., Rahlfs, S., and Becker, K. (2009). The malarial parasite *Plasmodium falciparum* imports the human protein peroxiredoxin 2 for peroxide detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13323–13328.
- Kontos, C., El Bounkari, O., Krammer, C., Sinitski, D., Hille, K., Zan, C., Yan, G., Wang, S., Gao, Y., Brandhofer, M., Megens, R.T.A., Hoffmann, A., Pauli, J., Asare, Y., Gerra, S., Bourilhon, P., Leng, L., Eckstein, H.-H., Kempf, W.E., Pelisek, J., Gokce, O., Maegdefessel, L., Bucala, R., Dichgans, M., Weber, C., Kapurniotu, A., and Bernhagen, J. (2020). Designed CXCR4 mimic acts as a soluble chemokine receptor that blocks atherogenic inflammation by agonist-specific targeting. *Nat. Commun.* **11**, 5981.
- Krammer, C., Kontos, C., Dewor, M., Hille, K., Dalla Volta, B., El Bounkari, O., Taş, K., Sinitski, D., Brandhofer, M., Megens, R.T.A., Weber, C., Schultz, J.R., Bernhagen, J., and Kapurniotu, A. (2020). A MIF-derived cyclopeptide that inhibits MIF binding and atherogenic signaling via the chemokine receptor CXCR2. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **22**, 1012–1019.
- Krauss, I.R., Ferraro, G., Pica, A., Márquez, J.A., Helliwell, J.R., and Merlino, A. (2017). Principles and methods used to grow and optimize crystals of protein–metalloidrug adducts, to determine metal binding sites and to assign metal ligands. *Metallomics* **9**, 1534–1547.
- Lacy, M., Kontos, C., Brandhofer, M., Hille, K., Gröning, S., Sinitski, D., Bourilhon, P., Rosenberg, E., Krammer, C., Thavayogarah, T., Pantouris, G., Bakou, M., Weber, C., Lolis, E., Bernhagen, J., and Kapurniotu, A. (2018). Identification of an Arg-Leu-Arg tripeptide that contributes to the binding interface between the cytokine MIF and the chemokine receptor CXCR4. *Sci. Rep.* **8**, 5171.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lee, K.-S., Cox-Singh, J., and Singh, B. (2009). Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malar. J.* **8**, 73.

- Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (2003). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* *197*, 1467–1476.
- Li, R., Klockenbusch, C., Lin, L., Jiang, H., Lin, S., and Kast, J. (2016). Quantitative protein sulfenic acid analysis identifies platelet releasate-induced activation of integrin $\beta 2$ on monocytes via NADPH oxidase. *J. Proteome Res.* *15*, 4221–4233.
- Liang, X., Kaya, A., Zhang, Y., Le, D.T., Hua, D., and Gladyshev, V.N. (2012). Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins. *BMC Biochem.* *13*, 21.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., and Durner, J. (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *137*, 921–930.
- Liu, J., Shao, D., Lin, Y., Luo, M., Wang, Z., Yao, M., Hao, X., Wei, C., Gao, Y., Deng, W., and Wang, H. (2016). PyMIF enhances the inflammatory response in a rodent model by stimulating CD11b(+) Ly6C(+) cells accumulation in spleen. *Parasite Immunol.* *38*, 377–383.
- Liu, X.P., Liu, X.Y., Zhang, J., Xia, Z.L., Liu, X., Qin, H.J., and Wang, D.W. (2006). Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Res.* *16*, 287–296.
- Lo Conte, M., and Carroll, K.S. (2013). The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation. *J. Biol. Chem.* *288*, 26480–26488.
- Lo Conte, M., Lin, J., Wilson, M.A., and Carroll, K.S. (2015). A chemical approach for the detection of protein sulfinylation. *ACS Chem. Biol.* *10*, 1825–1830.
- Loria, P., Miller, S., Foley, M., and Tilley, L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem. J.* *339*, 363–370.
- Lubetsky, J.B., Swope, M., Dealwis, C., Blake, P., and Lolis, E. (1999). Pro-1 of macrophage migration inhibitory factor functions as a catalytic base in the phenylpyruvate tautomerase activity. *Biochemistry* *38*, 7346–7354.
- Lubetsky, J.B., Dios, A., Han, J., Aljabari, B., Ruzsicska, B., Mitchell, R., Lolis, E., and Al-Abed, Y. (2002). The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J. Biol. Chem.* *277*, 24976–24982.
- Luedike, P., Ulrike B. Hendgen-Cotta, Julia Sobierajski, Matthias Totzeck, Marcel Reeh, Dewor Manfred, Lue Hongqi, Krisp Christoph, Wolters Dirk, Kelm Malte, Bernhagen Jürgen, and Rassaf Tienush (2012). Cardioprotection through S-nitrosyl(yl)ation of macrophage migration inhibitory factor. *Circulation* *125*, 1880–1889.
- Marino, S.M., and Gladyshev, V.N. (2012). Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *J. Biol. Chem.* *287*, 4419–4425.
- Martínez-Ruiz, A., and Lamas, S. (2004). S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc. Res.* *62*, 43–52.

- Matsui, R., Ferran, B., Oh, A., Croteau, D., Shao, D., Han, J., Pimentel, D.R., and Bachschmid, M.M. (2020). Redox regulation via glutaredoxin-1 and protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* *32*, 677–700.
- McDevitt, M.A., Xie, J., Shanmugasundaram, G., Griffith, J., Liu, A., McDonald, C., Thuma, P., Gordeuk, V.R., Metz, C.N., Mitchell, R., Keefer, J., David, J., Leng, L., and Bucala, R. (2006). A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J. Exp. Med.* *203*, 1185–1196.
- McDonald, W.H., Tabb, D.L., Sadygov, R.G., MacCoss, M.J., Venable, J., Graumann, J., Johnson, J.R., Cociorva, D., and Yates, J.R. (2004). MS1, MS2, and SQT—three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *18*, 2162–2168.
- McPherson, A., and Cudney, B. (2014). Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* *70*, 1445–1467.
- Menard, D., and Dondorp, A. (2017). Antimalarial drug resistance: A threat to malaria elimination. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *7*, a025619.
- Miller, J.L., Harupa, A., Kappe, S.H.I., and Mikolajczak, S.A. (2012). *Plasmodium yoelii* macrophage migration inhibitory factor is necessary for efficient liver-stage development. *Infect. Immun.* *80*, 1399–1407.
- Minguez, P., Letunic, I., Parca, L., and Bork, P. (2013). PTMcode: a database of known and predicted functional associations between post-translational modifications in proteins. *Nucleic Acids Res.* *41*, 306–311.
- Mischke, R., Kleemann, R., Brunner, H., and Bernhagen, J. (1998). Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett.* *427*, 85–90.
- Miyake, T., Tamaki, R., Asanuma, M., Fukada, Y., Hirota, S., and Matsuo, T. (2020). Regioselective chemical modification of cysteine residues on protein surfaces focusing on local environment around the conjugation site. *Bioconjug. Chem.* *31*, 794–802.
- Mnatsakanyan, R., Markoutsas, S., Walbrunn, K., Roos, A., Verhelst, S.H.L., and Zahedi, R.P. (2019). Proteome-wide detection of S-nitrosylation targets and motifs using bioorthogonal cleavable-linker-based enrichment and switch technique. *Nat. Commun.* *10*, 2195.
- Moldogazieva, N.T., Mokhosev, I.M., Mel'nikova, T.I., Zavadskiy, S.P., Kuz'menko, A.N., and Terentiev, A.A. (2020). Dual character of reactive oxygen, nitrogen, and halogen species: Endogenous sources, interconversions and neutralization. *Biochem. Mosc.* *85*, 56–78.
- Molitor, I.M., Knöbel, S., Dang, C., Spielmann, T., Alléra, A., and König, G.M. (2004). Translation initiation factor eIF-5A from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *137*, 65–74.
- Müller, S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* *53*, 1291–1305.

- Muronetz, V.I., Melnikova, A.K., Barinova, K.V., and Schmalhausen, E.V. (2019). Inhibitors of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and unexpected effects of its reduced activity. *Biochem. Mosc.* *84*, 1268–1279.
- Murphy, E., Kohr, M., Sun, J., Nguyen, T., and Steenbergen, C. (2012). S-nitrosylation: A radical way to protect the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 568–577.
- Murray, C.I., and Van Eyk, J.E. (2012). Chasing cysteine oxidative modifications: Proteomic tools for characterizing cysteine redox-status. *Circ. Cardiovasc. Genet.* *5*, 591.
- Murray, C.I., Kane, L.A., Uhrigshardt, H., Wang, S.-B., and Van Eyk, J.E. (2011). Site-mapping of *in vitro* S-nitrosation in cardiac mitochondria: implications for cardioprotection. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *10*, M110.004721.
- Nelson, K.J., Klomsiri, C., Codreanu, S.G., Soito, L., Liebler, D.C., Rogers, L.C., Daniel, L.W., and Poole, L.B. (2010). Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection: Methods to visualize and identify labeled proteins. *Methods Enzymol.* *473*, 95–115.
- Nguyen, M.T., Lue, H., Kleemann, R., Thiele, M., Tolle, G., Finkelmeier, D., Wagner, E., Braun, A., and Bernhagen, J. (2003a). The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J. Immunol.* *170*, 3337–3347.
- Nguyen, M.T., Beck, J., Lue, H., Fünzig, H., Kleemann, R., Koolwijk, P., Kapurniotu, A., and Bernhagen, J. (2003b). A 16-residue peptide fragment of macrophage migration inhibitory factor, MIF-(50–65), exhibits redox activity and has MIF-like biological functions. *J. Biol. Chem.* *278*, 33654–33671.
- Nickel, C., Rahlfs, S., Deponte, M., Koncarevic, S., and Becker, K. (2006). Thioredoxin networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Antioxid. Redox Signal.* *8*, 1227–1239.
- Niekerk, D.D. van, Penkler, G.P., Toit, F. du, and Snoep, J.L. (2016). Targeting glycolysis in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* *283*, 634–646.
- Nierves, L., and Lange, P.F. (2020). Detectability of biotin tags by LC-MS/MS. *BioRxiv* PRP259653.
- Ouertatani-Sakouhi, H., El-Turk, F., Fauvet, B., Roger, T., Le Roy, D., Karpinar, D.P., Leng, L., Bucala, R., Zweckstetter, M., Calandra, T., and Lashuel, H.A. (2009). A new class of isothiocyanate-based irreversible inhibitors of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* *48*, 9858–9870.
- Oyelade, J., Isewon, I., Rotimi, S., and Okunoren, I. (2016). Modeling of the glycolysis pathway in *Plasmodium falciparum* using petri nets. *Bioinforma. Biol. Insights* *10*, 49–57.
- Pantouris, G., Rajasekaran, D., Garcia, A.B., Ruiz, V.G., Leng, L., Jorgensen, W.L., Bucala, R., and Lolis, E.J. (2014). Crystallographic and receptor binding characterization of *Plasmodium falciparum* macrophage migration inhibitory factor complexed to two potent inhibitors. *J. Med. Chem.* *57*, 8652–8656.
- Pantouris, G., Khurana, L., Ma, A., Skeens, E., Reiss, K., Batista, V.S., Lisi, G.P., and Lolis, E.J. (2020). Regulation of MIF enzymatic activity by an allosteric site at the central solvent channel. *Cell Chem. Biol.* *27*, 740–750.

- Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., and Darley-Usmar, V.M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1411, 385–400.
- Patzewitz, E.-M., Wong, E.H., and Müller, S. (2012). Dissecting the role of glutathione biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 83, 304–318.
- Paulsen, C.E., and Carroll, K.S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem. Rev.* 113, 4633–4679.
- Pe'er, I., Felder, C.E., Man, O., Silman, I., Sussman, J.L., and Beckmann, J.S. (2004). Proteomic signatures: Amino acid and oligopeptide compositions differentiate among phyla. *Proteins* 54, 20–40.
- Peralta, D., Bronowska, A.K., Morgan, B., Dóka, É., Van Laer, K., Nagy, P., Gräter, F., and Dick, T.P. (2015). A proton relay enhances H₂O₂ sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation. *Nat. Chem. Biol.* 11, 156–163.
- Percário, S., Moreira, D.R., Gomes, B.A.Q., Ferreira, M.E.S., Gonçalves, A.C.M., Laurindo, P.S.O.C., Vilhena, T.C., Dolabela, M.F., and Green, M.D. (2012). Oxidative stress in malaria. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16346–16372.
- Perkins, D.J., Were, T., Davenport, G.C., Kempaiah, P., Hittner, J.B., and Ong'echa, J.M. (2011). Severe malarial anemia: Innate immunity and pathogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1427–1442.
- Petterson, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- Philo, J.S., Yang, T.-H., and LaBarre, M. (2004). Re-examining the oligomerization state of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in solution. *Biophys. Chem.* 108, 77–87.
- Ponts, N., Saraf, A., Chung, D.-W.D., Harris, A., Prudhomme, J., Washburn, M.P., Florens, L., and Le Roch, K.G. (2011). Unraveling the ubiquitome of the human malaria parasite. *J. Biol. Chem.* 286, 40320–40330.
- Poole, L.B. (2008). Measurement of protein sulfenic acid content. *Curr. Protoc. Toxicol.* 17, Unit17.2.
- Poole, L.B., and Nelson, K.J. (2008). Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 18–24.
- Poole, T.H., Reisz, J.A., Zhao, W., Poole, L.B., Furdui, C.M., and King, S.B. (2014). Strained cycloalkynes as new protein sulfenic acid traps. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 6167–6170.
- Poreba, M., McGowan, S., Skinner-Adams, T.S., Trenholme, K.R., Gardiner, D.L., Whisstock, J.C., To, J., Salvesen, G.S., Dalton, J.P., and Drag, M. (2012). Fingerprinting the substrate specificity of M1 and M17 aminopeptidases of human malaria, *Plasmodium falciparum*. *PLOS ONE* 7, e31938.

- Prieto, J.H., Koncarevic, S., Park, S.K., Yates, J., III, and Becker, K. (2008). Large-scale differential proteome analysis in *Plasmodium falciparum* under drug treatment. *PLoS ONE* 3, e4098.
- Qiu, W., Dong, A., Pizarro, J.C., Botchkarsev, A., Min, J., Wernimont, A.K., Hills, T., Hui, R., and Artz, J.D. (2012). Crystal structures from the *Plasmodium* peroxiredoxins: new insights into oligomerization and product binding. *BMC Struct. Biol.* 12, 2.
- Rafiei, S., Gui, B., Wu, J., Liu, X.S., Kibel, A.S., and Jia, L. (2019). Targeting the MIF/CXCR7/AKT signaling pathway in castration-resistant prostate cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* 17, 263–276.
- Rahlfs, S., and Becker, K. (2001). Thioredoxin peroxidases of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* 268, 1404–1409.
- Rahlfs, S., Nickel, C., Deponte, M., Schirmer, R.H., and Becker, K. (2003). *Plasmodium falciparum* thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Rep.* 8, 246–250.
- Rajasekaran, D., Gröning, S., Schmitz, C., Zierow, S., Drucker, N., Bakou, M., Kohl, K., Mertens, A., Lue, H., Weber, C., Xiao, A., Luker, G., Kapurniotu, A., Lolis, E., and Bernhagen, J. (2016). Macrophage migration inhibitory factor-CXCR4 receptor interactions. Evidence for partial allosteric agonism in comparison with CXCL12 chemokine. *J. Biol. Chem.* 291, 15881–15895.
- Ramya, T.N.C., Surolia, N., and Surolia, A. (2006). 15-Deoxyspergualin modulates *Plasmodium falciparum* heat shock protein function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 585–592.
- Ranjan, R., Karpurapu, M., Rani, A., Chishti, A.H., and Christman, J.W. (2016). Hemozoin regulates iNOS expression by modulating the transcription factor NF- κ B in macrophages. *Biochem. Mol. Biol. J.* 2, 10.
- Rashdan, N.A., Shrestha, B., and Pattillo, C.B. (2020). S-glutathionylation, friend or foe in cardiovascular health and disease. *Redox Biol.* 37, 101693.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24, 981–990.
- Reddie, K.G., and Carroll, K.S. (2008). Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 746–754.
- Regis, E.G., Barreto-de-Souza, V., Morgado, M.G., Bozza, M.T., Leng, L., Bucala, R., and Bou-Habib, D.C. (2010). Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the plasma of HIV-1-infected patients and in HIV-1-infected cell cultures: a relevant role on viral replication. *Virology* 399, 31–38.
- Reisz, J.A., Bechtold, E., King, S.B., Poole, L.B., and Furdai, C.M. (2013). Thiol-blocking electrophiles interfere with labeling and detection of protein sulfenic acids. *FEBS J.* 280, 6150–6161.

- Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.R., and Kwon, J. (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2000, pe1.
- Rhee, S.G., Jeong, W., Chang, T.-S., and Woo, H.A. (2007). Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int.* 72, S3–S8.
- Richard, D., Bartfai, R., Volz, J., Ralph, S.A., Muller, S., Stunnenberg, H.G., and Cowman, A.F. (2011). A genome-wide chromatin-associated nuclear peroxiredoxin from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 286, 11746–11755.
- Richardson, J.M., Morrison, L.S., Bland, N.D., Bruce, S., Coombs, G.H., Mottram, J.C., and Walkinshaw, M.D. (2009). Structural characterisation of the *Leishmania major* orthologues of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 442–448.
- Rodrigues, D.A.S., Prestes, E.B., Gama, A.M.S., Silva, L. de S., Pinheiro, A.A.S., Ribeiro, J.M.C., Campos, R.M.P., Pimentel-Coelho, P.M., De Souza, H.S., Dicko, A., Duffy, P.E., Fried, M., Francischetti, I.M.B., Saraiva, E.M., Paula-Neto, H.A., and Bozza, M.T. (2020). CXCR4 and MIF are required for neutrophil extracellular trap release triggered by *Plasmodium*-infected erythrocytes. *PLoS Pathog.* 16, e1008230.
- Roos, G., Foloppe, N., and Messens, J. (2012). Understanding the pK_a of redox cysteines: The key role of hydrogen bonding. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 94–127.
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C.N., and Rorsman, H. (1996). The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol. Med.* 2, 143–149.
- Rosengren, E., Åman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Björk, P., Jacobsson, L., and Rorsman, H. (1997). The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett.* 417, 85–88.
- Roth, E.F., Raventos-Suarez, C., Perkins, M., and Nagel, R.L. (1982). Glutathione stability and oxidative stress in *P. falciparum* infection *in vitro*: Responses of normal and G6PD deficient cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 355–362.
- Sachpatzidis, A., Benton, B.K., Manfredi, J.P., Wang, H., Hamilton, A., Dohlman, H.G., and Lolis, E. (2003). Identification of allosteric peptide agonists of CXCR4. *J. Biol. Chem.* 278, 896–907.
- Salsbury, F.R., Knutson, S.T., Poole, L.B., and Fetrow, J.S. (2008). Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 17, 299–312.
- Sarma, G.N., Nickel, C., Rahlfs, S., Fischer, M., Becker, K., and Karplus, A. (2005). Crystal structure of a novel *Plasmodium falciparum* 1-Cys peroxiredoxin. *J. Mol. Biol.* 346, 1021–1034.
- Schiapparelli, L.M., McClatchy, D.B., Liu, H.-H., Sharma, P., Yates, J.R., and Cline, H.T. (2014). Direct detection of biotinylated proteins by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 13, 3966–3978.

- Schindler, L., Dickerhof, N., Hampton, M.B., and Bernhagen, J. (2017). Post-translational regulation of macrophage migration inhibitory factor: Basis for functional fine-tuning. *Redox Biol.* *15*, 135–142.
- Schipper, S. (2015). Detection of protein sulfenylation in malaria parasites using different molecular probes. Masterarbeit.
- Schipper, S., Wu, H., Furdui, C.M., Poole, L.B., Delahunty, C.M., Park, R., Yates, J.R., Becker, K., and Przyborski, J.M. (2021). Identification of sulfenylation patterns in trophozoite stage *Plasmodium falciparum* using a non-dimedone based probe. *Mol. Biochem. Parasitol.* *242*, 111362.
- Schlitzer, M. (2008). Antimalarial drugs – What is in use and what is in the pipeline. *Arch. Pharm. (Weinheim)* *341*, 149–163.
- Seo, Y.H., and Carroll, K.S. (2009). Facile synthesis and biological evaluation of a cell-permeable probe to detect redox-regulated proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *19*, 356–359.
- Shao, D., Han, Z., Lin, Y., Zhang, L., Zhong, X., Feng, M., Guo, Y., and Wang, H. (2008). Detection of *Plasmodium falciparum* derived macrophage migration inhibitory factor homologue in the sera of malaria patients. *Acta Trop.* *106*, 9–15.
- Shao, D., Zhong, X., Zhou, Y.-F., Han, Z., Lin, Y., Wang, Z., Bu, L., Zhang, L., Su, X.-D., and Wang, H. (2010). Structural and functional comparison of MIF ortholog from *Plasmodium yoelii* with MIF from its rodent host. *Mol. Immunol.* *47*, 726–737.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., and Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* *2012*, 217037.
- Shi, Y., and Carroll, K.S. (2020). Activity-based sensing for site-specific proteomic analysis of cysteine oxidation. *Acc. Chem. Res.* *53*, 20–31.
- Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., Noble, P., Knudson, W., and Bucala, R. (2006). CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* *25*, 595–606.
- Sinitski, D., Kontos, C., Krammer, C., Asare, Y., Kapurniotu, A., and Bernhagen, J. (2019a). Macrophage migration inhibitory factor (MIF)-based therapeutic concepts in atherosclerosis and inflammation. *Thromb. Haemost.* *119*, 553–566.
- Sinitski, D., Gruner, K., Brandhofer, M., Kontos, C., Winkler, P., Reinstädler, A., Bourilhon, P., Xiao, Z., Cool, R.H., Kapurniotu, A., Dekker, F.J., Panstruga, R., and Bernhagen, J. (2019b). Cross-kingdom mimicry of the receptor signaling and leukocyte recruitment activity of a human cytokine by its plant orthologs. *J. Biol. Chem.* *295*, 850–867.
- Sirover, M.A. (2011). On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1810*, 741–751.
- Skinner-Adams, T.S., Stack, C.M., Trenholme, K.R., Brown, C.L., Grembecka, J., Lowther, J., Mucha, A., Drag, M., Kafarski, P., McGowan, S., Whisstock, J.C., Gardiner, D.L., and Dalton,

- J.P. (2010). *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials. *Trends Biochem. Sci.* 35, 53–61.
- Sommerville, C., Richardson, J.M., Williams, R.A.M., Mottram, J.C., Roberts, C.W., Alexander, J., and Henriquez, F.L. (2013). Biochemical and immunological characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* 288, 12733–12741.
- Sparkes, A., De Baetselier, P., Roelants, K., De Trez, C., Magez, S., Van Ginderachter, J.A., Raes, G., Bucala, R., and Stijlemans, B. (2017). The non-mammalian MIF superfamily. *Immunobiology* 222, 858–867.
- Springer, E. (2019). Functional characterization of *Plasmodium falciparum* macrophage migration inhibitory factor homologue and its cysteine mutants. Masterarbeit.
- Stamps, S.L., Fitzgerald, M.C., and Whitman, C.P. (1998). Characterization of the role of the amino-terminal proline in the enzymatic activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* 37, 10195–10202.
- Starlets, D., Gore, Y., Binsky, I., Haran, M., Harpaz, N., Shvidel, L., Becker-Herman, S., Berrebi, A., and Shachar, I. (2006). Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 107, 4807–4816.
- Stomberski, C.T., Hess, D.T., and Stamler, J.S. (2019). Protein S-nitrosylation: Determinants of specificity and enzymatic regulation of S-nitrosothiol-based signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 30, 1331–1351.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R., and Heussler, V.T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287–1290.
- Su, H., Na, N., Zhang, X., and Zhao, Y. (2017). The biological function and significance of CD74 in immune diseases. *Inflamm. Res.* 66, 209–216.
- Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., and Lolis, E. (1996). Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5191–5196.
- Sun, J., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2006). S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1693–1705.
- Sun, T., Holowka, T., Song, Y., Zierow, S., Leng, L., Chen, Y., Xiong, H., Griffith, J., Nourai, M., Thuma, P.E., Lolis, E., Janse, C.J., Gordeuk, V.R., Augustijn, K., and Bucala, R. (2012). A *Plasmodium*-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2117–2126.
- Swope, M.D., Sun, H.W., Klockow, B., Blake, P., and Lolis, E. (1998). Macrophage migration inhibitory factor interactions with glutathione and S-hexylglutathione. *J. Biol. Chem.* 273, 14877–14884.
- Sztajer, H., Gamain, B., Aumann, K.D., Slomianny, C., Becker, K., Brigelius-Flohé, R., and Flohé, L. (2001). The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 276, 7397–7403.

