

**Charakterisierung von Adenylatkinasen aus
Plasmodium falciparum und
Thioredoxinreduktase-assoziierten Proteinen
aus Dipteren**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Julia Katharina Bolt-Ulschmid

Hamburg

Würzburg 2004

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Professor Dr. Jörg Hacker

Gutachter: Professor Dr. Katja Becker-Brandenburg

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Ich versichere, daß ich diese Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Die Experimente zu dieser Dissertation wurden in der Zeit von September 1999 bis August 2000 am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg und danach am Interdisziplinären Forschungszentrum der Universität Gießen durchgeführt.

Was ist der Unterschied zwischen einem Fachmann und einem Philosophen ?

Ein Fachmann weiß am Anfang manches über mancherlei, weiß dann mehr und mehr über immer weniger und weiß am Ende über nichts alles.

Ein Philosoph dagegen weiß am Anfang manches über mancherlei, weiß dann immer weniger über mehr und mehr und weiß am Ende über alles nichts.

Lieblingsscherz des Atomtheoretikers Niels Bohr (*1885 †1962)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Malaria	1
1.1.1 Erreger und Vektor	2
1.1.2 Medikamente und Resistenz	5
1.1.3 Molekulare Eigenschaften der Adenylatkinasen.....	6
1.1.4 Energiestoffwechsel der <i>Apicomplexa</i>	8
1.2 Zellulärer Redoxstoffwechsel	11
1.2.1 Die Glutathionreduktase (GR)	11
1.2.2 Die Thioredoxinreduktase (TrxR)	12
1.2.3 Die Carbonylreduktase	14
1.2.4 Oxidativer Stress und Alterung.....	14
1.2.5 Der Redoxstoffwechsel in <i>Drosophila</i>	15
1.3 Problemstellung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Bezugsquellen der Chemikalien	18
2.1.2 Geräte	19
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.4 Puffer und Medien	21
2.1.4.1 Puffer	21
2.1.4.2 Medien	24
2.1.4.3 Restriktionsenzyme, Plasmide und Bakterienstämme	25
2.2 Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1 Aufreinigung von DNA	27
2.2.1.1 Aufreinigung von DNA aus <i>Plasmodium falciparum</i>	27
2.2.1.2 Aufreinigung von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.1.3 Amplifikation von cDNA-Banken in <i>E. coli</i> -Zellen (XI-1-Blue).....	28
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktionen	28
2.2.3 Klonierung in Plasmidvektoren	30
2.2.3.1 Restriktionsverdau	30
2.2.3.2 Ligation	31
2.2.4 Transformation in <i>E. coli</i>	32
2.2.4.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.2.4.2. Transformation.....	32
2.2.4.3 Selektion positiver Klone.....	32

2.2.5 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	33
2.3 Biochemische Methoden	34
2.3.1 Proteinreinigungen	34
2.3.1.1 Proteinextraktion aus Bakterien	34
2.3.1.2 Aufreinigung der markierten Proteine über eine Ni-NTA Säule.....	34
2.3.1.3 Aufreinigung der TrxR über Affinitätschromatographie	35
2.3.1.4 Kontrolle mittels SDS-Page.....	35
2.3.2 Proteinanalyse.....	36
2.3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.3.2.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Säulenchromatographie.....	37
2.3.3 Enzymassays	39
2.3.3.1 Adenylatkinase-Assays	39
2.3.3.2 Insulinassay	41
2.3.3.3 Carbonylreduktase-Assay	41
2.3.3.4 Thioredoxinreduktase-Assays.....	42
2.3.3.5 Berechnung kinetischer Parameter.....	43
2.3.3.6 Inhibitorstudien.....	43
2.3.3.7 Einwirkung von Metallionen auf die PfGAK.....	44
2.3.4 Immunologische Methoden	44
2.3.4.1 Western-Blot-Analysen mit immunologischem Nachweis	44
2.3.4.2 Aufreinigung der Antikörper über Protein-A-Sepharose.....	45
2.3.4.3 Antigenspezifische Aufreinigung der Antikörper.....	45
2.3.4.4 Immunofluoreszenz von parasitierten Erythrozyten	47
2.4 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> in vitro	48
2.4.1 Kulturbedingungen	48
2.4.2 Synchronisation der Kulturen	49
2.4.3 Selektion auf Gametozyten	49
2.5 Kristallisation	49
2.5.1 Kristallisations-Screening	50
2.5.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen	50
3 Ergebnisse	51
3.1 Charakterisierung von Adenylatkinasen aus <i>Plasmodium falciparum</i>	51
3.1.1 Datenbankanalysen zu den Adenylatkinasen aus <i>P.falciparum</i>	51
3.1.1.1 Sequenzvergleiche der PfAK auf <i>P. falciparum</i> Chromosom 10.....	51
3.1.1.2 Sequenzvergleiche der PfGAK von <i>P. falciparum</i> Chromosom 4	54
3.1.1.3 Phylogramm der AKs aus Parasiten	55

3.1.2 PCR-Amplifikation und Klonierung der Gene der PfAK und PfGAK	57
3.1.2.1 Amplifikation und Klonierung des Gens der PfAK.....	57
3.1.2.2 Amplifikation und Klonierung des Gens der PfGAK	58
3.1.2.3 Gelfiltration der PfAK (Molekulargewicht, Assoziation mit HSP70)	59
3.1.3 Enzymkinetische Charakterisierung der PfAK und PfGAK	60
3.1.3.1 pH- und Pufferprofile.....	60
3.1.3.2 Substratspektren.....	61
3.1.3.3 Bestimmung kinetischer Konstanten (K_M , V_{max})	62
3.1.4 Inhibitorstudien	64
3.1.4.1 Hemmung durch AP ₅ A, GP ₅ A	64
3.1.4.2 Test des Inhibitors GP ₅ A an Malaria-Kulturen.....	65
3.1.5 Proteinnachweis mit Antikörpern	66
3.1.5.1 Nachweis im Plasmodienextrakt mittels Western-Blot	66
3.1.5.2 Lokalisation mit Immunfluoreszenz	66
3.1.6 Metallbindung der PfGAK.....	67
3.1.6.1 Metallbestimmung in GAK mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie .	67
3.1.6.2 Spektrum der GAK im Vergleich mit PfAK	67
3.1.7 Kristallisation der PfGAK	68
3.2 Untersuchungen zum Redoxstoffwechsels von <i>Drosophila</i>.....	70
3.2.1 Datenbankanalysen.....	70
3.2.1.1 Datenbankanalysen zur Carbonylreduktase Sniffer	70
3.2.1.2 Datenbankanalysen zur Spleißvariante der TrxR.....	73
3.2.2 Organisation der Gene der TrxR und Sniffer	73
3.2.3 Klonierung und heterologe Expression.....	74
3.2.3.1 Klonierung und heterologe Expression der Carbonylreduktase	74
3.2.3.2 Klonierung und heterologe Expression der Variante der DmTrxR-1 ..	74
3.2.4 Enzymkinetische Charakterisierung der Carbonylreduktase Sniffer.....	74
3.2.4.1 <i>In vitro</i> Funktionstests	74
3.2.4.2 Carbonylreduktase-Aktivität des Sniffer	75
3.2.4.3 Hemmung der Carbonylreduktase Sniffer	77
3.2.4.4 Aktivitätsmessung in homogenisierten Fliegen	77
3.2.5 Enzymkinetische Charakterisierung der DmTrxR ^{mito} und DmTrxR ^{cyto}	78
3.2.6 Kristallisation des Sniffer und erste Strukturdaten.....	78
4 Diskussion	81
4.1 Zu den Adenylatkinasen in <i>Plasmodium falciparum</i>	81
4.1.1 PfAK	81

4.1.2 PfGAK	84
4.1.3 Der Energiehaushalt von <i>Plasmodium falciparum</i>	86
4.2 Der Redoxstoffwechsel in <i>Drosophila</i>	88
4.2.1 Die TrxR Spleißvarianten	88
4.2.2 Sniffer	88
4.2.2.1 Die Organisation der Gene TrxR/Sniffer	88
4.2.2.2 Sniffer im Vergleich mit anderen Carbonylreduktasen	89
4.2.2.3 Die Carbonylreduktase Sniffer und ihr Substratspektrum	89
4.2.2.4 Kristallisation und Struktur	90
4.2.2.5 Hypothese zur Situation <i>in vivo</i> - mögliche Substrate und Funktion ..	91
4.3 Ausblick: Aspekte zur Bekämpfung des Parasiten und seines Vektors ..	92
4.3.1 Bekämpfung des Parasiten	92
4.3.2 Bekämpfung des Vektors <i>Anopheles gambiae</i>	92
5 Zusammenfassung	94
5.1 Zusammenfassung	94
5.2 Summary	96
6 Literaturverzeichnis	98
7 Anhänge	113
Anhang I - Tabelle A1	113
Anhang II - Abbildung A1	114
Anhang III - Abbildung A2	115
8 Lebenslauf	116
9 Danksagung	117
10 Eigene Veröffentlichungen	118
I - Science 2001	
II - Journal of Biological Chemistry 2002	
III - Current Biology 2004	
IV - Molecular and Biochemical Parasitology 2004	

Abkürzungsverzeichnis

ε	Absorptionskoeffizient
ΔA	Absorptionsdifferenz
AMP, ADP, ATP	Adenosinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
AK	Adenylatkinase
Amp	Ampicillin
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AP ₅ A	Diadenosinpentaphosphat
AS	Aminosäure(n)
ASK	Apoptose-stimulierende Kinase
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CMP, CDP, CTP	Cytosinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CR	Carbonylreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat)
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
G6PDH	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
GMP, GDP, GTP	Guanosinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
GP ₅ A	Guanosin-Adenosinpentaphosphat
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathionthiol
GSSG	Glutathiondisulfid
HK	Hexokinase
HSC	cytosolisches Hitzeschockprotein
HSP	Hitzeschockprotein
IMP, IDP, ITP	Inosinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LDH	Laktatdehydrogenase
M _w	Molekulargewicht
NADH, NAD ⁺	reduziertes, oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH, NADP ⁺	reduziertes, oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

Abkürzungsverzeichnis

NDP	Nukleotiddiphosphat
NMP	Nukleotidmonophosphat
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORF	offener Leserahmen (" <i>open reading frame</i> ")
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
Py	<i>Plasmodium yoelii</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV	Parasitophore Vakuole
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro min
SDR	Kurzkettendehydrogenase ("short chain dehydrogenase/reductase")
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Sulfadoxin-Pyrimethamin
TEA	Tris-(hydroxyethyl)-amin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> , Tetramethylethyldiamin
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
U	Enzymeinheit (Units, $\mu\text{mol}/\text{min}$)
UMP, UDP, UTP	Uridinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
V-ATPase	Vakuolentyp ATPase
VPPase	Vakuolentyp H^+ -Pyrophosphatase

Bei Enzymen erläutern die Präfixe den Ursprung (z.B. Dm für *Drosophila melanogaster*, h für den Menschen).