- Tabb, D.L., McDonald, W.H., and Yates, J.R. (2002). DTASelect and Contrast: Tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *J. Proteome Res.* 1, 21–26.
- Thiele, M., and Bernhagen, J. (2005). Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1234–1248.
- Thorat, S., Daly, T.M., Bergman, L.W., and Burns, J.M. (2010). Elevated levels of the *Plasmodium yoelii* homologue of macrophage migration inhibitory factor attenuate blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 78, 5151–5162.
- Thuma, P.E., van Dijk, J., Bucala, R., Debebe, Z., Nekhai, S., Kuddo, T., Nourai, M., Weiss, G., and Gordeuk, V.R. (2011). Distinct clinical and immunologic profiles in severe malarial anemia and cerebral malaria in Zambia. *J. Infect. Dis.* 203, 211–219.
- Tizifa, T.A., Kabaghe, A.N., McCann, R.S., van den Berg, H., Van Vugt, M., and Phiri, K.S. (2018). Prevention efforts for malaria. *Curr. Trop. Med. Rep.* 5, 41–50.
- Treffon, P., Liebthal, M., Telman, W., and Dietz, K.-J. (2017). Probing posttranslational redox modifications. In *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*, R. Sunkar, ed. (New York: Springer), pp. 195–219.
- Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J.M., Durán, R., Freeman, B.A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008). Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry* 47, 358–367.
- Tuteja, R. (2007). Malaria – an overview. *FEBS J.* 274, 4670–4679.
- Uversky, V.N. (2013). Posttranslational modification. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, S. Maloy, and K. Hughes, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 425–430.
- Voss, S., Krüger, S., Scherschel, K., Warnke, S., Schwarzl, M., Schrage, B., Girdauskas, E., Meyer, C., Blankenberg, S., Westermann, D., and Lindner, D. (2019). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression increases during myocardial infarction and supports pro-inflammatory signaling in cardiac fibroblasts. *Biomolecules* 9, 38.
- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J.-A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C.N., Nicod, P., and Bucala, R. (1997). Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet β cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4782–4787.
- Wang, L., Delahunty, C., Prieto, J.H., Rahlfs, S., Jortzik, E., Yates, J.R., and Becker, K. (2013). Protein S-nitrosylation in *Plasmodium falciparum*. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 2923–2935.
- Wang, Y., An, R., Umanah, G.K., Park, H., Nambiar, K., Eacker, S.M., Kim, B., Bao, L., Harraz, M.M., Chang, C., Chen, R., Wang, J.E., Kam, T.-I., Jeong, J.S., Xie, Z., Neifert, S., Qian, J., Andrabi, S.A., Blackshaw, S., Zhu, H., Song, H., Ming, G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2016). A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science* 354, aad6872.
- Wani, R., Qian, J., Yin, L., Bechtold, E., King, S.B., Poole, L.B., Paek, E., Tsang, A.W., and Furdui, C.M. (2011). Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10550–10555.

- Wani, R., Nagata, A., and Murray, B.W. (2014). Protein redox chemistry: post-translational cysteine modifications that regulate signal transduction and drug pharmacology. *Front. Pharmacol.* *5*, 224.
- Wany, A., Gupta, A.K., Kumari, A., Gupta, S., Mishra, S., Jaintu, R., Pathak, P.K., and Gupta, K.J. (2016). Chemiluminescence detection of nitric oxide from roots, leaves, and root mitochondria. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1424*, 15–29.
- Waszczak, C., Akter, S., Eeckhout, D., Persiau, G., Wahni, K., Bodra, N., Van Molle, I., De Smet, B., Vertommen, D., Gevaert, K., De Jaeger, G., Van Montagu, M., Messens, J., and Van Breusegem, F. (2014). Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 11545–11550.
- Weber, C., Kraemer, S., Drechsler, M., Lue, H., Koenen, R.R., Kapurniotu, A., Zerneck, A., and Bernhagen, J. (2008). Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16278–16283.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O.A., and Dondorp, A.M. (2014). Malaria. *The Lancet* *383*, 723–735.
- WHO (2020). World malaria report 2020 (Genf: World Health Organization).
- Wilby, K.J., Lau, T.T.Y., Gilchrist, S.E., and Ensom, M.H.H. (2012). Mosquirix (RTS,S): a novel vaccine for the prevention of *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. Pharmacother.* *46*, 384–393.
- Wilson, M.A. (2011). The role of cysteine oxidation in DJ-1 function and dysfunction. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 111–122.
- Wolhuter, K., Whitwell, H.J., Switzer, C.H., Burgoyne, J.R., Timms, J.F., and Eaton, P. (2018). Evidence against stable protein S-nitrosylation as a widespread mechanism of post-translational regulation. *Mol. Cell* *69*, 438–450.
- Wozencraft, A.O., Dockrell, H.M., Taverne, J., Targett, G.A., and Playfair, J.H. (1984). Killing of human malaria parasites by macrophage secretory products. *Infect. Immun.* *43*, 664–669.
- Xu, L., Li, Y., Li, D., Xu, P., Tian, S., Sun, H., Liu, H., and Hou, T. (2015a). Exploring the binding mechanisms of MIF to CXCR2 using theoretical approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *17*, 3370–3382.
- Xu, T., Park, S.K., Venable, J.D., Wohlschlegel, J.A., Diedrich, J.K., Cociorva, D., Lu, B., Liao, L., Hewel, J., Han, X., Wong, C.C.L., Fonslow, B., Delahunty, C., Gao, Y., Shah, H., and Yates III, J.R. (2015b). ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity. *J. Proteomics* *129*, 16–24.
- Yakubu, R.R., Weiss, L.M., and Silmon de Monerri, N.C. (2018). Post-translational modifications as key regulators of apicomplexan biology: insights from proteome-wide studies. *Mol. Microbiol.* *107*, 1–23.
- Yang, D., Shu, T., Zhao, H., Sun, Y., Xu, W., and Tu, G. (2020). Knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF), a novel target to protect neurons from parthanatos induced by simulated post-spinal cord injury oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *523*, 719–725.

- Yang, J., Gupta, V., Carroll, K.S., and Liebler, D.C. (2014). Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells. *Nat. Commun.* *5*, 4776.
- Yang, K.-S., Kang, S.W., Woo, H.A., Hwang, S.C., Chae, H.Z., Kim, K., and Rhee, S.G. (2002). Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J. Biol. Chem.* *277*, 38029–38036.
- Zachgo, S., Hanke, G.T., and Scheibe, R. (2013). Plant cell microcompartments: a redox-signaling perspective. *Biol. Chem.* *394*, 203–216.
- Zaffagnini, M., Morisse, S., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Festa, M., Rouhier, N., Lemaire, S.D., and Trost, P. (2013). Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* *288*, 22777–22789.
- Zapatero, M.C., Pérez, P., Vázquez, M.J., Colmenarejo, G., Frailes, M. de los, and Ramón, F. (2016). Discovery of novel inhibitors of the tautomerase activity of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J. Biomol. Screen.* *21*, 446–458.
- Zhang, D., Devarie-Baez, N.O., Li, Q., Lancaster, J.R., and Xian, M. (2012). Methylsulfonyl benzothiazole (MSBT): A selective protein thiol blocking reagent. *Org. Lett.* *14*, 3396–3399.
- Zhang, J., Ye, Z., Singh, S., Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2018). An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* *120*, 204–216.
- Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.-C., and Yates, J.R. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem. Rev.* *113*, 2343–2394.
- Zivanovic, J., Kouroussis, E., Kohl, J.B., Adhikari, B., Bursac, B., Schott-Roux, S., Petrovic, D., Miljkovic, J.Lj., Thomas-Lopez, D., Jung, Y., Miler, M., Mitchell, S., Milosevic, V., Gomes, J.E., Benhar, M., Gonzalez-Zorn, B., Ivanovic-Burmazovic, I., Torregrossa, R., Mitchell, J.R., Whiteman, M., Schwarz, G., Snyder, S.H., Paul, B.D., Carroll, K.S., and Filipovic, M.R. (2019). Selective persulfide detection reveals evolutionarily conserved antiaging effects of S-sulfhydration. *Cell Metab.* *30*, 1152–1170.

Anhang

```

atg cca tgt tgc gaa gtc atc acg aac gtg aat ctt ccg gat gac aac gtt caa agc act
M P C C E V I T N V N L P D D N V Q S T
ctg tca cag att gag aat gcc atc agt gat gtg atg ggg aaa ccg tta ggc tat atc atg
L S Q I E N A I S D V M G K P L G Y I M
tcc aac tat gac tac cag aag aat ctg cgt ttt gga ggt agc aac gaa gcc tat tgc ttc
S N Y D Y Q K N L R F G G S N E A Y C F
gta cgc att acc tcg att ggt ggc att aat cgg agc aac aat tcg gca ttg gct gat cag
V R I T S I G G I N R S N N S A L A D Q
atc acc aaa ctg ctc gtt agc aat ctg aac gtg aaa tct cgt cgc att tac gtc gaa ttc
I T K L L V S N L N V K S R R I Y V E F
cgc gat tgt agt gcg caa aac ttc gcg ttt tcc ggt tct ctg ttt ggc
R D C S A Q N F A F S G S L F G

```

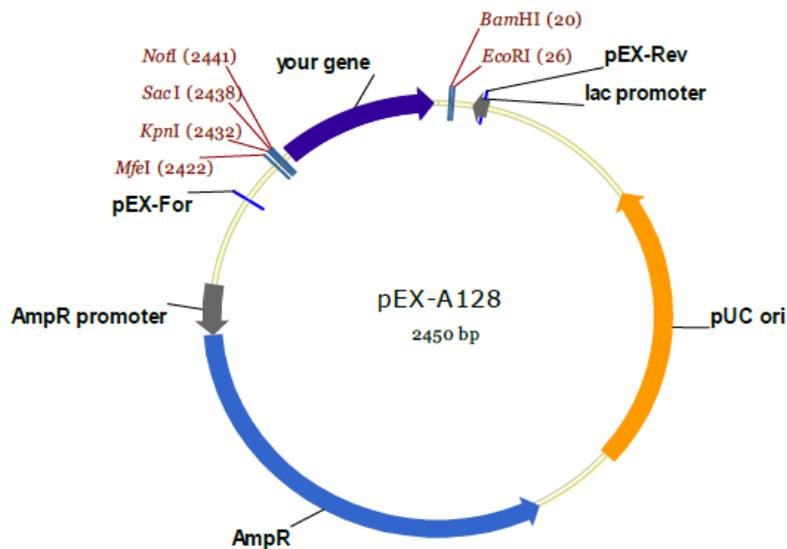
Anhang 1 – Basen- und Aminosäuresequenz coPfMIF

```

atg ccc atg ttc atc gtg aac acg aat gtc cct cgt gca agt gta ccg gat ggt ttc ctc
M P M F I V N T N V P R A S V P D G F L
tcg gag ttg acc cag caa ctg gct caa gcg act ggg aaa cca ccg cag tat atc gcg gtt
S E L T Q Q L A Q A T G K P P Q Y I A V
cat gtg gtt ccg gat cag ctg atg gcg ttt gga ggc tca agt gaa ccg tgt gcc tta tgc
H V V P D Q L M A F G G S S E P C A L C
tcc ctt cac tcg att ggc aag att ggt ggt gct cag aat cgc agc tat agc aaa ctg ctg
S L H S I G K I G G A Q N R S Y S K L L
tgc ggc tta ctg gcg gaa cgt ctg cgc att tct cca gat cgc gtc tac atc aac tac tat
C G L L A E R L R I S P D R V Y I N Y Y
gac atg aat gcc gcc aat gtg ggc tgg aac aac agc acc ttt gca ctc gag acc tgc ttt
D M N A A N V G W N N S T F A L E T C F
tgc tcg ctt gga tcc gaa ttc aaa ggt gaa att gtt atc cgc tca caa ttc cac aca aca
C S L G S E F K G E I V I R S Q F H T T
tac gag ccg gaa gca taa agt gta aag cct
Y E P E A

```

Anhang 2 – Basen- und Aminosäuresequenz cohMIF



Anhang 3 – Plasmidkarte von pEX-A-128 (Eurofins Genomics)

Anhang 4 - Statistik der Rezeptorinteraktion zwischen CXCR2 und MIF

Der Luciferaseassay wurde mittels einfacher Anova und Tukey-Mehrfachvergleichstest ausgewertet. MIF: *macrophage migration inhibitory factor*, Pf: *Plasmodium falciparum*, h: human, C: Cystein, A: Alanin, -: Negativkontrolle (PBS), Glut: PfMIF wurde mit GSSG modifiziert, Nitro: PfMIF wurde mit Cys-NO modifiziert KI: Konfidenzintervall, ns: nicht-signifikant (P-Wert $\geq 0,05$), *: P-Wert 0,1 – 0,05 **: P-Wert 0,001 – 0,01, ***: P-Wert 0,001 – 0,0001, ****: P-Wert $< 0,0001$. Analysiert wurden je 2 Replikaten aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten.

Probenvergleich	Mittelwertdifferenz	95 % KI	Signifikanz
- vs. hMIF	-2,650	-5,463 bis 0,1634	ns
- vs. PfMIF	-13,27	-16,09 bis -10,46	****
- vs. C3A	-4,283	-7,097 bis -1,470	***
- vs. C4A	-4,377	-7,190 bis -1,563	***
- vs. C59A	-9,473	-12,29 bis -6,660	****
- vs. C103A	-15,69	-18,50 bis -12,88	****
- vs. DM	-15,14	-17,95 bis -12,33	****
- vs. Glut	-1,263	-4,077 bis 1,550	ns
- vs. Nitro	-7,853	-10,67 bis -5,040	****
hMIF vs. PfMIF	-10,62	-13,44 bis -7,810	****
hMIF vs. C3A	-1,633	-4,447 bis 1,180	ns
hMIF vs. C4A	-1,727	-4,540 bis 1,087	ns
hMIF vs. C59A	-6,823	-9,637 bis -4,010	****
hMIF vs. C103A	-13,04	-15,85 bis -10,23	****
hMIF vs. DM	-12,49	-15,30 bis -9,677	****
hMIF vs. Glut	1,387	-1,427 bis 4,200	ns
hMIF vs. Nitro	-5,203	-8,017 bis -2,390	****

PfMIF vs. C3A	8,990	6,177 bis 11,80	****
PfMIF vs. C4A	8,897	6,083 bis 11,71	****
PfMIF vs. C59A	3,800	0,9866 bis 6,613	**
PfMIF vs. C103A	-2,417	-5,230 bis 0,3968	ns
PfMIF vs. DM	-1,867	-4,680 bis 0,9468	ns
PfMIF vs. Glut	12,01	9,197 bis 14,82	****
PfMIF vs. Nitro	5,420	2,607 bis 8,233	****
C3A vs. C4A	-0,09333	-2,907 bis 2,720	ns
C3A vs. C59A	-5,190	-8,003 bis -2,377	****
C3A vs. C103A	-11,41	-14,22 bis -8,593	****
C3A vs. DM	-10,86	-13,67 bis -8,043	****
C3A vs. Glut	3,020	0,2066 bis 5,833	*
C3A vs. Nitro	-3,570	-6,383 bis -0,7566	**
C4A vs. C59A	-5,097	-7,910 bis -2,283	****
C4A vs. C103A	-11,31	-14,13 bis -8,500	****
C4A vs. DM	-10,76	-13,58 bis -7,950	****
C4A vs. Glut	3,113	0,2999 bis 5,927	*
C4A vs. Nitro	-3,477	-6,290 bis -0,6632	**
C59A vs. C103A	-6,217	-9,030 bis -3,403	****
C59A vs. DM	-5,667	-8,480 bis -2,853	****
C59A vs. Glut	8,210	5,397 bis 11,02	****
C59A vs. Nitro	1,620	-1,193 bis 4,433	ns
C103A vs. DM	0,5500	-2,263 bis 3,363	ns
C103A vs. Glut	14,43	11,61 bis 17,24	****
C103A vs. Nitro	7,837	5,023 bis 10,65	****
DM vs. Glut	13,88	11,06 bis 16,69	****
DM vs. Nitro	7,287	4,473 bis 10,10	****
Glut vs. Nitro	-6,590	-9,403 bis -3,777	****

Anhang 5 – Statistik der Rezeptorinteraktion zwischen CXCR4 und MIF

Der Luciferaseassay wurde mittels einfacher Anova und Tukey-Mehrfachvergleichstest ausgewertet. MIF: *macrophage migration inhibitory factor*, Pf: *Plasmodium falciparum*, h: human, C: Cystein, A: Alanin, -: Negativkontrolle, Glut: PfMIF wurde mit GSSG modifiziert, Nitro: PfMIF wurde mit Cys-NO modifiziert KI: Konfidenzintervall, ns: nicht-signifikant (P-Wert $\geq 0,05$), *: P-Wert 0,1 – 0,05 **: P-Wert 0,001 – 0,01, ***: P-Wert 0,001 – 0,0001, ****: P-Wert $<0,0001$. Analysiert wurden je 2 Replikaten aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten.

Probenvergleich	Mittelwertdifferenz	95 % KI	Signifikanz
- vs. hMIF	-1,760	-3,502 bis -0,01765	*
- vs. PfMIF	-10,20	-11,94 bis -8,454	****
- vs. C3A	-1,213	-2,956 bis 0,5290	ns
- vs. C4A	-2,920	-4,662 bis -1,178	***
- vs. C59A	-6,177	-7,919 bis -4,434	****

- vs. C103A	-10,33	-12,08 bis -8,591	****
- vs. DM	-9,587	-11,33 bis -7,844	****
- vs. Glut	-0,07667	-1,819 bis 1,666	ns
- vs. Nitro	-5,160	-6,902 bis -3,418	****
hMIF vs. PfMIF	-8,437	-10,18 bis -6,694	****
hMIF vs. C3A	0,5467	-1,196 bis 2,289	ns
hMIF vs. C4A	-1,160	-2,902 bis 0,5824	ns
hMIF vs. C59A	-4,417	-6,159 bis -2,674	****
hMIF vs. C103A	-8,573	-10,32 bis -6,831	****
hMIF vs. DM	-7,827	-9,569 bis -6,084	****
hMIF vs. Glut	1,683	-0,05902 bis 3,426	ns
hMIF vs. Nitro	-3,400	-5,142 bis -1,658	****
PfMIF vs. C3A	8,983	7,241 bis 10,73	****
PfMIF vs. C4A	7,277	5,534 bis 9,019	****
PfMIF vs. C59A	4,020	2,278 bis 5,762	****
PfMIF vs. C103A	-0,1367	-1,879 bis 1,606	ns
PfMIF vs. DM	0,6100	-1,132 bis 2,352	ns
PfMIF vs. Glut	10,12	8,378 bis 11,86	****
PfMIF vs. Nitro	5,037	3,294 bis 6,779	****
C3A vs. C4A	-1,707	-3,449 bis 0,03569	ns
C3A vs. C59A	-4,963	-6,706 bis -3,221	****
C3A vs. C103A	-9,120	-10,86 bis -7,378	****
C3A vs. DM	-8,373	-10,12 bis -6,631	****
C3A vs. Glut	1,137	-0,6057 bis 2,879	ns
C3A vs. Nitro	-3,947	-5,689 bis -2,204	****
C4A vs. C59A	-3,257	-4,999 bis -1,514	****
C4A vs. C103A	-7,413	-9,156 bis -5,671	****
C4A vs. DM	-6,667	-8,409 bis -4,924	****
C4A vs. Glut	2,843	1,101 bis 4,586	***
C4A vs. Nitro	-2,240	-3,982 bis -0,4976	**
C59A vs. C103A	-4,157	-5,899 bis -2,414	****
C59A vs. DM	-3,410	-5,152 bis -1,668	****
C59A vs. Glut	6,100	4,358 bis 7,842	****
C59A vs. Nitro	1,017	-0,7257 bis 2,759	ns
C103A vs. DM	0,7467	-0,9957 bis 2,489	ns
C103A vs. Glut	10,26	8,514 bis 12,00	****
C103A vs. Nitro	5,173	3,431 bis 6,916	****
DM vs. Glut	9,510	7,768 bis 11,25	****
DM vs. Nitro	4,427	2,684 bis 6,169	****
Glut vs. Nitro	-5,083	-6,826 bis -3,341	****

Anhang 6 – MALDI-TOF MS von glutathionyliertem PfMIF

Gezeigt sind nur Peptide, in welchen glutathionylierte Cysteine identifiziert wurden. aa: Position der Aminosäuren des identifizierten Peptids im Protein, XCorr: Kreuzkorrelation.

Sequenz	aa	Modifikation	XCorr (by Search Engine): Sequest HT
K.NLRFGGGSNEAYCFVR.I	48-62	GSSG	3,53 / 3,98 / 3,78
R.FGGGSNEAYCFVR.I	51-62	GSSG	2,93 / 3,89 / 3,93
R.FGGGSNEAYCFVRITSIGGINR.S	51-71	GSSG	5,53 / 5,07 / 4,73
R.DCSAQNFASFSGSLFGLHHHHHHH.-	102-124	GSSG	3,85 / 3,34 / 3,63
R.DCSAQNFASFSGSLFGLHHHHHHH.-	102-124	NO	3,69 / 4,1 / 3,08

Anhang 7 - MALDI-TOF MS von nitrosiertem PfMIF

Gezeigt sind nur Peptide, in welchen nitrosierte Cysteine identifiziert wurden. aa: Position der Aminosäuren des identifizierten Peptids im Protein, XCorr: Kreuzkorrelation.

Sequenz	aa	Modifikation	XCorr (by Search Engine): Sequest HT
K.NLRFGGGSNEAYCFVR.I	48-62	GSSG	3,29 / X / X
R.FGGGSNEAYCFVR.I	51-62	GSSG	3,14 / 3,97 / 3,0
R.FGGGSNEAYCFVRITSIGGINR.S	51-71	GSSG	3,98 / 3,83 / 4,29
R.DCSAQNFASFSGSLFGLHHHHHHH.-	102-124	GSSG	3,86 / 3,71 / 3,77
R.DCSAQNFASFSGSLFGLHHHHHHH.-	102-124	NO	3,45 / 3,52 / 2,91

Anhang 8 - MALDI-TOF MS von glutathionyliertem hMIF

Gezeigt sind nur Peptide, in welchen glutathionylierte Cysteine identifiziert wurden. aa: Position der Aminosäuren des identifizierten Peptids im Protein, XCorr: Kreuzkorrelation.