Gene sind klein und kursiv geschrieben. Desweiteren werden SI-Einheiten, die chemischen Elementsymbole, sowie die Standardkürzel der Aminosäuren und Nukleotide verwendet.

Abbildungsverzeichnis

	Titel	Seite
Abbildung 1	Globale Malariasituation	1
Abbildung 2	Lebenszyklus des Malariaerregers <i>Plasmodium falciparum</i>	4
Abbildung 3	Geographische Verteilung der Resistenz gegen Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin	5
Abbildung 4	Darstellung der Struktur der humanen Myokinase	6
Abbildung 5	Schematische Darstellung eines <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten mit der intrazellulären Lokalisation verschiedener Stoffwechselwege	10
Abbildung 6	Funktionen des Thioredoxin-Systems	13
Abbildung 7	Kalibrierung der Superdex 200 Chromatographiesäule	37
Abbildung 8	Schema eines Kristallansatzes nach dem hanging-drop-Verfahren	49
Abbildung 9	Ausschnitt der Nukleotidsequenz von Chromosom 10 mit Aminosäuresequenz aller drei möglicher Leseraster	52
Abbildung 10	Alignment der PfAK mit AK2 - Isozymen des Menschen und <i>Leishmania donovani</i> , sowie der AK aus Hefe	53
Abbildung 11	Helical-Wheel-Projektion der PfAK	54
Abbildung 12	Alignment der Zinkfinger-Sequenz der PfGAK und des Transkriptions-Elongationsfaktors S-II aus <i>D. melanogaster</i>	55
Abbildung 13	Alignment der PfGAK mit der AK aus <i>P. denitrificans</i> , <i>A. thaliana</i> und der humanen AK5	55
Abbildung 14	Phylogramm der Adenylatkinasen aus Plasmodien, Trypanosomen und der NMP-Kinase aus <i>Babesia bovis</i>	56
Abbildung 15	SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie der rekombinanten, aufgereinigten PfAK und PfGAK	58
Abbildung 16	Säulenchromatographie der PfAK und Analyse der Fraktionen	59
Abbildung 17	Plot potentieller DnaK-Bindungsstellen der PfAK	60
Abbildung 18	pH-Profil der PfAK mit den Puffern TEA-HCl und Tricine	61
Abbildung 19	pH-Profil der PfGAK mit den Puffern TEA-HCl und Tricine	61
Abbildung 20	Diagramm eines K_M -Wertes für AMP an der PfAK	63
Abbildung 21	Diagramm eines K_M -Wertes für GTP an der PfGAK	64
Abbildung 22	Infizierte Erythrozyten nach Behandlung mit 120 μ M GP ₅ A	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 23	Western-Blot der PfAK	66
Abbildung 24	Lokalisation der PfGAK mittels Immunfluoreszenz	67
Abbildung 25	Scan einer Probe der PfGAK über 200 bis 600 nm Wellenlänge	67
Abbildung 26	Kristalle der PfGAK unter dem Polarisationsfilter	68
Abbildung 27	Phylogramm der Kurzketten-Dehydrogenasen	71
Abbildung 28	Alignment der Carbonylreduktase Sniffer aus <i>D. melanogaster</i>	72
Abbildung 29	Alignment des Exon 1 der DmTrxR ^{cyto} und der DmTrxR ^{mito}	73
Abbildung 30	Der genomische Aufbau der DmTrxR-1 und des Sniffer	73
Abbildung 31	SDS-PAGE der rekombinanten Carbonylreduktase Sniffer	74
Abbildung 32	Insulinassay der Carbonylreduktase Sniffer	75
Abbildung 33	Substrate der Carbonylreduktase Sniffer	76
Abbildung 34	Chemische Strukturformeln der Inhibitoren Quercetin und Rutin	77
Abbildung 35	Kristalle der Carbonylreduktase Sniffer aus <i>D. melanogaster</i>	79
Abbildung 36	Schematische Darstellung einer Untereinheit des Sniffer	80
Abbildung 37	Modellierung der <i>active site</i> des Sniffer mit Phenanthrenquinon	80
Abbildung A1	Alignment der Carbonylreduktase Sniffer aus <i>D. melanogaster</i>	114
Abbildung A2	Stadienspezifische Synthese von RNA für bestimmte Gene	115

Tabellenverzeichnis

	Titel	Seite
Tabelle 1	Übersicht über die wichtigsten Malariaerkrankungen des Menschen und ihre Erreger	3
Tabelle 2	Übersicht über die humanen Adenylatkinasen	7
Tabelle 3	Überblick über die verwendeten Restriktionsenzyme mit ihren Erkennungssequenzen	25
Tabelle 4	Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Vektoren	25
Tabelle 5	Genotypen der verwendeten Bakterienstämme mit Referenzen	26
Tabelle 6	Primer zur PCR-Amplifikation der Adenylatkinase aus <i>Plasmodium falciparum</i>	29
Tabelle 7	Primer zur PCR-Amplifikation der GTP-abhängigen Adenylatkinase (PfGAK) aus <i>Plasmodium falciparum</i>	29
Tabelle 8	Typisches Temperaturprofil einer PCR mit "hot start"	30
Tabelle 9	Typisches Beispiel eines 30 µl Ansatzes für den Verdau von Insert und Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und Hind III	31
Tabelle 10	Übersicht über den gekoppelten Adenylatkinase-Assay	39
Tabelle 11	Pipettierschema des enzymatisch-optischen AK-Assays	40
Tabelle 12	Übersicht über den gekoppelten reversen Adenylatkinase-Assay	40
Tabelle 13	Pipettierschema des reversen enzymatisch-optischen AK-Assays	41
Tabelle 14	Pipettierschema für den DTNB-Reduktionsassay	42
Tabelle 15	Pipettierschema des Thioredoxin-Reduktionsassays	42
Tabelle 16	Übersicht über die konservierten Aminosäuren der PfAK und PfGAK	57
Tabelle 17	Übersicht über die Untersuchungen im Zusammenhang mit der Gelchromatographie der PfAK	59
Tabelle 18	Substratspektren der PfAK bei pH 6.0 und 7.4, sowie der PfGAK bei pH 6.0 in TEA-HCl-Puffer	62
Tabelle 19	Inhibition der rekombinanten PfAK und PfGAK durch die Disubstratanaloga AP ₅ A und GP ₅ A	65
Tabelle 20	Übersicht über die AK und GAK aus <i>Plasmodium falciparum</i>	69
Tabelle 21	Konservierte Motive der Carbonylreduktase Sniffer	71
Tabelle 22	Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Kurzketten-Dehydrogenasen (SDR)	71

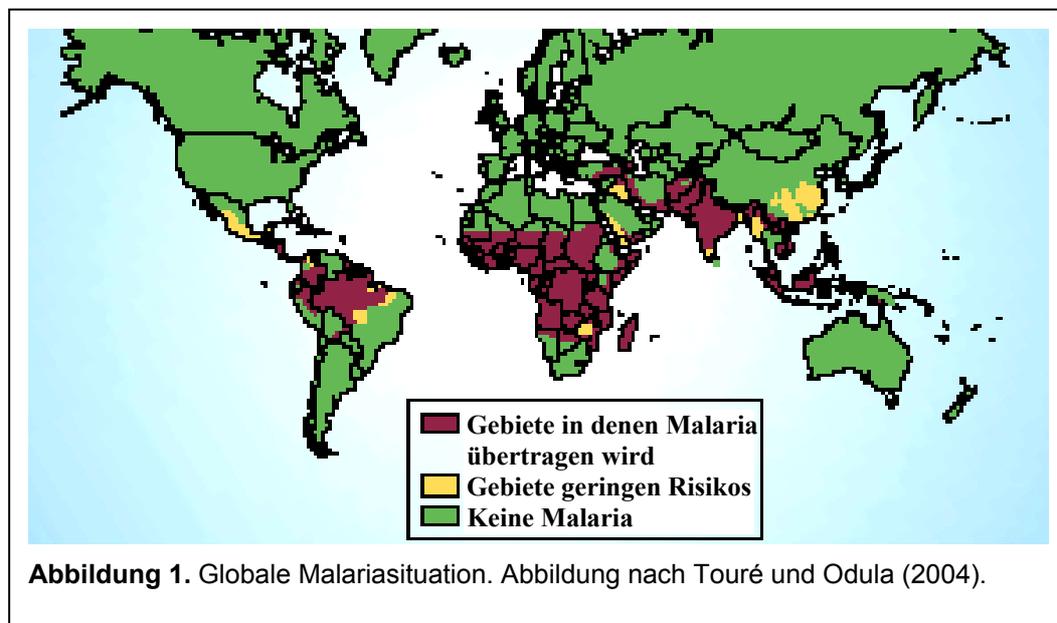
Tabellenverzeichnis

Tabelle 23	Substratspezifität des rekombinanten Sniffer	76
Tabelle 24	IC ₅₀ - Werte verschiedener Inhibitoren an Sniffer	77
Tabelle 25	Reduktion der Carbonylreduktase-Aktivität in Fliegen mit der Mutation <i>sniffer</i>	78
Tabelle 26	Vergleich der Michaelis-Menten-Konstanten der cytosolischen DmTrxR und ihrer mitochondrialen Spleißvariante	78
Tabelle 27	Vergleich der Carbonylreduktasen aus <i>Drosophila</i> (DmSniffer), Schwein (ptCR), Hamster (CHO-CR) und Mensch (hCR) anhand der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten	90
Tabelle A1	Mögliche posttranslationale Modifikationen der PfAK und PfGAK entsprechend der Vorhersagen von PROSITE	113

1 Einleitung

1.1 Malaria

Die tropische Malaria stellt eine der größten Bedrohungen für Gesundheit und Wohlstand der Menschheit dar. Mehr als zwei Millionen Menschen sterben jährlich an Malaria (Moorthy *et al.* 2004), und davon sind 90% Kinder unter 5 Jahren. Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist infektionsgefährdet (Butler 2004). Während man sich in den 60er Jahren dank eines äußerst großzügigen Einsatzes des Insektizids DDT einer Ausrottung schon sehr nahe sah, ist die Malaria heute wieder auf dem Vormarsch (Hartl 2004). Schätzungen gehen davon aus, daß sich die Zahl der Malariaerkrankungen ohne effektive Interventionsstrategien in den nächsten 20 Jahren verdoppelt (Sachs und Malaney 2002).