Sequenz	aa	Modifikation	XCorr (by Search Engine): Sequest HT
R.SYSKLLCGLLAERLR.I	75-89	GSSG	3,35 / X / 3,53
R.SYSKLLCGLLAER.L	75-87	GSSG	X / 2,9 / 3,01

Anhang 9 – Redoxmodifizierte Proteine in *Plasmodium falciparum* Trophozoiten

Zusammenstellung aller in *pull-down* Experimenten mittels Massenspektrometrie identifizierten redoxmodifizierte Proteine (Sulfenylierung (SOH), S-Nitrosierung (SNO), S-Glutathionylierung (GSH)). +: Protein wurde identifiziert, C: als modifiziert identifiziertes Cystein, a: Protein wurde in *pull-down* mit Grx1^{C32S} identifiziert, b: Protein wurde in 1/3 Replikaten identifiziert und zusätzlich in Kontroll *pull-down* mit Grx1^{C32S}. Proteine, welche unspezifisch angereichert wurden, wurden nicht eingeschlossen (Kehr *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2013).

N°	PlasmoDB N°	Proteinname	SOH	SNO	GSH
1	PF3D7_0102200	Ring-infected erythrocyte surface antigen			+ a
2	PF3D7_0104400	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase			+ a, b
3	PF3D7_0105200	RAP protein, putative			+ a
4	PF3D7_0105700	Asparagine-rich antigen Pfa35-2			+

5	PF3D7_0107000	Centrin-1		+	
6	PF3D7_0108000	proteasome subunit beta type-3, putative			+ a
7	PF3D7_0108300	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
8	PF3D7_0109400	Tubulin-specific chaperone a, putative		+	+ a
9	PF3D7_0110500	bromodomain protein, putative			+
10	PF3D7_0110600	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase		+	+
11	PF3D7_0110700	Chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain, putative		+	+ a
12	PF3D7_0110900	adenylate kinase-like protein 1			+
13	PF3D7_0111500	UMP-CMP kinase, putative			+ a, b
14	PF3D7_0112000	TatD-like deoxyribonuclease			+
15	PF3D7_0202600	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
16	PF3D7_0203000	repetitive organellar protein, putative		+	
17	PF3D7_0204500	Aspartate aminotransferase			
18	PF3D7_0206700	Adenylsuccinate lyase			+ a
19	PF3D7_0207600	serine repeat antigen 5	C672	+	+ a
20	PF3D7_0207700	serine repeat antigen 4			+ a
21	PF3D7_0207800	serine repeat antigen 3			+ a, b
22	PF3D7_0209800	ATP-dependent RNA helicase UAP56		+	
23	PF3D7_0210000	secretory complex protein 61 gamma subunit (Sec61-gamma)	C19		
24	PF3D7_0211800	Asparagine-tRNA ligase			+ a
25	PF3D7_0213100	protein SIS1		+	+ a, b
26	PF3D7_0213700	conserved protein, unknown function			+ a
27	PF3D7_0214000	T-complex protein 1, putative	C184 C499		
28	PF3D7_0214100	protein transport protein SEC31 (SEC31)	C309		
29	PF3D7_0214400	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
30	PF3D7_0217900	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
31	PF3D7_0220000	Liver stage antigen 3		+	
32	PF3D7_0302500	cytoadherence linked asexual protein 3.1			+ a
33	PF3D7_0303200	HAD superfamily protein, putative			+
34	PF3D7_0303600	plasmoredoxin			+ a
35	PF3D7_0303700	lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex		+	
36	PF3D7_0305200	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a, b
37	PF3D7_0305600	AP endonuclease (DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase), putative		+	+ a
38	PF3D7_0305700	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative			+ a
39	PF3D7_0306200	activator of Hsp90 ATPase		+	+ a, b
40	PF3D7_0306300	Glutaredoxin 1		+	+ a
41	PF3D7_0306800	T-complex protein 1 subunit beta		+	

42	PF3D7_0307100	40S Ribosomal protein S12, putative		C76	+ a
43	PF3D7_0308200	T-complex protein eta subunit		+	+ a, b
44	PF3D7_0308500	activator of Hsp90 ATPase, putative			+ a
45	PF3D7_0309300	N2227-like protein, putative			+ a
46	PF3D7_0309600	60S Acidic ribosomal protein P2	C12	+	+ a
47	PF3D7_0310400	parasite-infected erythrocyte surface protein			+ a
48	PF3D7_0315100	Translation initiation factor E4			+ a
49	PF3D7_0316300	Inorganic pyrophosphatase, putative			+ a
50	PF3D7_0317000	proteasome subunit alpha type-3, putative	C222		+ a
51	PF3D7_0317300	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
52	PF3D7_0317800	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9, putative		+	+ a
53	PF3D7_0319600	Elongation factor 1 (EF-1), putative		+	+ a
54	PF3D7_0320300	T-complex protein 1 epsilon subunit	C458	+	
55	PF3D7_0320500	nicotinamidase, putative			+ a
56	PF3D7_0320900	histone H2A.Z		+	+ a, b
57	PF3D7_0321600	ATP-dependent RNA helicase DDX42, putative		+	
58	PF3D7_0321800	WD repeat-containing protein, putative	C2321		
59	PF3D7_0322000	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	C69	C168	+ a
60	PF3D7_0323000	translation machinery-associated protein 7, putative			+
61	PF3D7_0323400	Rh5 interacting protein			+ a, b
62	PF3D7_0401800	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function			+ a
63	PF3D7_0405500	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a, b
64	PF3D7_0406100	Vacuolar ATP synthase subunit b		+	
65	PF3D7_0406400	cytosolic glyoxalase II	C4	+	+
66	PF3D7_0410600	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
67	PF3D7_0410900	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
68	PF3D7_0412200	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
69	PF3D7_0413600	26S protease regulatory subunit 6B, putative		+	
70	PF3D7_0413700	lysine decarboxylase-like protein, putative			+ a
71	PF3D7_0413900	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13, putative		+	
72	PF3D7_0417200	Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase		+	+ a
73	PF3D7_0417500	memo-like protein			+
74	PF3D7_0418500	trafficking protein particle complex subunit 3, putative			+ a
75	PF3D7_0419600	ran-specific GTPase-activating protein 1, putative		C100	+ a
76	PF3D7_0422300	alpha tubulin 2	C376		
77	PF3D7_0422400	40S ribosomal protein S19			+ a

78	PF3D7_0422500	pre-mRNA-splicing helicase BRR2, putative			+
79	PF3D7_0424600	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function			+
80	PF3D7_0500800	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen		+	+ a
81	PF3D7_0501200	parasite-infected erythrocyte surface protein			+
82	PF3D7_0501300	Skeleton binding protein 1			+
83	PF3D7_0501500	Rhoptry-associated protein 3, RAP3			+ a, b
84	PF3D7_0501600	Rhoptry-associated protein 2, RAP2			+ a, b
85	PF3D7_0501800	chromosome assembly factor 1			+ a
86	PF3D7_0503400	actin-depolymerizing factor 1			+ a, b
87	PF3D7_0505800	small ubiquitin-related modifier		+	
88	PF3D7_0507600	cell differentiation protein, putative			+ a
89	PF3D7_0507700	nuclear protein localization protein 4, putative			+ a
90	PF3D7_0509100	structural maintenance of chromosomes protein 4, putative			+ a
91	PF3D7_0510100	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+
92	PF3D7_0510200	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase			+
93	PF3D7_0511000	translationally-controlled tumor protein homolog	C14	C14	+
94	PF3D7_0511800	inositol-3-phosphate synthase	C560	+	+ a
95	PF3D7_0512000	prefoldin subunit 6, putative		+	+ a
96	PF3D7_0512200	Glutathione synthetase			+ a
97	PF3D7_0512600	ras-related protein Rab-1B			+ a
98	PF3D7_0512700	Orotate phosphoribosyltransferase			+ a
99	PF3D7_0513300	purine nucleoside phosphorylase	C71 C141 C208	+	+ a
100	PF3D7_0513800	ras-related protein Rab-1A			+ a
101	PF3D7_0514600	ribose-5-phosphate isomerase, putative			+ a, b
102	PF3D7_0515800	BolA-like protein, putative			+ a
103	PF3D7_0516200	40S ribosomal protein S11			+ a
104	PF3D7_0517000	60S Ribosomal protein L12, putative		+	+ a, b
105	PF3D7_0517400	FACT complex subunit SPT16, putative		+	+ a
106	PF3D7_0518300	Proteasome subunit beta type 1, putative		+	+ a
107	PF3D7_0520300	U6 snRNA-associated sm-like protein Lsm2, putative			+
108	PF3D7_0520800	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
109	PF3D7_0520900	adenosylhomocysteinase		+	+ a, b
110	PF3D7_0523000	Multidrug resistance protein 1			+
111	PF3D7_0523100	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative			+
112	PF3D7_0524000	Karyopherin beta	C212 C452	+	
113	PF3D7_0524300	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a

114	PF3D7_0524400	ribosome-interacting GTPase 1, putative			+ a
115	PF3D7_0525100	acyl-CoA synthetase		+	+ a
116	PF3D7_0527000	DNA replication licensing factor MCM3, putative		+	
117	PF3D7_0527100	ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, putative		+	+ a, b
118	PF3D7_0527500	Hsp70 interacting protein	C17 C187	C187	+ a
119	PF3D7_0528700	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		+	
120	PF3D7_0529800	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
121	PF3D7_0532100	Early transcribed membrane protein 5		+	
122	PF3D7_0532300	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function		+	+ a
123	PF3D7_0602200	MYND-type zinc finger protein, putative		C20	+ a, b
124	PF3D7_0603400	trophozoite exported protein 1			+ a
125	PF3D7_0604500	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
126	PF3D7_0605100	RNA-binding protein, putative		+	
127	PF3D7_0606600	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
128	PF3D7_0607000	Translation initiation factor IF-2, putative		+	
129	PF3D7_0608500	Proteasome subunit alpha type 2, putative		+	+ a
130	PF3D7_0608800	Ornithine amino-transferase, OAT	C63	+	+ a
131	PF3D7_0610400	Histone H3		+	
132	PF3D7_0610700	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
133	PF3D7_0610800	Transketolase		+	+ a
134	PF3D7_0611800	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
135	PF3D7_0613800	AP2 domain transcription factor, putative		+	
136	PF3D7_0617200	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
137	PF3D7_0618700	trafficking protein particle complex subunit 6A, putative			+
138	PF3D7_0619400	Cell division cycle protein 48 homologue, putative	C418 + C425 C425 C575	C695	+ a
139	PF3D7_0621200	pyridoxine biosynthesis protein PDX1	C16 C177	+	+ a
140	PF3D7_0621800	Nascent polypeptide associated complex alpha, putative		+	
141	PF3D7_0622800	leucine--tRNA ligase, putative		+	+ a, b
142	PF3D7_0623000	Chorismate synthase			+ a
143	PF3D7_0623100	nuclear polyadenylated RNA-binding protein NAB2, putative		+	
144	PF3D7_0623900	Ribonuclease H2 subunit A, putative			+ a
145	PF3D7_0624000	Hexokinase		+	+ a, b