In den betroffenen Ländern spielt die Malaria eine wichtige Rolle im politischen, sozialen und wirtschaftlichen Leben. Bei der Planung von Kriegen ist die Malaria bis heute ein wichtiger Faktor (Beadle und Hoffman 1993). Auf wirtschaftlicher Ebene fällt die klare Kongruenz der Malariagebiete mit den ärmsten Regionen der Welt auf. Dabei behindert die Krankheit die Entwicklung auf verschiedenste Weise. Direkt durch Veränderung von Fruchtbarkeit, Kindersterblichkeit, Arbeitsproduktivität und Gesundheitskosten, aber auch sekundär durch Beeinflussung von Entscheidungen bezüglich Familienplanung (und damit des Bevölkerungswachstums), Sparquote und Investitionen (Sachs und Malaney 2002). Insbesondere die Kindersterblichkeit führt zu großen sozialen wie wirtschaftlichen Problemen. In weiten Teilen Afrikas beträgt der Verlust durch Malaria mehr als ein Prozent des Bruttoinlandsproduktes (Gallup

und Sachs 2001). Für das Jahr 2000 wurde der wirtschaftliche Schaden durch die Malaria in Afrika auf ein um 100 Milliarden US-Dollar verringertes Bruttoinlandprodukt beziffert (Sachs und Malaney 2002; Luke und Hoffman 2003).

1.1.1 Erreger und Vektor

Erreger der Malaria sind Parasiten der Gattung *Plasmodium*. Diese Protozoen gehören zu den *Apicomplexa* und sind damit den Trypanosomen, den Erregern der Schlafkrankheit, und den Toxoplasmen (Toxoplasmose) verwandt. Plasmodien haben eine extreme Stoffwechselrate mit der sie den Glukoseverbrauch infizierter Erythrozyten auf das 100-fache steigern (Roth *et al.* 1988). Als Überträger dienen den Parasiten über 60 Mückenarten der Gattung *Anopheles*, deren effektivste Malariaüberträger im tropischen Afrika vorkommen. Die Unterschiede zwischen den *Anopheles*-Arten wirken sich auch auf die Ausbreitung der Malaria aus, da aggressivere Mücken auch zu einer stärkeren Verbreitung führen (Hume *et al.* 2003). Die Temperaturabhängigkeit der Malariaübertragung beschränkt sich auf die Geschwindigkeit der Vektorentwicklung und die Reifung der Plasmodien in den Mücken (Rastogi *et al.* 1987). Möglich ist eine erfolgreiche Ausbreitung jedoch auch bei geringeren Temperaturen ab 16°C, was sich durch belegte Malariafälle zur Zeit der kleinen Eiszeit im englischen Raum zeigte (Reiter 2000). Die Bekämpfung des Vektors schien, zusammen mit dem neuentwickelten Chloroquin, in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eine gute Möglichkeit, die Malaria auszurotten, da mit DDT ein sehr wirksames und bezahlbares Insektizid zur Verfügung stand und der allgemeine Fortschrittsglaube Zweifel bezüglich der Nebenwirkungen und ökologischen Folgen zerstreute. Die nach dem allgemeinen Anwendungsverbot von DDT übriggebliebenen Malariagebiete reichten aus, um die Krankheit bis heute wieder stark zu verbreiten.

Man unterscheidet vier verschiedene Krankheitsbilder der Malaria, welche durch die verschiedenen Plasmodien-Spezies verursacht werden. Die gefährlichste ist hierbei die *Malaria tropica*, die durch den Erreger *Plasmodium falciparum* ausgelöst wird.

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

Tabelle 1. Übersicht über die wichtigsten Malariaerkrankungen des Menschen und ihre Erreger.

Lebenszyklus von P. falciparum (in Anlehnung an Mehlhorn und Piekarski 2002)

Der Lebenszyklus der Plasmodien umfasst verschiedene Stadien, von denen einige im Menschen (Zwischenwirt) und andere in der Mücke (Endwirt) durchlaufen werden. Dieser Entwicklungsgang verläuft in den drei für Sporozoen typischen Phasen: Schizogonie, Gamogonie und Sporogonie und ist in Abbildung 2 für *Plasmodium falciparum* dargestellt. Durch den Stich einer *Anopheles*-Mücke gelangen etwa 20 Sporozoiten über die Blutbahn binnen 30 Sekunden in die Leber, wo sie durch einen ausgeklügelten Mechanismus unter Ausnutzung der Immunabwehr in die Leberparenchymzellen eindringen. Dort bilden sich Schizonten, in denen bis zu 40 000 Merozoiten heranwachsen. Nach 6-9 Tagen befallen diese nun Erythrozyten und siedeln somit in den Blutstrom über. Im Gegensatz zu *P. vivax* und *P. ovale* besitzen die Erreger der *Malaria tropica* ab diesem Zeitpunkt keine Leberstadien mehr. Der Zyklus der sogenannten Blutstadien, welche auch kultiviert werden können, wird circa alle 48 Stunden durchlaufen und führt dabei jeweils zu einem Anstieg der befallenen Erythrozyten um das 3-4-fache. In diesem Zyklus bildet sich aus dem eingedrungenen Merozoiten eine Ringform, dann Trophozoiten mit besonders hoher Stoffwechselleistung, gefolgt von Schizonten, in denen schon die Abtrennung in einzelne Merozoiten sichtbar wird. Die 16 Merozoiten zerstören den Erythrozyten durch Lysis der Membran und befallen erneut rote Blutzellen. Bei *P. falciparum* liegt keine vollkommen synchrone Entwicklung vor. Einen gewissen synchronisierenden Effekt haben jedoch vermutlich die Fieberschübe (Kwiatkowski 1989). Parallel zu den Ringstadien bilden sich aus Merozoiten zu einem gewissen Prozentsatz sexuelle Stadien, weibliche und männliche Gametozyten, aus. Der Anteil dieser Stadien, die als einzige nach einem Stich in der Mücke überleben und somit die Transmission sichern, ist abhängig von der Streßsituation des Parasiten (Meuwissen und Ponnudurai 1988; Buckling *et al.* 1999) und damit vor allem von Sauerstoffkonzentration, Temperatur und menschlichem Immunsystem, bzw. Chemotherapeutika. In der Mücke entwickeln sich diese Gamonten zu Gameten weiter und bilden nach der Befruchtung eine Zygote, aus der ein Ookinet entsteht.

Dieses längliche Stadium ist befähigt, durch die peritrophische Membran in die Epithelzellen des Mückendarmes einzudringen und siedelt sich dort zwischen Epithelzellen und Basalmembran an. Durch nachfolgende Meiose und mehrere Endomitosen ergeben sich Tochterkerne, die sich in der Oozyste genannten Struktur zu Sporozoiten ausbilden. Nachdem die Hülle der Oozyste, welche einen Durchmesser von 1 mm erreichen kann, geplatzt ist, wandern die Sporozoiten über die Hämolymphe in die Speicheldrüse ein, so daß sie beim nächsten Saugakt wieder übertragen werden und sich der Kreis schließt.

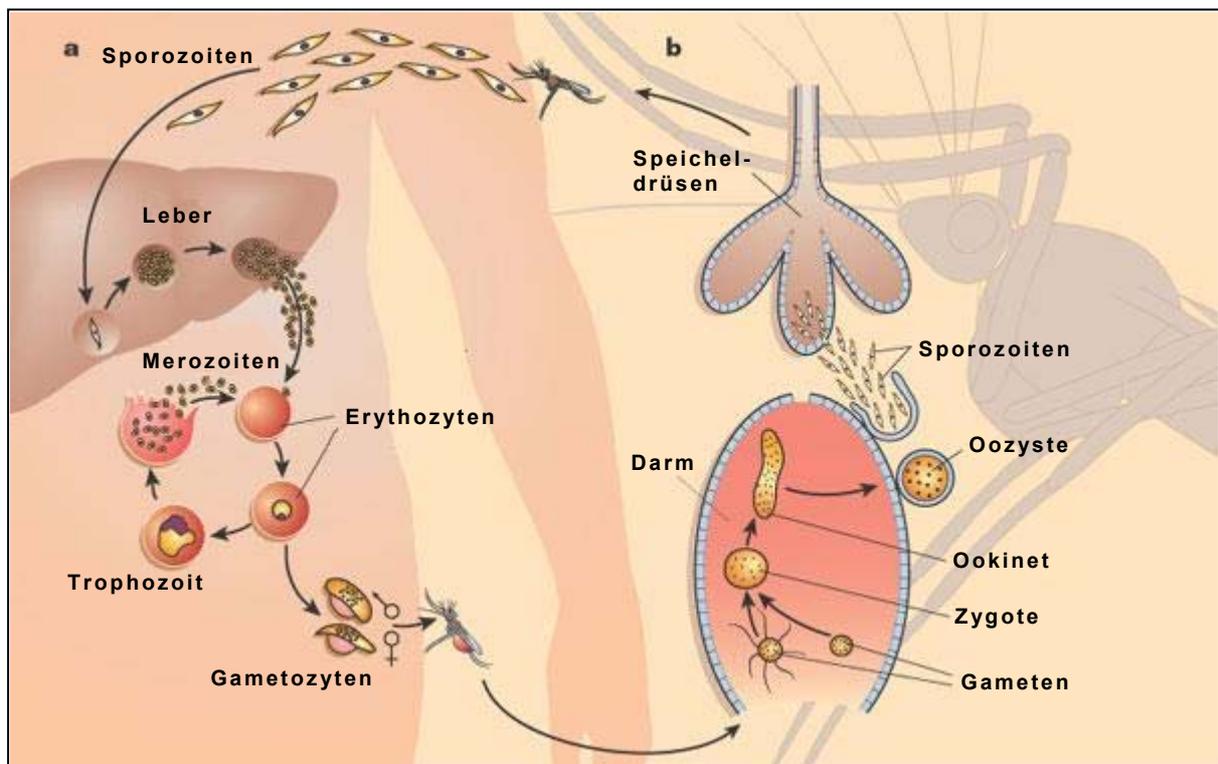
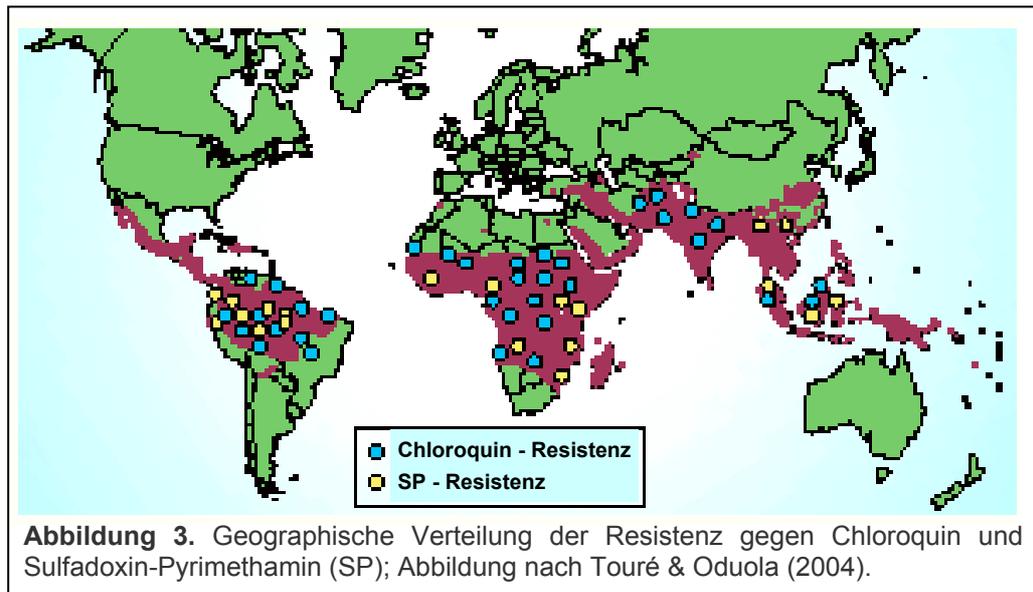


Abbildung 2. Lebenszyklus des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* in der Anopheles-Mücke und im Menschen. Abbildung nach D. Wirth (Wiesner *et al.* 2003), verändert. **a**, Durch den Stich einer infizierten Mücke werden Sporozoiten injiziert. Diese wandern zur Leber, wo sie nach Durchlaufen verschiedener Stadien Merozoiten bilden. Die Merozoiten befallen rote Blutkörperchen und vermehren sich über das Trophozytenstadium. Ein Teil der Merozoiten entwickelt sich im Erythrozyten zu Gametozyten. **b**, Sticht eine weitere Mücke den infizierten Menschen, nimmt sie Blut auf, welches auch Gametozyten enthält. Diese entwickeln sich zu männlichen und weiblichen Reproduktionszellen (Gameten), verschmelzen im Darm der Mücke miteinander und bilden eine Zygote. Die Zygote wächst nun zu einem Ookineten heran, welcher nach Passage durch die Darmwand zu einer Sporozoiten-gefüllten Oozyste wird. Nach Aufplatzen der Oozyste wandern die Sporozoiten in die Speicheldrüsen der Mücke ein und der Zyklus kann von neuem beginnen.

1.1.2 Medikamente und Resistenz



Da die Malaria in Koevolution bereits mit der Sesshaftwerdung der Menschheit entstand (Hume *et al.* 2003), wurde die Krankheit schon früh beschrieben und Behandlungsmethoden entwickelt (Etkin 2003). Obwohl heute eine Anzahl von Malariatherapeutika verfügbar ist, werden neue Bekämpfungsstrategien dringend benötigt, da die Häufigkeit der Resistenzen gegen die verwendeten Medikamente kontinuierlich ansteigt (Hayton und Su 2004) und die geographische Verbreitung der Krankheit wieder zunimmt (Hartl 2004). Tatsächlich wird der enorme Anstieg der Todesfälle in den letzten Jahren auf die zunehmende Resistenz gegenüber den auf wenigen Strategien basierenden Therapeutika zurückgeführt (Talisuna *et al.* 2004). Um die Entwicklung von Resistenzen zu vermeiden, werden Kombinationstherapien angeraten (Hastings und D'Alessandro 2000), wobei hierfür idealerweise voneinander unabhängige Zielmoleküle angegriffen werden. Effektiv möglich ist derzeit ein kurzfristiger Schutz durch Prophylaxe mit Chemotherapeutika (Chambers 2003; Taylor und White 2004).

Trotz intensiver Forschungsarbeiten und erster Erfolge (Moorthy *et al.* 2004) kann ein entscheidender Beitrag zur Lösung des Problems durch eine Vakzine in absehbarer Zukunft nicht erwartet werden (Taubes 2000); Hauptgründe dafür liegen im Polymorphismus der Oberflächenantigene von *Plasmodium falciparum* und in der Provokation immunologisch ineffektiver Antikörper (Butler *et al.* 1997). Die in den letzten Jahren hoffnungsvoll getesteten Impfstoffe boten nur einen kurz- bis mittelfristigen Schutz und sind daher in erster Linie für Touristen und ähnliche Personengruppen geeignet. Das amerikanische Militär erhofft sich maximal einen 95% wirksamen Schutz über einen Zeitraum von 6 Monaten, der für den Einsatz von Soldaten als ausreichend angesehen wird (Taubes 2000). Daher wird der Erfolg bei

der Malariabekämpfung entscheidend von der Verfügbarkeit neuer Therapeutika abhängen.

1.1.3 Molekulare Eigenschaften der Adenylatkinasen

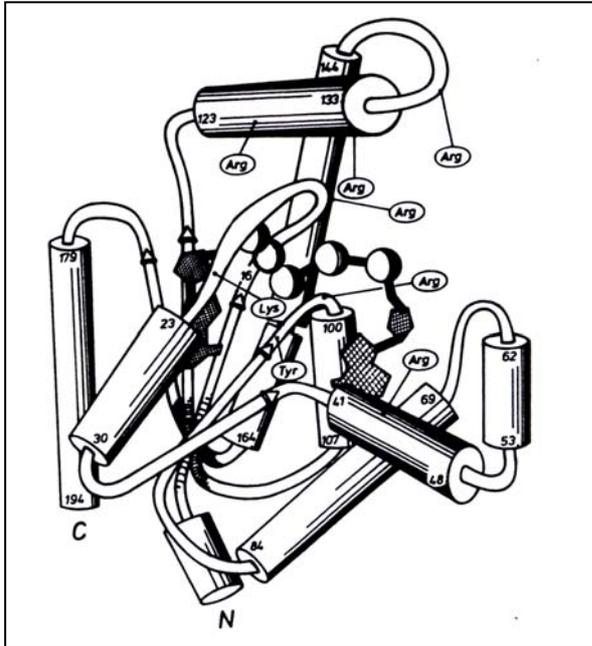


Abbildung 4. Darstellung der Struktur der humanen Myokinase (AK1). Abgebildet sind MgATP und AMP in ihren Bindungstaschen im Zentrum des Moleküls, wobei die Phosphatreste als Kugeln dargestellt sind. Abbildung nach Luz *et al.* (1990).

Adenylatkinasen sind kleine, meist monomere Proteine von ca. 21 bis 27 kDa, die bisher aus menschlichen Geweben, aus Schwein (Sato *et al.* 1982), Huhn (Watanabe und Kubo 1982), *Escherichia coli* (Barzu und Michelson 1983), *Trichomonas vaginalis* (Declerck und Muller 1987; Dinbergs und Lindmark 1989), Reis (Kawai und Uchimiya 1995), Hefe (Chiu *et al.* 1967) und anderen Organismen isoliert wurden. Sie wurden mithilfe verschiedener Methoden einschließlich Proteinsequenzierung (Schulz *et al.* 1986), Röntgenstrukturanalyse (Schulz *et al.* 1974; Schulz und Schirmer 1974; Schulz 1987; Dreusicke und Schulz 1988; Schulz 1991; Muller und Schulz 1992), NMR-Spektroskopie (Vetter *et al.* 1991) und molekularbiologischer Techniken (Brune *et al.* 1985; Matsuura *et al.* 1989; Nakazawa *et al.* 1990; Lange *et al.* 1994) intensiv untersucht. In Säugern sind bisher fünf Isoenzyme der AK beschrieben: (i) die zytoplasmatische AK1 (EC 2.7.4.3), die die am besten charakterisierte AK repräsentiert, (ii) die zwischen den beiden Mitochondrienmembranen lokalisierte AK2 und (iii) die AK3, ein mitochondriales Matrix-Enzym (Schulz *et al.* 1986). Zudem wurden (iv) die AK4, welche hauptsächlich im Zentralnervensystem (Yoneda *et al.* 1998) und (v) die AK5, welche ausschließlich im Gehirn vorkommt (Van Rompay *et al.* 1999) beschrieben. Die ATP-abhängigen Isozyme AK1 und AK2 (damit wohl auch AK4 und AK5) können sich gegenseitig ersetzen und sind invers reguliert (Tanabe *et al.* 1993). 1998 erfolgte eine Änderung der Bezeichnung des bis dahin AK3 genannten Enzyms. Es hatte sich herausgestellt,

dass dieses Enzym gewebsspezifisch reguliert war und ein sehr ähnliches Haushaltsgen existierte. Die ehemalige AK3 wurde in AK4 umbenannt und das Haushaltsgen erhielt die Bezeichnung AK3.

Die vornehmlich am Isozym 1 geklärte Struktur der Adenylatkinasen besteht aus zwei Bindungstaschen für die beiden Substrate (Von Zabern *et al.* 1976), von denen das Monophosphat nach Bindung von der NMP-Bindungsdomäne, und das NTP von einer flexiblen Schleife (Schlauderer *et al.* 1996) wie ein Deckel (LID) wasserfrei gehalten werden. Diese Konformationsänderungen ergeben sich aus dem "induced-fit"-Mechanismus (Egner *et al.* 1987; Schulz *et al.* 1990) und bedingen eine Bewegung des flexiblen Armes um mehr als 30 Angström (Schulz 1992). Dementsprechend ergeben sich für die Kristallstruktur des Enzyms eine "offene" und eine "geschlossene" Form (Schulz *et al.* 1990).

	AK1	AK2	AK3	AK4	AK5
Lokalisation	Cytosol	Cytosol und Intermembranraum der Mitochondrien	Mitochondrienmatrix	Mitochondrienmatrix	Cytosol
Größe	194 AS 21,7 kDa	239 AS 26,1 kDa	227 AS 25,6 kDa	223 AS 25,5 kDa	198 AS 22,1 kDa
Vorkommen	Gehirn, Muskel, Rote Blutzellen	Leber, Herz, Niere, Lunge	Gehirn, Leber, weitere Gewebe	Gehirn, Leber	Gehirn
Substrat (NTP)	ATP:AMP	ATP:AMP	Nicht experimentell bestimmt	GTP:AMP	ATP:AMP GTP:AMP
Besonderheiten	Muskeltyp, auch Myokinase	pH-Optimum von 5.8 für AMP → ADP und von 7.5-8.0 für die Reaktion ADP → AMP	Haushaltsgen 1998 erfolgte Umbenennung der bisherigen AK3 in AK4 (hier berücksichtigt). Zwischen beiden bestehen große Homologien.	Gewebsspezifische Regulation	

Tabelle 2. Übersicht über die humanen Adenylatkinasen

Bei den parasitischen Protozoen sind AK Isozyme bisher in Leishmanien (Hart und Opperdoes 1984; Villa *et al.* 2003), Babesien (Silins *et al.* 1996) und Trypanosomen (McLaughlin 1985) beschrieben. Die erste Klonierung und biochemische Charakterisierung wurde vor kurzem für die AK aus *Leishmania donovani* publiziert

(Villa *et al.* 2003). An den Babesien beschrieb Anette Traxler die ATP-AMP-abhängige AK im Rahmen ihrer Dissertation (Traxler 1997). Die mit diesem Enzym nicht identische, im Genomprojekt aufgrund von Sequenzähnlichkeiten NMP-Kinase genannte, putative AK besitzt einen Zink-Finger (Silins *et al.* 1996).