146	PF3D7_0624600	SNF2 helicase, putative	C147 + C150*	+	
147	PF3D7_0626000	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
148	PF3D7_0626700	conserved protein, unknown function			+
149	PF3D7_0626800	pyruvate kinase	C222 C302 C343 C433	+	+ a, b
150	PF3D7_0627500	protein DJ-1	C85 C106'	+	+ a
151	PF3D7_0628000	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase			+
152	PF3D7_0628200	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase			+ a, b
153	PF3D7_0629100	nicotinate phosphoribosyltransferase, putative			+ a
154	PF3D7_0702500	Plasmodium exported protein, unknown function			+
155	PF3D7_0704200	tRNA m5C-methyltransferase, putative			+ a
156	PF3D7_0704300	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function		+	
157	PF3D7_0704400	Phosphoinositide-binding protein, putative		+	
158	PF3D7_0705400	DNA replication licensing factor MCM7		+	
159	PF3D7_0706000	importin-7, putative		+	
160	PF3D7_0706500	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a, b
161	PF3D7_0707300	Rhoptry-associated membrane antigen		+	
162	PF3D7_0708300	EKC/KEOPS complex subunit BUD32			+
163	PF3D7_0708400	Heat shock protein90	C393 C616	+	+ a
164	PF3D7_0708800	heat shock protein 110	C265 C606	+	+ a
165	PF3D7_0710200	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
166	PF3D7_0711500	regulator of chromosome condensation, putative	C66		
167	PF3D7_0714000	Histone h2b variant			+
168	PF3D7_0714200	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+
169	PF3D7_0714500	Transcription elongation factor s-ii, putative			+ a
170	PF3D7_0716300	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+
171	PF3D7_0716800	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I, putative			+ a
172	PF3D7_0717200	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
173	PF3D7_0717700	serine--tRNA ligase, putative	C247	+	+ a
174	PF3D7_0718500	Prefoldin subunit 3, putative			+ a
175	PF3D7_0719000	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
176	PF3D7_0719700	40S Ribosomal protein S10, putative			+

177	PF3D7_0720400	Ferredoxin reductase-like protein			+ a
178	PF3D7_0721100	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
179	PF3D7_0722400	Obg-like ATPase 1, putative		+	+ a
180	PF3D7_0723700	metallo-hydrolase/oxidoreductase, putative			+ a
181	PF3D7_0723800	conserved Plasmodium protein, unknown function		C947	
182	PF3D7_0727400	Proteasome subunit alpha type 5, putative	C76 C112	+	+ a
183	PF3D7_0728000	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit, putative			+
184	PF3D7_0731600	acyl-CoA synthetase			+ a, b
185	PF3D7_0801800	mannose-6-phosphate isomerase, putative		+	+ a
186	PF3D7_0802000	Glutamate dehydrogenase, putative		+	
187	PF3D7_0802200	1-Cys peroxiredoxin, 1 Cys Prx	C101	C184	+ a
188	PF3D7_0802800	serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit A			+ a, b
189	PF3D7_0803800	Proteasome beta-type 4			+ a
190	PF3D7_0804800	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase			+ a
191	PF3D7_0805700	Serine/threonine protein kinase, FIKK family		+	
192	PF3D7_0807300	ras-related protein Rab-18		+	+ a
193	PF3D7_0807500	proteasome subunit alpha type-6, putative	C172		+ a
194	PF3D7_0807800	26S proteasome regulatory subunit RPN10, putative		+	+ a
195	PF3D7_0808300	Ubiquitin regulatory protein, putative		+	
196	PF3D7_0808400	coatomer subunit epsilon, putative			+
197	PF3D7_0810300	protein phosphatase PPM5, putative			+ a, b
198	PF3D7_0810500	protein phosphatase PPM7, putative			+
199	PF3D7_0810800	hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase	C473		+ a
200	PF3D7_0811400	conserved protein, unknown function	C517		+ a
201	PF3D7_0811500	histone-arginine methyltransferase CARM1, putative			+
202	PF3D7_0811600	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
203	PF3D7_0812400	karyopherin alpha		+	+ a
204	PF3D7_0812500	RNA-binding protein, putative	C182	+	
205	PF3D7_0813200	CS domain protein, putative			+ a, b
206	PF3D7_0813300	conserved Plasmodium protein, unknown function	C61	+	+ a
207	PF3D7_0813400	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
208	PF3D7_0813900	40S ribosomal protein S16, putative		+	
209	PF3D7_0814200	DNA/RNA-binding protein Alba 1		C72	+ a
210	PF3D7_0814900	Fe-superoxide dismutase	C85 C116		+
211	PF3D7_0815600	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G, putative		+	

212	PF3D7_0816100	phosphopantothencycysteine decarboxylase, putative			+ a
213	PF3D7_0816600	chaperone protein ClpB1			+ a
214	PF3D7_0817300	Asparagine-rich antigen		+	+ a
215	PF3D7_0817500	Protein kinase c inhibitor-like protein, putative			+
216	PF3D7_0817900	high mobility group protein B2		+	
217	PF3D7_0818200	14-3-3 Protein	C41	C159	
218	PF3D7_0818900	Heat shock protein 70	C28 C583	+	
219	PF3D7_0820700	2-Oxoglutarate dehydrogenase e1 component			+
220	PF3D7_0821400	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
221	PF3D7_0823100	RWD domain-containing protein, putative			+ a, b
222	PF3D7_0823200	RNA-binding protein, putative		+	+ a
223	PF3D7_0823300	histone acetyltransferase GCN5		+	+ a, b
224	PF3D7_0824600	Fe-S cluster assembly protein DRE2, putative			+
225	PF3D7_0826100	E3 ubiquitin-protein ligase, putative			+
226	PF3D7_0826700	receptor for activated c kinase	C162 C177 C216 C384	+	+ a
227	PF3D7_0827900	protein disulfide isomerase	C384 C387	+	
228	PF3D7_0902800	serine repeat antigen 9			+ a
229	PF3D7_0903200	ras-related protein RAB7		+	+ a
230	PF3D7_0903400	ATP-dependent RNA helicase DDX60, putative			+ a
231	PF3D7_0903700	Alpha tubulin 1	C376	C65	
232	PF3D7_0904100	AP-4 complex subunit epsilon, putative		+	
233	PF3D7_0904500	Prefoldin subunit 4, putative		+	+ a
234	PF3D7_0904600	Ubiquitin-specific protease, putative		+	
235	PF3D7_0904800	replication protein A1, small fragment		+	+
236	PF3D7_0905400	high molecular weight rhoptry protein 3		+	+ a
237	PF3D7_0906500	arginase			+ a, b
238	PF3D7_0906600	zinc finger protein, putative			+ a, b
239	PF3D7_0907600	translation initiation factor SUI1, putative			+ a, b
240	PF3D7_0907700	Subunit of proteasome activator complex, putative			+ a
241	PF3D7_0909400	Exoribonuclease, putative			+ a
242	PF3D7_0909800	small nuclear ribonucleoprotein Sm D3, putative			+ a
243	PF3D7_0911900	Falstatin		+	
244	PF3D7_0913200	elongation factor 1-beta (EF-1beta)		+	+ a
245	PF3D7_0913300	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
246	PF3D7_0914300	Met-10+ like protein, putative			+ a

247	PF3D7_0914400	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
248	PF3D7_0915200	ribonuclease H2 subunit C, putative			+ a
249	PF3D7_0915400	6-Phosphofructokinase	C645 C1038 C1321	C777	+ a
250	PF3D7_0916700	RNA-binding protein musashi, putative		C130	
251	PF3D7_0917600	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP43, putative		C23	+
252	PF3D7_0917900	Heat shock protein 70		+	+ a
253	PF3D7_0918900	Gamma-glutamylcysteine synthetase	C1036 C1038	+	
254	PF3D7_0919000	Nucleosome assembly protein		+	+ a
255	PF3D7_0919400	Protein disulfide isomerase			+ a
256	PF3D7_0920800	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase		+	+ a
257	PF3D7_0921000	Ubiquitin conjugating enzyme E2, putative			+ a
258	PF3D7_0922200	S-adenosylmethionine synthetase, SAMS	C264	C113	+ a
259	PF3D7_0922500	Phosphoglycerate kinase		+	+ a
260	PF3D7_0922600	glutamine synthetase, putative	C66 C346 C479		
261	PF3D7_0923800	thioredoxin reductase (TRXR)	C422		+ a
262	PF3D7_0923900	RNA-binding protein, putative		+	
263	PF3D7_0925900	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
264	PF3D7_0926100	Protein kinase, putative		+	
265	PF3D7_0926700	glutamine-dependent NAD(+) synthetase, putative	C91		+ a
266	PF3D7_0927300	fumarate hydratase, putative			+ a
267	PF3D7_0929200	RNA-binding protein, putative		+	
268	PF3D7_0929400	high molecular weight rhoptry protein 2	C1344	+	+ a
269	PF3D7_0930300	Merozoite surface protein 1	C173	+	+ a
270	PF3D7_0931800	proteasome subunit beta type-6, putative			+ a
271	PF3D7_0932200	profilin		+	
272	PF3D7_0932300	M18 aspartyl aminopeptidase	C226		+ a
273	PF3D7_0934800	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit			+ a
274	PF3D7_0935800	cytoadherence linked asexual protein 9			+ a
275	PF3D7_0936800	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function			+ a
276	PF3D7_1002400	RNA-binding protein, putative		+	+
277	PF3D7_1005600 / PF3D7_1005700	DnaJ protein, putative / peptidase, putative			+
278	PF3D7_1006200	DNA/RNA-binding protein Alba 3		+	+ a, b
279	PF3D7_1006800	single-strand telomeric DNA-binding protein GBP2, putative		+	
280	PF3D7_1007700	transcription factor with AP2 domain(s)		+	+ a
281	PF3D7_1007900	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D, putative		+	+ a

282	PF3D7_1008400	26S proteasome regulatory subunit 4, putative		+	
283	PF3D7_1008700	Tubulin beta chain	C127 C129	+	
284	PF3D7_1008900	Adenylate kinase, AK1		+	
285	PF3D7_1010100	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a, b
286	PF3D7_1010700	dolichyl-phosphate-mannose protein mannosyltransferase, putative		+	+ a
287	PF3D7_1011400	proteasome subunit beta type-5			+ a
288	PF3D7_1011700	DNA repair protein RAD23, putative		C158	+ a, b
289	PF3D7_1011800	PRE-binding protein	C505	+	+ a
290	PF3D7_1012400	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	C134	+	+ a
291	PF3D7_1012500	Phosphoglucomutase, putative			+ a
292	PF3D7_1012600	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]		+	
293	PF3D7_1014600	transcriptional coactivator ADA2		C2364	+ a, b
294	PF3D7_1015200	Cysteine-tRNA ligase, putative		+	+ a
295	PF3D7_1015300	Methionine aminopeptidase 1b, putative			+ a
296	PF3D7_1015600	Hsp60		+	+ a
297	PF3D7_1015800	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative			+
298	PF3D7_1015900	Enolase	C157 C370	+	
299	PF3D7_1016300	Glycophorin-binding protein		+	+
300	PF3D7_1017100	rhoptry neck protein 12		+	
301	PF3D7_1018300	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
302	PF3D7_1020900	ADP-ribosylation factor			+ a
303	PF3D7_1021600	Deoxyribose-phosphate aldolase, putative			+ a
304	PF3D7_1022400	serine/arginine-rich splicing factor 4		+	
305	PF3D7_1023900	chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 homolog, putative	C1375	+	+
306	PF3D7_1026000	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
307	PF3D7_1026800	40S ribosomal protein S2		+	+ a
308	PF3D7_1027300	peroxiredoxin		+	+ a
309	PF3D7_1027700	Centrin-3		+	
310	PF3D7_1027800	60S ribosomal protein L3			+ a
311	PF3D7_1028700	merozoite TRAP-like protein (MTRAP)	C47		
312	PF3D7_1029600	Adenosine deaminase	C173 C281	+	+ a
313	PF3D7_1031200	MORN repeat-containing protein 1		+	
314	PF3D7_1033100	S-adenosylmethionine decarboxylase-ornithine decarboxylase		C286	+ a
315	PF3D7_1033400	haloacid dehalogenase-like hydrolase	C92	+	
316	PF3D7_1033700	bromodomain protein 1		+	+ a
317	PF3D7_1034400	Flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase			+ a, b