1.1.4 Energiestoffwechsel der *Apicomplexa*

Der Energiestoffwechsel der *Apicomplexa* hat in den letzten Jahren besonderes Interesse geweckt. Das zunächst hohe Interesse in den 80er Jahren konzentrierte sich spätestens seit den 90er Jahren auf den Redoxstoffwechsel, der dank verfügbarer Medikamente als idealer Angriffspunkt galt und bis heute im Mittelpunkt der Malariaforschung steht (Becker *et al.* 2004). Der Energiestoffwechsel der Blutstadien ist lediglich in Ansätzen bekannt. Hauptenergiequelle des Parasiten ist hier die Glykolyse zum Abbauprodukt Laktat, d.h. es wird, ebenso wie in der umgebenden Wirtszelle, der anaerobe Stoffwechsel beschränkt. In *P. falciparum*-parasitierten Erythrozyten liegt der Glukoseverbrauch um einen Faktor von 100 höher als in nicht infizierten Zellen (Roth *et al.* 1988). Diese Zahl reflektiert die enorme Wachstumskapazität der Erreger, ihre Fähigkeit zur DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese und zur Produktion von 16 bis 32 Merozoiten innerhalb von 48 Stunden. Für diese effektive Vermehrung ist die Adenylatkinase (AK; $\text{ATP} + \text{AMP} \leftrightarrow 2 \text{ADP}$, bzw. $\text{AK3: GTP} + \text{AMP} \leftrightarrow \text{GDP} + \text{ADP}$) essentiell. AK ist das einzige Enzym, das AMP zu ADP regenerieren kann (Lipman *et al.* 1989) und stellt somit eine zentrale Verbindung zwischen biochemischen Synthesewegen und Energiestoffwechsel dar. Weil AMP während der Protein- und RNA-Synthese in großen Mengen anfällt, ist die AK für Transkription und Translation unabdingbar; sie gewährleistet außerdem, daß intrazellulär $[\text{ATP}] : [\text{ADP}] : [\text{AMP}]$ sich wie 2500 : 50 : 1 verhalten, d. h. daß Konzentrationsverhältnisse herrschen, die essentiell für die wechselseitige Anpassung zwischen Energieversorgung und Energieverbrauch physiologischer Prozesse sind (Lipmann 1981). In dieser Richtung wirkt auch das sogenannte AK-Phosphortransfer-Netzwerk aus hintereinander geschalteten Adenylatkinasen, welches Signale der Mitochondrien über den Energiezustand der Zelle an membranständige, ATP-sensitive Kanäle weiterleitet (Dzeja *et al.* 1998; Carrasco *et al.* 2001). In *Mammalia* erfolgt dies im Zusammenspiel mit dem Kreatinkinase-System, während bei niederen Organismen die Argininkinase diese Aufgabe übernimmt (Watanabe und Flavin 1976). An den Mitochondrien erleichtert die AK den Export von ATP (Bandlow *et al.* 1988) durch Minimierung des Nukleotidfluxes durch die Membranen in aktiven Zellen (Tomasselli und Noda 1980; Dzeja *et al.* 1985). Als Schlüsselsensor des zellulären Energiestoffwechsels wird

häufig auch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) bezeichnet. Diese soll abhängig vom AMP/ATP-Verhältnis die ATP-Gewinnung und Nutzung in verschiedenen Prozessen regulieren (Hardie und Hawley 2001; Hardie 2003). Allerdings wurde an der Kartoffel gezeigt, daß allein eine gentechnisch veränderte AK mit geringerer spezifischer Aktivität zu einem Anstieg der Stärkeeinlagerung um mindestens 60% führen kann (Regierer *et al.* 2002). Dies weist zudem darauf hin, daß die Nutzung der Energie stärker von den verbrauchenden, als von den produzierenden Prozessen abhängig ist.

Trotz der enormen Glykolyseleistung wiesen einige Beobachtungen schon früh auf weitere Wege der Energiegewinnung hin. Zur Kultivierung des Parasiten ist Sauerstoff nötig (Trager und Jensen 1976) und die Energieversorgung des Parasiten scheint besser als die des Erythrozyten (Kanaani und Ginsburg 1989), was nur durch weiteren Abbau nach der Glykolyse erreicht werden könnte. Andererseits fand sich kein Pasteur-Effekt weshalb eine konventionelle Atmung unwahrscheinlich ist (Jacobasch *et al.* 1990). Zudem wirkt Phosphoenolpyruvat im Parasiten aktivierend, im Erythrozyten dagegen hemmend auf die Glykolyse (Jacobasch *et al.* 1990). Man geht davon aus, daß auch der erhöhte Energiebedarf des parasitierten Erythrozyten teilweise durch eine Bereitstellung von ATP durch den Parasiten gedeckt wird (Kanaani und Ginsburg 1989; Weigel 1993). Die besonders großen ATP-Mengen benötigt die Wirtszelle zudem i) zur Aktivierung der Kationenpumpen, um die beobachtete Erhöhung der Kationenpermeabilität zu erreichen (Matsuura *et al.* 1989; Nakazawa *et al.* 1990), ii) zur vermehrten Glutathionsynthese zur Bewältigung des durch den Parasiten und das Immunsystem verursachten oxidativen Stresses (Feldhaus *et al.* 1975) und iii) für die Synthese von CoenzymA, welches die Wirtszelle wahrscheinlich dem Parasiten zur Verfügung stellt (Trager und Jensen 1976). In diesem integrierten Wirt-Parasit-System spielen die Adenylatkinasen der verschiedenen Kompartimente eine entscheidende Rolle für den Austausch von Adeninnukleotiden und Energie (Kanaani und Ginsburg 1989), wobei sogar postuliert wird, daß die Umsetzung von ADP zu ATP in diesem System von der Adenylatkinase limitiert wird (Kanaani und Ginsburg 1989; Jacobasch *et al.* 1990). Auch damit würde der AK eine besondere Schlüsselrolle zugewiesen.

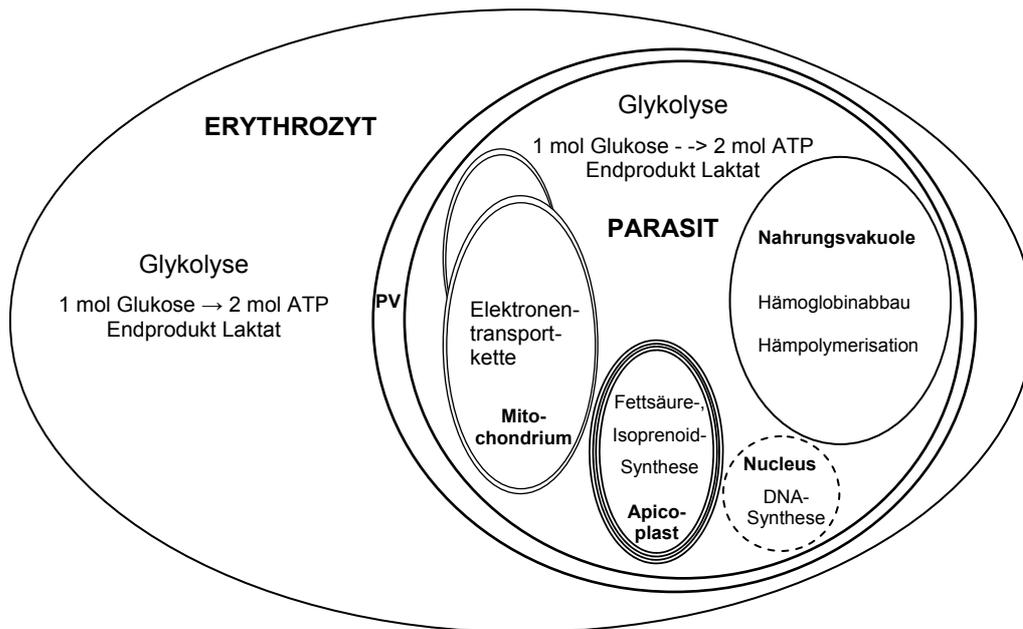


Abbildung 5. Schematische Darstellung eines *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten mit der intrazellulären Lokalisation verschiedener Stoffwechselwege. PV steht für die parasitophore Vakuole. Nach Wiesner *et al.* (2003), verändert.

Die Untersuchung der Wirkmechanismen neu ins Blickfeld rückender Therapeutika zeigte, daß Verbindungen, die Gametozyten abtöten und so die Transmission verhindern, meist über die Mitochondrien wirken. Hierzu gehören beispielsweise Artemisinin und Atovaquone (Vaidya 2004). Das Coenzym Q nachahmende Atovaquone blockiert den Elektronentransport durch den Cytochrome bc1-Komplex (Srivastava 1999; Vaidya, 2000) und weist damit auf die Notwendigkeit der Elektronentransportkette für Plasmodien hin.

Irreführend waren erste genetische Untersuchungen, da das Apicoplastengenom zunächst den Mitochondrien zugerechnet wurde. Erst als das 5kb-Fragment als Mitochondriengenom zweifelsfrei identifiziert worden war, wurde klar, daß es sich bei dem Plasmodienorganell um eines der am höchsten spezialisierten mit minimaler Ausstattung handeln muß (Williams und Keeling 2003). Demnach wären zahlreiche Funktionen, die üblicherweise von den Mitochondrien übernommen werden, in andere Kompartimente ausgelagert. Interessant ist in diesem Hinblick der Vorschlag einer möglichen ATP-Generierung durch umgekehrtes Arbeiten der V-ATPase im Zusammenhang mit der VPPase (Ginsburg 2002), wie es bereits bei *Arabidopsis thaliana* beschrieben wurde. Vielleicht hat bei Plasmodien im Laufe der Evolution das aufgenommene, statt des aufnehmenden Bakteriums diese Funktion aufgegeben.