318	PF3D7_1034900	methionine--tRNA ligase		+	
319	PF3D7_1035000	U2 snRNA/tRNA pseudouridine synthase, putative			+
320	PF3D7_1036900	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a, b
321	PF3D7_1103100	60S acidic ribosomal protein P1, putative	C19		+ a
322	PF3D7_1103700	Casein kinase II beta chain	C122		+ a
323	PF3D7_1104000	phenylalanine--tRNA ligase beta subunit		+	
324	PF3D7_1104400	thioredoxin, putative		+	+ a
325	PF3D7_1105000	Histone H4		+	+ a
326	PF3D7_1105100	Histone H2B			+ a
327	PF3D7_1105600	translocon component PTEX88			+ a
328	PF3D7_1105800	conserved Apicomplexan protein, unknown function		+	+ a
329	PF3D7_1107300	polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative		C27 C1714	+ a
330	PF3D7_1107800	AP2 domain transcription factor, putative			+ a, b
331	PF3D7_1108400	Casein kinase II, alpha subunit			+ a
332	PF3D7_1108600	Endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein		+	+ a
333	PF3D7_1108700	Heat shock protein DnaJ homologue Pfj2			+ a
334	PF3D7_1110400	RNA-binding protein, putative		+	+ a
335	PF3D7_1113400	ubiquitin domain-containing protein DSK2, putative			+ a
336	PF3D7_1113700	Glyoxalase I, Glol			+ a
337	PF3D7_1115300	cysteine proteinase falcipain 2b		C314	+ a
338	PF3D7_1115400	cysteine proteinase falcipain 3	C331	+	+ a
339	PF3D7_1115600	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		+	+
340	PF3D7_1115700	cysteine proteinase falcipain 2a		+	+ a
341	PF3D7_1116700	Dipeptidyl aminopeptidase 1		C56	+ a
342	PF3D7_1117100	deubiquinating/deneddylating enzyme			+ a
343	PF3D7_1117700	GTP-binding nuclear protein ran/tc4		+	
344	PF3D7_1118200	Heat shock protein 90, putative	C556	+	
345	PF3D7_1118300	insulinase, putative	C322 C1364	+	+ a
346	PF3D7_1118400	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative			+ a
347	PF3D7_1119900	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
348	PF3D7_1120000	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+
349	PF3D7_1120100	Phosphoglycerate mutase, putative		+	+ a
350	PF3D7_1120500	tRNA nucleotidyltransferase, putative			+ a, b
351	PF3D7_1121100	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+
352	PF3D7_1121600	exported protein 1			+
353	PF3D7_1123900	splicing factor, putative			+ a
354	PF3D7_1124300	conserved Plasmodium protein, unknown function			+

355	PF3D7_1124600	Ethanolamine kinase	C283	+	+ a
356	PF3D7_1124700	GrpE protein homolog, mitochondrial, putative		+	+ a
357	PF3D7_1125500	small nuclear ribonucleoprotein Sm D1, putative			+
358	PF3D7_1126000	Threonine-tRNA ligase	C428 C589 C767		+ a
359	PF3D7_1127000	protein phosphatase, putative			+
360	PF3D7_1127100	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase			+
361	PF3D7_1128100	prefoldin subunit 5, putative			+ a
362	PF3D7_1129100	parasitophorous vacuolar protein 1		+	+ a
363	PF3D7_1130200	60S ribosomal protein P0		+	+ a
364	PF3D7_1130400	26S Protease subunit regulatory subunit 6a, putative		C240	+
365	PF3D7_1130600	methyltransferase, putative			+ a
366	PF3D7_1131800	oxysterol-binding protein, putative			+
367	PF3D7_1132200	T-complex protein 1 subunit alpha		+	
368	PF3D7_1132300	Nucleic acid binding protein, putative		+	
369	PF3D7_1132900	glycine cleavage system H protein			+
370	PF3D7_1133200	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
371	PF3D7_1134000	Heat shock protein 70		+	+ a
372	PF3D7_1134100	protein disulfide isomerase			+ a
373	PF3D7_1135100	protein phosphatase PPM8, putative			+ a, b
374	PF3D7_1136500	Casein kinase 1			+
375	PF3D7_1136600	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
376	PF3D7_1138500	Protein phosphatase 2C		+	+
377	PF3D7_1140200	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
378	PF3D7_1142700	methyltransferase, putative			+ a
379	PF3D7_1144000	40S ribosomal protein S21		+	+ a
380	PF3D7_1144500	ubiquitin activating enzyme (E1) subunit Aos1, putative (AOS1)	C297		
381	PF3D7_1147500	protein farnesyltransferase subunit beta			+ a, b
382	PF3D7_1148700	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function			+ a
383	PF3D7_1149000	antigen 332, DBL-like protein		+	+ a
384	PF3D7_1149100	Plasmodium exported protein, unknown function			+ a
385	PF3D7_1201000	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function		+	+
386	PF3D7_1203500	threonylcarbamoyl-AMP synthase, putative			+ a
387	PF3D7_1203700	Nucleosome assembly protein		+	+ a
388	PF3D7_1203900	Ubiquitin-conjugating enzyme E2			+ a, b
389	PF3D7_1204300	Eukaryotic initiation factor 5a	C73	C73 C148	+ a

390	PF3D7_1205600	conserved Plasmodium protein, unknown function	C213	+	+ a
391	PF3D7_1206200	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C, putative		+	
392	PF3D7_1207000	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
393	PF3D7_1209200	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7, putative			+
394	PF3D7_1210300	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
395	PF3D7_1210600	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
396	PF3D7_1211700	DNA replication licensing factor MCM5, putative		+	
397	PF3D7_1211800	polyubiquitin		+	+
398	PF3D7_1211900	non-SERCA-type Ca ²⁺ -transporting P-ATPase			+ a, b
399	PF3D7_1212000	glutathione peroxidase-like thioredoxin peroxidase		+	+ a
400	PF3D7_1213800	proline--tRNA ligase			+ a
401	PF3D7_1215000	thioredoxin peroxidase 2			+ a, b
402	PF3D7_1215300	10 kDa Chaperonin		+	+ a
403	PF3D7_1216200	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative		+	
404	PF3D7_1216900	DNA-binding chaperone, putative			+
405	PF3D7_1217900	PPPDE peptidase domain-containing protein, putative			+ a, b
406	PF3D7_1220900	heterochromatin protein 1			+
407	PF3D7_1222300	Endoplasmin, putative		+	
408	PF3D7_1223100	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit		+	+ a
409	PF3D7_1224000	GTP cyclohydrolase I			+
410	PF3D7_1224300	Polyadenylate-binding protein, putative	C410	C234	+ a
411	PF3D7_1224500	histone chaperone ASF1, putative		+	+ a
412	PF3D7_1225800	Ubiquitin-activating enzyme e1	C641		+ a
413	PF3D7_1226300	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative			+ a
414	PF3D7_1229400	Macrophage migration inhibitory factor	C3 C4	+	+ a
415	PF3D7_1230700	protein transport protein SEC13			+ a
416	PF3D7_1232100	60 kDa chaperonin			+ a
417	PF3D7_1232200	dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial			+ a, b
418	PF3D7_1235300	CCR4-NOT transcription complex subunit 4, putative			+
419	PF3D7_1235500	mRNA methyltransferase, putative			+
420	PF3D7_1235600	Serine hydroxymethyltransferase		+	+ a
421	PF3D7_1235700	ATP synthase subunit beta, mitochondrial		+	+ a
422	PF3D7_1236100	Clustered-asparagine-rich protein		+	+ a
423	PF3D7_1237400	conserved Plasmodium protein, unknown function			+

424	PF3D7_1237500	conserved Plasmodium protein, unknown function		C739	
425	PF3D7_1238100	Calcyclin binding protein, putative			+ a
426	PF3D7_1238800	acyl-CoA synthetase			+ a
427	PF3D7_1239200	AP2 domain transcription factor, putative		C43	+
428	PF3D7_1239800	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
429	PF3D7_1241900	tetratricopeptide repeat protein, putative			+
430	PF3D7_1242800	rab specific GDP dissociation inhibitor	C250		+ a
431	PF3D7_1244600	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, putative			+
432	PF3D7_1244800	cytoplasmic translation machinery associated protein, putative		+	+
433	PF3D7_1246200	Actin I		+	+ a
434	PF3D7_1247400	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP35		+	+ a
435	PF3D7_1248900	26S protease regulatory subunit 8, putative (RPT6)	C391		
436	PF3D7_1249100	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
437	PF3D7_1249300	protein phosphatase PPM4, putative			+
438	PF3D7_1251300	Thymidylate kinase			+ a
439	PF3D7_1252100	rhoptry neck protein 3			+ a, b
440	PF3D7_1302600	deoxyhypusine hydroxylase			+
441	PF3D7_1302800	40S ribosomal protein S7, putative	C23		
442	PF3D7_1304500	Small heat shock protein, putative		+	
443	PF3D7_1306400	26S protease regulatory subunit 10B, putative (RPT4)	C111'		
444	PF3D7_1307200	DnaJ protein, putative		+	
445	PF3D7_1308200	Carbamoyl phosphate synthetase		C1356	+ a
446	PF3D7_1311800	M1-family alanyl aminopeptidase	C140 C617	+	+ a
447	PF3D7_1311900	Vacuolar ATP synthase, catalytic subunit a	C526	+	+ a
448	PF3D7_1312600	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial, putative			+
449	PF3D7_1315700	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRM61, putative			+ a, b
450	PF3D7_1317100	DNA replication licensing factor MCM4		+	
451	PF3D7_1317400	zinc finger protein, putative		+	+ a
452	PF3D7_1320000	golgi protein 1			+ a
453	PF3D7_1320600	ras-related protein Rab-11A			+
454	PF3D7_1321700	splicing factor 1		+	
455	PF3D7_1322000	adenosine-diphosphatase, putative			+ a
456	PF3D7_1323200	Vacuolar ATP synthase subunit g, putative		+	
457	PF3D7_1323400	60S ribosomal protein L23 (RPL23)	C134		
458	PF3D7_1323600	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
459	PF3D7_1324000	conserved Plasmodium protein, unknown function			+

460	PF3D7_1324900	L-lactate dehydrogenase, LDH	C59 C260	+	+ a
461	PF3D7_1325000	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6, putative		+	
462	PF3D7_1325100	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase			+ a
463	PF3D7_1328100	Proteasome subunit beta type 7			+ a
464	PF3D7_1328200	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
465	PF3D7_1329300	Chromatin assembly factor 1 subunit, putative			+
466	PF3D7_1330800	RNA-binding protein, putative			+ a
467	PF3D7_1331700	Glutaminyl-tRNA ligase, putative			+
468	PF3D7_1332900	Isoleucine-tRNA ligase, putative		+	+ a
469	PF3D7_1333000	20 kDa chaperonin		C237	
470	PF3D7_1333800	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
471	PF3D7_1334200	chaperone binding protein, putative			+ a
472	PF3D7_1335100	Merozoite Surface Protein 7			+ a
473	PF3D7_1336800	Nuclear movement protein, putative			+
474	PF3D7_1337200	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase			+ a
475	PF3D7_1338300	Elongation factor 1-gamma, putative	C70	+	+ a
476	PF3D7_1338700	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
477	PF3D7_1339700	Conserved Plasmodium protein, unknown function			+
478	PF3D7_1340600	RNA lariat debranching enzyme, putative			+ a
479	PF3D7_1342400	casein kinase II beta chain			+ a
480	PF3D7_1342800	Phosphoenolpyruvate carboxykinase			+ a
481	PF3D7_1343000	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	C70 C87 C161	+	+ a
482	PF3D7_1344100	Krox-like protein, putative			+ a, b
483	PF3D7_1344200	heat shock protein 110, putative	C23	+	+
484	PF3D7_1345700	Isocitrate dehydrogenase (NADP), mitochondrial			+ a
485	PF3D7_1346300	DNA/RNA-binding protein Alba 2	C133	+	+ a
486	PF3D7_1347500	DNA/RNA-binding protein Alba 4	C63 C286	+	+ a
487	PF3D7_1349200	Glutamate-tRNA ligase, putative		+	
488	PF3D7_1350100	Lysine-tRNA ligase		+	+ a
489	PF3D7_1350200	small nuclear ribonucleoprotein E, putative			+ a, b
490	PF3D7_1351100	conserved protein, unknown function			+ a
491	PF3D7_1351800	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
492	PF3D7_1352500	Thioredoxin-related protein, putative			+ a, b
493	PF3D7_1353800	proteasome subunit alpha type-4, putative			+ a
494	PF3D7_1353900	proteasome subunit alpha type-7, putative		+	+ a
495	PF3D7_1354500	Adenylosuccinate synthetase	C283 C396		+