1.2 Zellulärer Redoxstoffwechsel

Mit dem Wechsel von der reduzierenden zur oxidierenden Atmosphäre mußten sich die Zellen in der Evolution an die Gegenwart von Sauerstoff und den damit verbundenen oxidativen Streß anpassen (Fahey 1977). Oxidativer Streß bezeichnet eine Störung der Balance zwischen der oxidativen Belastung, die von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidradikalen, Wasserstoffperoxiden und Hydroxylradikalen ausgeht, und der antioxidativen Kapazität der Zelle (Sies und Cadenas 1985; Sies 1997). Ein Übergewicht an oxidativen Stressoren vermag die Zelle auf vielfältige Weise, wie Enzyminaktivierung (Videla *et al.* 1990), Angreifen von Nukleinsäuren (Higuchi 2003) und Lipidperoxidation (Videla und Fernandez 1988; Cederbaum 1989) zu schädigen. Zur Abwehr reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies wurden im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt. Besonders wichtig und gut untersucht sind hierbei die Enzymsysteme um die Thioredoxinreduktase mit Thioredoxin und die Glutathionreduktase mit Glutathion. Beide Enzyme gehören zu den Oxidoreduktasen und übertragen Reduktionsäquivalente vom NADPH auf ihr Substrat, welches dann in nachfolgenden Reaktionen der Entgiftung obengenannter ROS dient. Neben Glutathion- und Thioredoxinreduktasen sind noch zahlreiche weitere Reduktasen an diesen Entgiftungsprozessen beteiligt, wie beispielsweise die Carbonylreduktasen, die toxische Carbonylverbindungen in ihre zugehörigen Alkohole reduzieren (s.u.).

1.2.1 Die Glutathionreduktase (GR)

Gleichung: $\text{GSSG} + 2 \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{GSH} + 2 \text{NADP}^+$

Im Zentrum des Glutathionsystems steht die Glutathionreduktase (GR) mit ihrem Substrat Glutathion (Schirmer *et al.* 2002). Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin) ist ein Tripeptid und das in den meisten Zellen am stärksten vertretene Antioxidans, dessen Konzentration im millimolaren Bereich liegen kann. Die antioxidativ wirksame Form des Glutathions ist das reduzierte GSH, die oxidierte Form ist GSSG. Zur Aufrechterhaltung des stark reduzierenden Milieus der Zellen beträgt das Verhältnis zwischen GSH und GSSG üblicherweise etwa 100:1 und verändert sich auch in Mangelsituationen nur wenig. Das Flavoenzym Glutathionreduktase gehört zu den Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen und entfaltet seine Aktivität als Homodimer. Jede Untereinheit besteht aus drei Domänen, der FAD-Domäne, in welcher FAD als prosthetische Gruppe vorliegt, der NADP^+ -Domäne, welche NADPH bindet, und der Zwischen-domäne, welche mit der FAD-Domäne der anderen Untereinheit die Glutathion-bindungsstelle bildet. Während der Katalyse werden

Reduktionsäquivalente von NADPH zunächst auf den Isoalloxazinring des gebundenen FAD und von dort auf oxidiertes Glutathion übertragen (Schirmer *et al.* 1987; Pai *et al.* 1988; Williams 1992). Da die Glutathionbindungsstelle von beiden Untereinheiten gebildet wird, sind Moleküle, welche eine Dimerisierung verhindern Inhibitoren der GR (Sarma *et al.* 2003).

1.2.2 Die Thioredoxinreduktase (TrxR)

Gleichung: $\text{Trx-S}_2 + 2 \text{NADPH} \rightarrow \text{Trx-(SH)}_2 + 2 \text{NADP}^+$

Zentrum des Thioredoxinsystems ist die Thioredoxinreduktase (TrxR). Neben ihrem namengebenden Substrat reduziert die humane TrxR Dehydroascorbinsäure (zu Ascorbinsäure), Lipidhydroperoxide (zu Alkoholen), α -Liponsäure (zu Liponsäure) und Ubichinon (Nalvarte *et al.* 2004, Gromer *et al.* 1999). Thioredoxin ist ein hochkonserviertes Protein von ca. 12 kDa (Holmgren 1985). Es überträgt die von der TrxR aufgenommenen Reduktionsäquivalente auf die Ribonukleosiddiphosphat-reduktase, welche dann die Nukleotide für die DNA-Synthese reduziert, oder auf die thioredoxinabhängigen Peroxidasen, welche über ihr Substrat Peroxiredoxin verschiedene Peroxide abbauen (Arner und Holmgren 2000; Becker *et al.* 2000). Zudem übt Thioredoxin regulatorische Funktionen aus (Buchanan *et al.* 1994). Oxidiert (TrxS_2) kann es über Erhöhung der Apoptose-stimulierenden Kinase 1 (ASK1) zur Apoptoseinduktion führen. Im reduzierten Zustand (Trx(SH)_2) erniedrigt Trx ASK1, hemmt damit die Apoptose (Saitoh *et al.* 1998) und fördert die Transkription durch Aktivierung des Aktivatorproteins 1 (Hirota *et al.* 1997; Wei *et al.* 2000; Harper *et al.* 2001). Desweiteren wirkt reduziertes Thioredoxin auf das Immunsystem, indem es die Synthese der Interleukine 1, 2, 6, 8 und von $\text{TNF}\alpha$ reguliert, sowie im Cytosol NF- κ B hemmt (Hashimoto *et al.* 1999; Yoshida *et al.* 1999).

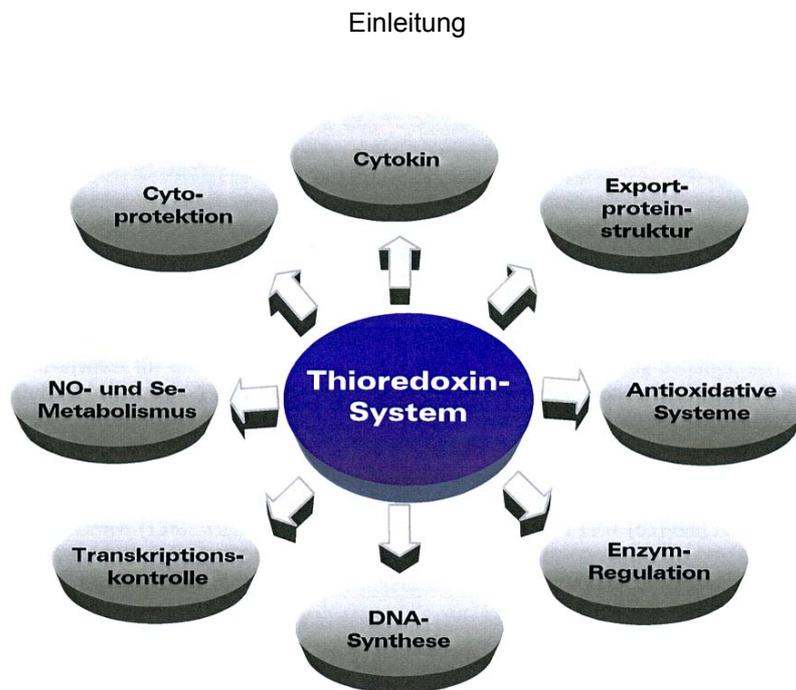


Abbildung 6. Funktionen des Thioredoxin-Systems. Darstellung aus Kanzok *et al.* (2002).

Die Thioredoxinreduktase als Zielmolekül

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen im Metabolismus wird die Thioredoxinreduktase schon lange als Ziel einer rationalen Medikamentenentwicklung propagiert. Reduziertes Thioredoxin wirkt als autokriner Wachstumsfaktor (Gasdaska *et al.* 1994; Gasdaska *et al.* 1996), Chemokin ("chemoattractant") (Bertini *et al.* 1999) und zusammen mit den Interleukinen 1 und 2 (Wakasugi *et al.* 1990) in verschiedenen Tumorerkrankungen. Zudem stützen biochemische und klinische Erkenntnisse die These eines Anteils des TrxR-Systems an der Pathophysiologie chronischer Krankheiten wie rheumatoider Arthritis (Yoshida *et al.* 1999), Sjögens Syndrom und AIDS (Mustacich und Powis 2000). Dementsprechend besteht die Wirkung einiger Medikamente in der Tumor- und Rheumatherapie beim Menschen unter anderem in einer Hemmung der Thioredoxinreduktase (Gromer *et al.* 2004). Außerdem zeigte sich eine Beteiligung des Enzyms an Medikamentenresistenzen (Becker *et al.* 2000). Da sich die Thioredoxinreduktasen verschiedener Spezies im Katalysemechanismus stark unterscheiden, können spezifisch entwickelte Inhibitoren auch zur Medikamentenentwicklung gegen bakterielle und parasitäre Erkrankungen beitragen. Besonders gut beschrieben ist in diesem Zusammenhang das Thioredoxinssystem aus *Plasmodium falciparum* (Kanzok *et al.* 2002, Rahlfs *et al.* 2002, Becker *et al.* 2000). Da auch die Wirkung zahlreicher Insektizide auf oxidativem Stress, bzw. der Unterdrückung antioxidativer Mechanismen in den Insekten beruht (Rekka *et al.* 1996), erscheint eine Nutzung der Thioredoxinreduktase als Angriffspunkt zur Vektorbekämpfung sinnvoll.

1.2.3 Die Carbonylreduktase

Carbonylreduktasen sind an zahlreichen Reaktionen des Zellmetabolismus, wie beispielsweise Steroidmetabolismus, Medikamentenentgiftung und Medikamentenresistenz, Mutagenese und Carcinogenese, sowie Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Forrest und Gonzalez 2000). Carbonylverbindungen sind zytotoxische, metabolische Zwischenprodukte, die vor allem durch Oxidation von Aminosäureresten entstehen. Ihre Entgiftung erfolgt auf zwei alternativen Wegen. Carbonyle können entweder von Aldehyddehydrogenasen oxidiert, oder von Carbonylreduktasen in ihre Alkohole überführt werden. Eine Zunahme der Carbonylverbindungen gilt als Biomarker für oxidativen Stress (Chevion *et al.* 2000) und wird im Zusammenhang mit verschiedensten Krankheiten wie Krebs, Arteriosklerose, Diabetes mellitus und neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert (Beckman und Ames 1998). Nachgewiesen wurde ein Anstieg der Carbonylverbindungen zum Beispiel bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Down-Syndrom (Balcz *et al.* 2001; Perry *et al.* 2002). In Patienten beider Krankheiten waren zudem die Proteinkonzentrationen von Alkoholdehydrogenase und Carbonylreduktase erhöht (Balcz *et al.* 2001). Enzyme, die in der Lage sind Carbonylverbindungen zu entgiften, sind als Ansatzpunkte therapeutischer Interventionen im Gespräch (Shapiro 1998; Picklo *et al.* 2002). Interessant ist, daß das Gen für die Carbonylreduktase im Menschen auf Chromosom 21, dem Ort der Chromosomenaberration des Down-Syndroms (Trisomie 21), lokalisiert ist. Im gesunden Organismus entstehen Carbonylverbindungen vermehrt aufgrund von Alterungsprozessen. Carbonylreduktasen gehören zu den Kurzketten-Dehydrogenasen (short-chain dehydrogenases, SDRs), einer Familie, die durch nur wenige konservierte Aminosäuren in der Primärsequenz charakterisiert ist. Hochkonserviert hingegen ist, mit Ausnahme des C-Terminus, die Struktur der Carbonylreduktasen. SDRs zeigen eine Ein-Domänen-Untereinheit mit 7-8 β -Faltblättern (Jornvall *et al.* 1995). Die meisten der zugehörigen Enzyme liegen als Dimer oder Tetramer vor, mit einer starken Interaktion zwischen den Untereinheiten. Diese ist in beiden Untereinheiten gleich und beinhaltet zwei lange α -Helices.