496	PF3D7_1355100	DNA replication licensing factor MCM6		+	
497	PF3D7_1355500	serine/threonine protein phosphatase 5		+	
498	PF3D7_1356300	ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative		+	
499	PF3D7_1357000	elongation factor 1-alpha	C356	+	
500	PF3D7_1357800	T-complex protein 1 subunit delta		+	
501	PF3D7_1357900	pyrroline-5-carboxylate reductase		C253	
502	PF3D7_1358500	Zinc finger protein, putative		+	
503	PF3D7_1358900	GTP-binding protein, putative			+ a
504	PF3D7_1359400	CUGBP Elav-like family member 1		+	+ a
505	PF3D7_1359600	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
506	PF3D7_1360400	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a, b
507	PF3D7_1360800	Falcilysin	C438	+	+ a
508	PF3D7_1360900	Polyadenylate binding protein, putative			+ a
509	PF3D7_1361100	protein transport protein Sec24A (SEC24A)	C251		
510	PF3D7_1361800	conserved Plasmodium protein, unknown function	C821 C1337 C1549		
511	PF3D7_1361900	Proliferating cell nuclear antigen 1		+	+ a
512	PF3D7_1362200	RuvB-like helicase 3		+	+ a, b
513	PF3D7_1365900	ubiquitin-60S ribosomal protein L40		+	+
514	PF3D7_1366500	Nucleoside diphosphate kinase		+	+ a
515	PF3D7_1366900	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
516	PF3D7_1367000	suppressor of kinetochore protein 1, putative		+	+
517	PF3D7_1367700	Alanine-tRNA ligase			+ a
518	PF3D7_1368100	26S proteasome regulatory subunit RPN11, putative		+	
519	PF3D7_1368200	ABC transporter E family member 1, putative			+ a
520	PF3D7_1401800	Choline kinase			+ a
521	PF3D7_1402300	26S proteasome regulatory subunit RPN6 (RPN6)	C377		
522	PF3D7_1403900	serine/threonine protein phosphatase CPPED1, putative		+	+ a
523	PF3D7_1404900	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
524	PF3D7_1405600	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative			+ a
525	PF3D7_1406300	glycerophosphodiester phosphodiesterase	C91		+ a
526	PF3D7_1406700	Vacuolar protein sorting 29			+ a
527	PF3D7_1407500	multifunctional methyltransferase subunit TRM112, putative			+ a
528	PF3D7_1407800	plasmepsin IV	C370	+	
529	PF3D7_1407900	Plasmepsin I			+ a
530	PF3D7_1408000	plasmepsin II		+	
531	PF3D7_1408100	plasmepsin III		+	+ a
532	PF3D7_1408600	40S ribosomal protein S8e, putative		+	+ a

533	PF3D7_1409000	WD repeat-containing protein, putative			+
534	PF3D7_1409300	DNA damage-inducible protein 1, putative			+ a, b
535	PF3D7_1410200	Cytidine triphosphate synthetase		+	+ a
536	PF3D7_1410400	Rhoptry-associated protein 1		+	+ a
537	PF3D7_1410600	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit, putative		+	+ a
538	PF3D7_1412300	Nuclear transport factor 2, putative			+
539	PF3D7_1412500	Actin II		+	
540	PF3D7_1412600	Deoxyhypusine synthase			+ a
541	PF3D7_1414000	26S proteasome regulatory subunit RPN13, putative		+	+ a, b
542	PF3D7_1414400	serine/threonine protein phosphatase PP1 (PP1)	C169		
543	PF3D7_1416500	NADP-specific glutamate dehydrogenase		+	+ a, b
544	PF3D7_1416900	prefoldin subunit 2, putative		+	+ a
545	PF3D7_1417500	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4, putative			+
546	PF3D7_1417800	DNA replication licensing factor MCM2		+	
547	PF3D7_1418200	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
548	PF3D7_1419000	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a, b
549	PF3D7_1419300	Glutathione S-transferase			+ a
550	PF3D7_1419700	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
551	PF3D7_1419800	Glutathione reductase		+	+ a
552	PF3D7_1420400	Glycine-tRNA ligase		+	+ a
553	PF3D7_1420600	pantothenate kinase 1, putative			+ a
554	PF3D7_1420700	surface protein P113		+	+ a
555	PF3D7_1421100	conserved Plasmodium protein, unknown function			+
556	PF3D7_1421500	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM8, putative			+ a, b
557	PF3D7_1422400	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
558	PF3D7_1423700	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
559	PF3D7_1424100	60S ribosomal protein L5, putative			+
560	PF3D7_1426100	Basic transcription factor 3b, putative		+	
561	PF3D7_1426200	protein arginine N-methyltransferase 1			+
562	PF3D7_1427900	conserved protein, unknown function		+	+ a
563	PF3D7_1428300	Proliferation-associated protein 2g4, putative			+ a
564	PF3D7_1429500	diphthamide biosynthesis protein 2, putative			+ a
565	PF3D7_1433400	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function			+
566	PF3D7_1434200	Calmodulin		+	+ a
567	PF3D7_1434300	Hsp70/Hsp90 organizing protein		+	+ a
568	PF3D7_1434600	methionine aminopeptidase 2 (METAP2)	C447		

569	PF3D7_1434800	mitochondrial acidic protein MAM33, putative		+	+ a
570	PF3D7_1436000	Glucose-6-phosphate isomerase		+	+ a
571	PF3D7_1436300	translocon component PTEX150		+	+
572	PF3D7_1437200	ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit, putative		+	
573	PF3D7_1438000	eukaryotic translation initiation factor eIF2A, putative	C176		+ a
574	PF3D7_1438900	thioredoxin peroxidase 1	C170	+	+ a
575	PF3D7_1439700	leucine carboxyl methyltransferase, putative			+
576	PF3D7_1439800	vesicle-associated membrane protein, putative			+ a, b
577	PF3D7_1439900	Triosephosphate isomerase	C217	+	+ a
578	PF3D7_1441100	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
579	PF3D7_1442100	replication factor A protein 3, putative		C41	
580	PF3D7_1442300	tRNA import protein tRIP		+	+ a
581	PF3D7_1443900	Heat shock protein 90, putative		+	+ a
582	PF3D7_1444800	Fructose-bisphosphate aldolase	C247	+	
583	PF3D7_1445700	conserved Plasmodium protein, unknown function			
584	PF3D7_1446200	M17 leucyl aminopeptidase	C121	+	+ a
585	PF3D7_1446600	Centrin-2		+	+ a
586	PF3D7_1447000	40S ribosomal protein S5			+ a, b
587	PF3D7_1451100	Elongation factor 2	C130 C362 C653 C725 C786	C565	
588	PF3D7_1451200	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
589	PF3D7_1453700	co-chaperone p23			+ a
590	PF3D7_1453800	Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase		+	
591	PF3D7_1454400	aminopeptidase P		+	
592	PF3D7_1454700	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative		+	
593	PF3D7_1457200	Thioredoxin, Trx1		+	+ a
594	PF3D7_1457300	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
595	PF3D7_1458500	spindle assembly abnormal protein 4, putative		+	
596	PF3D7_1460400	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzym L3		+	
597	PF3D7_1461400	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	
598	PF3D7_1461900	Valine-tRNA ligase, putative	C428		+ a
599	PF3D7_1462300	conserved Plasmodium protein, unknown function			+ a
600	PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH	C58 C157 C250	+	+ a

601	PF3D7_1464600	serine/threonine protein phosphatase UIS2, putative			+ a, b
602	PF3D7_1465300	tRNA 3'-trailer sequence RNase, putative			+ a
603	PF3D7_1465900	40S ribosomal protein S3			+ a, b
604	PF3D7_1466300	26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative		+	
605	PF3D7_1466900	Rhoptry protein, putative		+	+ a
606	PF3D7_1468100	conserved Plasmodium protein, unknown function		+	+ a
607	PF3D7_1468700	eukaryotic initiation factor 4A	C291	+	+ a
608	PF3D7_1470900	proteasome subunit beta type-2, putative			+ a
609	PF3D7_1471100	Exported protein 2			+ a, b
610	PF3D7_1472900	Dihydroorotase, putative			+ a
611	PF3D7_1473200	DnaJ protein, putative		C214	+ a
612	PF3D7_1473300	CKK domain-containing protein, putative	C456		
613	PF3D7_1473700	nucleoporin NUP116/NSP116, putative			+ a, b
614	PF3D7_1474800	Proteasome subunit alpha type 1, putative		+	+ a

Danksagung

Zuerst einmal bedanke ich mich bei **Prof. Katja Becker** für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe an diesem spannenden Thema forschen zu dürfen. Danke für die bedingungslose Unterstützung, den Freiraum und die lehrreichen Lektionen. **Dr. Jude Przyborski** danke ich für die Übernahme der finalen Betreuung der Dissertation und die Unterstützung beim Schreiben.

Prof. Peter Friedhoff danke ich für die Übernahme der Zweitbetreuung, die konstruktiven Anmerkungen und interessanten Denkanstößen. Ebenso danke ich den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission **Prof. Elena Evguenieva-Hackenberg** und **Prof. Bernhard Spengler**.

Ein großer Dank geht auch an meine Kooperationspartner: **Prof. Miriam Cortese-Krott** und **Dr. Frederick Barbarino** für die Unterstützung bei der Planung sowie Durchführung der CLD-Experimente; **Priscila Bourilhon** für die Durchführung der Rezeptor-Interaktionsstudien; **Prof. Cristina Furdui** und **Prof. Leslie Poole** sowie **Prof. John Yates IIIrd**, **Prof. Claire Delahunty** und **Dr. Robin Park** für die Durchführung der Massenspektrometrie sowie die gute Zusammenarbeit an dem BCN-Bio1-Projekt. **Dr. Jörg Klug** danke ich für seine hMIF Expertise.

Der gesamten **AG Becker** danke ich recht herzlich für das produktive Umfeld und die gute Zusammenarbeit. **Dr. Stefan Rahlfs** danke ich für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten; **Marina Fischer** danke ich für die Einarbeitung in die Kinetik; meinem Masterstudenten **Eric Springer** danke ich für die Begeisterung sowie Zusammenarbeit an dem MIF-Projekt; **Norma Schulz**, **Marie Sorg**, **Michaela Stumpf**, **Melanie Moos** und **Chantal Heun** danke ich für die engagierte und kompetente Unterstützung im Labor; **Katharina Schuh** danke ich für die Zusammenarbeit am Redoxom und wilde Diskussionen; **Dr. Karin Fritz-Wolf** danke ich für die Weiterbildung im Bereich der Kristallisation und die Beantwortung meiner Fragen; **Sophia Wendorff** danke ich für ihre helfende Hand im Labor und ihre Art.

Dem Dreigestirn aus B124, **Dr. Christina Brandstädter**, **Dr. Julia Hahn** und **Dr. Kristina Häussler** danke ich herzlich für die fachliche Unterstützung, das Korrekturlesen, ihre Freundschaft und noch so vieles mehr.

Ein ganz besonderer Dank gilt **Alexander Höing**, **Anke Werner**, **Melissa Dillenberger** und **Isabell Berneburg**. Eure Unterstützung in allen Lebenslagen, egal ob Korrekturlesen, wissenschaftliche Diskussionen, Fernsehabe oder die Wahl des richtigen Essens, haben die Zeit zu so einer besonderen gemacht.

Nicht zuletzt geht mein besonderer Dank an meine **Familie**, für die bedingungslose Unterstützung und das an mich glauben. Ein besonderer Dank gilt meinen zwei Blondis, die mich zum Lachen bringen, auch wenn mir mal nicht danach ist.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, 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.

Gießen, März, 2021

Susanne Schipper