1.2.4 Oxidativer Stress und Alterung

Eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und Alterungsprozessen wurde erstmals 1956 von D. Harman vorgeschlagen. Seine "*Free Radical Theory of Aging*" genannte Theorie postuliert, daß die von Zellen kontinuierlich produzierten freien

Radikale die Zelle laufend schädigen und schließlich zum Tod der Zelle führen. Werden auf diese Weise zahlreiche Zellen eines Organismus getötet oder geschädigt, so altert der Organismus (Harman 1956). Eine Weiterführung dieser Theorie besagt, daß Alterungsprozesse - zumindest teilweise - durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von Oxidantien, sowie der antioxidativen Abwehr und Reparatur verursacht werden (Stadtman 1992; Sohal und Weindruch 1996; Beckman und Ames 1998). Die maximale Lebenserwartung ließ sich durch Gabe von Antioxidantien, und damit durch Erhöhung des antioxidativen Potentials nicht beeinflussen, sondern nur die Wahrscheinlichkeit, dieses für Menschen bei 115-120 Jahren liegende Maximum auch zu erreichen. Daher entwickelte sich die mitochondriale Theorie des Alterns, wonach das genetisch festgelegte Alter von den Mitochondrien, bzw. dem oxidativen Stress derselben und damit der Schädigung der mitochondrialen DNA bestimmt wird (Wei *et al.* 2001). Eine Verminderung des oxidativen Stresses in den Mitochondrien durch Nahrungsrestriktion ("*dietary restriction*") vermag die maximale Lebensdauer von Versuchstieren zu verlängern (Lipman *et al.* 1989; Beckman und Ames 1998). Nach der weiter gefassten oxidativen Stress-Hypothese des Alterns ("*oxidative stress hypothesis*") nimmt auch das Niveau des oxidativen Stresses mit dem Alter zu (Orr *et al.* 1992).

1.2.5 Der Redoxstoffwechsel in *Drosophila*

Zu den 85.000 Arten der Dipteren (Zweiflügler) gehören die Mücken, wie beispielsweise *Anopheles* und Fliegen, wie beispielsweise *Drosophila*. *Drosophila* wird allgemein als Modellorganismus geschätzt, besonders günstig ist dies im Falle der die Malaria übertragenden *Anopheles*-Mücken. Zunächst auf Proteinebene (z.B. Glutathion S-Transferase (Ranson *et al.* 1997), später auch bei Untersuchungen des Genoms und der phylogenetischen Verwandtschaft, zeigten sich große Ähnlichkeiten zwischen beiden Insekten, so daß die Nutzung von *Drosophila* als Modellorganismus für den Malariüberträger gerechtfertigt erscheint. Zudem konnte gezeigt werden, daß nach erfolgreicher Einbringung von Plasmodien-Ookineten die Ausreifung zu neuen Sporozoiten in *Drosophila melanogaster* analog zur Entwicklung in *Anopheles gambiae* abläuft (Schneider und Shahabuddin 2000). Sogar die Wirt-Parasit-Interaktionen verlaufen in Fliege und Mücke ähnlich und ermöglichen eine weitere Charakterisierung der Ko-Evolution von Plasmodien und ihrem Vektor (Zheng 1999). Eine Infektion mit Plasmodien stellt auch für die *Anopheles*-Mücke eine Beeinträchtigung dar (Anderson *et al.* 2000; Rivero und Ferguson 2003). Insofern besäße eine übertragungsunfähige, plasmodienresistente Mücke gegenüber den anderen ihrer Art einen Selektionsvorteil.

Insekten besitzen eine ganze Reihe antioxidativer Enzyme, von denen beispielsweise Superoxiddismutase (Bartosz *et al.* 1979; Lee *et al.* 1981; Massie *et al.* 1981), Catalase (Best-Belpomme und Ropp 1982; Orr *et al.* 1990; Orr *et al.* 1996; Mockett *et al.* 2003), sowie Glutathion S-Transferase (Singh *et al.* 2000; Singh *et al.* 2001; Sawicki *et al.* 2003) charakterisiert wurden (Felton und Summers 1995) und zahlreiche niedermolekulare Antioxidantien (Felton und Summers 1995), über die bisher erst wenige Studien vorliegen. Oxidativer Stress ist für Insekten, die stark der UV-Strahlung ausgesetzt sind, ein entscheidender Punkt für die Lebensdauer (Orr *et al.* 1992).

Die Thioredoxinreduktase von *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila* wurde bereits 1997 eine Disulfid-Oxidoreduktase identifiziert und als Glutathionreduktase bezeichnet (Candas *et al.* 1997). Das Gen ist auf zwei Exons verteilt, von denen das erste nur für 5 Aminosäuren kodiert (Candas *et al.* 1997). Auch eine Überexpression des Gens wurde mittels eines genomischen Abschnitts von 10 kb, welcher das Gen der Reduktase enthielt, getestet (Mockett *et al.* 1999). Transgene Fliegen zeigten unter starkem oxidativen Streß von 100% Sauerstoff, nicht jedoch unter Normalbedingungen, eine längere Lebensdauer als Kontrolltiere. Überraschenderweise war in dieser Studie (Mockett *et al.* 1999) kein Effekt auf die zuvor beschriebene Zunahme oxidierten Glutathions mit der Lebenszeit (Sohal *et al.* 1990) zu verzeichnen.

Aus der Familie der Short-chain-Dehydrogenases war bis zum Jahr 2000 in *Drosophila* hauptsächlich die Alkoholdehydrogenase beschrieben worden (Chambers *et al.* 1978; Villarroya *et al.* 1989; McKinley-McKee *et al.* 1991; Krook *et al.* 1992). Daneben zeigte sich eine geschlechtsspezifische Expression für die Pigmentzell-Dehydrogenase (Brunel *et al.* 1998). Ein zu den Carbonylreduktasen gehörendes Enzym war noch nicht identifiziert. Bekannt war jedoch die Entgiftung des Insektizids Metyrapone mittels Reduktion des Carbonyls durch eine Kurzketten-Dehydrogenase in der menschlichen Leber (Rekka *et al.* 1996).

1.3 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag im Kampf gegen die Malaria zu leisten. Dabei sollten molekularbiologische und biochemische Methoden zur Identifizierung und Validierung möglicher Angriffspunkte im Stoffwechsel des Erregers *Plasmodium falciparum* und des Überträgers *Anopheles gambiae*, bzw. des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* genutzt werden.

Als zentrale Enzyme des Energiestoffwechsels sollten - im Hinblick auf mögliche Zielmoleküle einer rationalen Medikamentenentwicklung - putative Adenylatkinasen aus *Plasmodium falciparum* in der Datenbank des Genomprojektes identifiziert und danach kloniert werden. Eine folgende biochemische und kinetische Charakterisierung sollte Aktivität der heterolog exprimierten Proteine zeigen, die Enzyme mit den humanen AK-Isozymen vergleichen und zusammen mit Inhibitorstudien eine potentielle Nutzbarkeit als Zielmoleküle evaluieren. Falls möglich sollte versucht werden, die Enzyme zu kristallisieren, um Strukturunterschiede zu den menschlichen Isozymen herauszuarbeiten und nutzen zu können.

In *Drosophila*, als Modell für den Malariavektor *Anopheles*, sollten - aufbauend auf der Arbeit von Stefan Kanzok (2001) - das Gen der GR/TrxR und das Thioredoxinsystem als Ganzes weiter charakterisiert und die Ergebnisse der Arbeiten von Mockett (Mockett *et al.* 1999) und Orr (Orr *et al.* 1992) ausgebaut werden. Dabei sollte zudem das gerade identifizierte Gen, dessen erstes Exon im Intron der DmTrxR-1 liegt, überexprimiert und das heterologe Genprodukt biochemisch charakterisiert und kristallisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bezugsquellen der Chemikalien

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

Medien und Antibiotika *E. coli*

Agar	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, England
Pepton	GIBCO - Life Technologies, Groningen, Holland
Antibiotika	Roth, Karlsruhe

Medien *P. falciparum*

Medien, Hypoxanthin, etc.	GIBCO - Life Technologies, Groningen, Holland
---------------------------	--

Enzyme

Die humane Adenylatkinase war in *E. coli* in Anlehnung an das Protokoll von Kim *et al.* (1989) überexprimiert und aufgereinigt worden. Das *Drosophila* Trx1 war von Stefan Kanzok im Rahmen seiner Doktorarbeit (Kanzok 2001) überexprimiert und gereinigt worden, DmTrx2 stellte Holger Bauer (Bauer *et al.* 2002) freundlicherweise zur Verfügung.

Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	Roche, Mannheim
Hexokinase	Roche, Mannheim
Pyruvatkinase	Roche, Mannheim
Laktatdehydrogenase	Roche, Mannheim
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Substrate und Inhibitoren

Mono-, Di-, Triphosphat-Nukleotide	Sigma, St. Louis, USA
GTP als Lithiumsalz	Sigma, St. Louis, USA
NADH, NADPH	Biomol, Hamburg
AP ₅ A	Sigma, St. Louis, USA
GP ₅ A	Dr. Jochen Reinstein, Marburg

Cystatin, Pepstatin, PMSF, IPTG Roth, Karlsruhe
 alle weiteren Substrate und Inhibitoren von Sigma, St. Louis, USA

Molekularbiologie

Kits (QIAquick, QIAprep) Qiagen, Hilden
 Taq-Polymerase, MgCl₂, PCR-Puffer Eppendorf, Hamburg
 QualexGold™-Agarose Thermo (Hybaid), Woburn (USA)
 Ethidiumbromid Roth, Karlsruhe
 Ready-to-go™-T₄-DNA-Ligationskit Amersham, Freiburg

Kristallisation

CrystalScreen™ Hampton Research, Aliso Viejo (USA)
 Additive Screen 2 Hampton Research, Aliso Viejo (USA)
 Silikonöl Boehringer Bioproducts, Ingelheim

weiteres

Rotiphorese™ 30%ige Acrylamid-Lösung Roth, Karlsruhe
 Tetramethylenethyldiamin (TEMED) Boehringer Bioproducts, Ingelheim
 Vorgefärbter Standard BioRad, München
 ECL-Kit Perkin-Elmer, Wellesley, USA
 Silberfärbungs-Kit Merck, Darmstadt

2.1.2 Geräte

FPLC-Anlage mit Aekta Unicorn Software Aekta über Amersham, Freiburg
 BioPhotometer Eppendorf, Hamburg
 Bosch Feinwaage PE626 Gebr. Bosch, Junginger
 Inkubator (Cytoperm) Heraeus Instruments, Hanau
 Gelkammern (Agarose) Peqlab, Erlangen
 Magnetrührer IKA Roth, Karlsruhe
 Microliter™ Syringe Hamilton, Bonaduz (CH)
 Miniprotean II Dual Slab Cell BioRad, München
 Minischüttler (Vortex) Roth, Karlsruhe
 Spektrophotometer U-2001 Hitachi, Japan
 Spektrophotometer DU®650 Beckmann, München
 Megafuge 1.0 R Heraeus Instruments, Hanau
 Tischzentrifuge Mini-Spin Eppendorf, Hamburg
 pH-Meter (Φ350 pH/Temp/mV-Meter) Beckman Instruments, Fullerton, USA

PCR-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage	Scaltec Instruments, Göttingen
Quarzküvetten (1 ml)	Hellma, Mühlheim
Vakuumzentrifuge SpeedVac	Savant über Thermo Life Sciences
Schüttler (Orbital Shaker)	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Spannungsgeber	BioRad, München
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge, gekühlt (<i>fresco</i>)	Eppendorf, Hamburg
Wärmeschrank	Mytron über Thermo, Egelsbach
Ultraschallgerät	Bandelin Electronics, Berlin
Variopipetten (Research, Reference)	Eppendorf, Hamburg
Variopipetten	Gilson, Middleton (USA)
Wasserbad	JuLabo über MAGV
Zentrifuge Sorvall RC5B	Sorvall, Asheville (USA) über Kendro
Zentrifugenbecher (500 ml)	Nalgene, Rochester (USA)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Centricon (3k, 10k, 30k)	Amicon Inc., Beverly (USA)
Centriprep (3k, 10k, 30k)	Amicon Inc., Beverly (USA)
Microcon (3k, 10k, 30k)	Amicon Inc., Beverly (USA)
Ni ²⁺ -NTA-Säulenmaterial	Qiagen, Hilden
2'5'-ADP-Sepharose	Amersham, Freiburg
Protein-A-Sepharose (Fast Flow)	Amersham, Freiburg

Plastikmaterial

Reagenzgefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen für Gilson	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Kremsmünster (A)
Petrischalen (7.5, 15 cm Durchmesser)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Linbro Zellkulturplatten	Flow Laboratories, McLean (USA)
Mikroglaskapillaren	Brand, Wertheim
Nitrozellulosemembran HyBond N	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Deckgläschen, rund	Menzel, LHD, Heidelberg
Uvetten TM	Eppendorf, Hamburg
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Puffer und Medien

2.1.4.1 Puffer

Assay-Puffer:

- **AK-Assaypuffer**
 - 110 mM TEA-HCl
 - 80 mM KCl
 - 1,5 mM MgCl₂ mit HCl_{aq}, bei Raumtemperatur auf pH 6.0 eingestellt
- **AKr-Assaypuffer**
 - 100 mM TrisHCl
 - 100 mM KCl
 - 2 mM MgCl₂
 - 21,3 mM Mercaptoethanol, bei Raumtemperatur auf pH 7.5 eingestellt
- **Tricine-Puffer**
 - 60 mM Tricine
 - 110 mM KCl
 - 1,5 mM MgCl₂, bei Raumtemperatur auf pH-Werte zwischen 5.0 - 8.5 eingestellt
- **TrxR-Assaypuffer**
 - 100 mM Natriumphosphat
 - 2 mM EDTA, mit KOH_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt
- **Ultraschallpuffer**
 - 50 mM Natriumphosphat
 - 300 mM Natriumchlorid, mit HCl_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 8.0 eingestellt

Puffer zur Plasmidisolierung

- **P1-Puffer**
 - 6,06 mg/ml Tris-Base
 - 3,72 mg/ml EDTA x 2 H₂O
 - 0,1 mg/ml RNase A
- **P2-Puffer**
 - 4 M NaOH
 - 1 %_(w/v) SDS
- **P3-Puffer**
 - 7 M Kaliumacetat, mit Eisessig auf pH 5.5 eingestellt

Elektrophorese- und Blottingpuffer

- **APS (Stammlösung)**
10% (w/v) in Wasser gelöst, Lagerung bei -20°C
- **TE-Puffer**
10 mM TRIS-HCl
1 mM EDTA, mit HCl_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 8.0 eingestellt
- **TBE-Puffer**
100 mM Tris-HCl
83 mM Borsäure
10 mM EDTA, bei Raumtemperatur auf pH 8.2 eingestellt
- **SDS-Probenpuffer**
0.1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10 % (w/v) Glycin
0.002 % (w/v) Bromphenolblau
10 mM TRIS
5 mM DTE, mit HCl_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 8.2 eingestellt
- **SDS-Kammerpuffer**
192 mM Glycin
25 mM TRIS-HCl
0.1 % (w/v) SDS
- **Coomassie-Färbelösung**
0.25 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R250
9.2 % (v/v) Essigsäure
5.0 % (v/v) Methanol
- **Coomassie-Entfärber**
40 % (v/v) Essigsäure
10 % (v/v) Methanol
- **Blottingpuffer**
192 mM Glycin
25 mM TRIS-HCl
20 % (v/v) Methanol, mit HCl_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 8.3 eingestellt
- **Stripping-Puffer**
2 % SDS
62,5 mM Tris (pH 6.7)
7 mM Mercaptoethanol

- **TBS**
 10 mM TRIS
 155 mM NaCl, mit HCl_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt
- **TBS-Tween**
 10 mM TRIS
 155 mM NaCl
 0.05 %_(v/v) Tween 20, mit HCl_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt

Puffer in der Zellkultur *Plasmodium*

- **Saponinpuffer**
 0,02 %_(w/v) Saponin
 in: 7 mM K₂HPO₄
 1 mM NaH₂PO₄
 11 mM NaHCO₃
 58 mM KCl
 56 mM NaCl
 1 mM MgCl₂
 14 mM Glukose, bei Raumtemperatur auf pH 7.4
- **Lysispuffer**
 50 mM Tris-HCl
 100 mM NaCl
 50 mM EDTA
 1 %_(w/v) SDS, bei Raumtemperatur auf pH 8.0

Puffer für die Immunologie

- **PFA-Fixationspuffer**
 2 %_(w/v) Paraformaldehyd
 10 M NaIO₄
 75 mM Lysin
 37 mM NaPO₄, bei Raumtemperatur auf pH 7.2 eingestellt

Zur Herstellung:

Lysinlösung, gepuffert	0,85 % _(w/v)	Lysin
	7,5 mM	NaPO ₄
	25 mM	Natriumphosphat
PFA-Fixierlösung	15 ml	gepufferte Lysinlösung (s.o.)
	5 ml	Paraformaldehyd (8 % _(w/v) pH 7.4)
	50 mg	NaIO ₄

- **PBS**
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄, bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt
- **ImmunolinkWash2**
 - 100 mM Borsäure
 - 500 mM NaCl
 - 0,05 %_(v/v) Tween20, bei Raumtemperatur auf pH 8.5 eingestellt

Puffer zur Kristallisation

Zur Kristallisation wurden die insgesamt 98 Puffer des Crystal Screen I und II von Hampton Research, Aliso Viejo, USA eingesetzt. Zusammen mit den 24 Additiv-Lösungen ergeben sich so durch unterschiedliche Konzentrationen der Lösungen und des zu kristallisierenden Proteins unzählige Möglichkeiten mit unterschiedlichen pH-Werten, Ionenstärken, verschiedenen Salzen usw. Aufgeführt werden hier nur die beiden Puffer, mit denen die Kristallisation des Sniffer, bzw. der PfGAK am besten gelang. Der Puffer Nummer 22 wurde nach Angabe von Hampton Research selbst hergestellt.

- **CS I #22**
 - 200 mM Natriumacetat
 - 100 mM TrisHCl pH 8.5
 - 30 %_(w/v) Polyethylenglykol 4000
- **CS I #45**
 - 200 mM Zinkacetat
 - 100 mM Natriumcacodylat pH 6.5
 - 18 %_(w/v) Polyethylenglykol 8000

2.1.4.2 Medien

- **Luria-Bertani-Medium (1l)**
 - 10 g Natriumchlorid
 - 10 g Trypton
 - 5 g Hefeextrakt

Medium für Plasmodienkultur

- **CCM (complete culture medium)** (500 ml und 60 ml Waschlösung)

aus 500 ml Flüssigmedium inklusive Hydrogencarbonat

2 ml 45% Glukose,
6 ml L-Glutamin,
0,25 ml Gentamicin und
2,97 g HEPES
ad 20 ml auffüllen und mischen.

Steril filtrieren in die Mediumflasche, mischen und 60 ml Waschlösung entnehmen.

Medium mit 20 ml Serum
20 ml 5% Albumax
0,5 ml Hypoxanthin versetzen.

2.1.4.3 Verwendete Restriktionsenzyme, Plasmide und Bakterienstämme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	↓
<i>Bam</i> H I	5' - G↓GATCC -3'	
<i>Hind</i> III	5' - A↓AGCTT -3'	
<i>Eco</i> R I	5' - G↓AATTC -3'	
<i>Nco</i> I	5' - C↓CATGG -3'	
<i>Bgl</i> II	5' - A↓GATCT -3'	

Tabelle 3. Überblick über die verwendeten Restriktionsenzyme mit ihren Erkennungssequenzen. Die Schnittstelle ist durch einen Pfeil markiert.

Plasmid	Antibiotika - Resistenz; weiteres
pQE30 ¹	Carbenicillin (Amp); N-terminaler His-tag
pQE60 ¹	Carbenicillin (Amp); C-terminaler His-tag
pREP4 ¹	Kanamycin; <i>lac</i> -Repressor-Gen
pRSETA ²	Carbenicillin (Amp); <i>lacZ</i> -Gen
RIG-Plasmid ³	Chloramphenicol; tRNAs für R, I und G (AGA, AGG,ATA,GGA)

Tabelle 4. Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Vektoren. ¹ Qiagen GmbH, Hilden; ² Invitrogen, Carlsbad, USA; ³ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Wim Hol (Baca und Hol 2000).

<i>E. coli</i> - Stamm	Genotyp	Referenz, Hersteller
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsd-r17, supE44, relA1, lac, [F' pro AB, lacI ^q ZΔM15, Tn10, (Tet ^r)]	(Bullock <i>et al.</i> 1987) Stratagene, LaJolla, USA
M15 [pREP4]	nal ^S , Str ^S , rif ^S , Km ^R , lac ⁻ , ara ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , F ⁻ , recA ⁺ , uvr ⁺	(Villarejo und Zabin 1974) Qiagen, Hilden
BL21	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm	(Wood 1966) Stratagene, LaJolla, USA
C41 (BL21-Abkömmling)	dcm, ompT, hsdS, (r _B m _B) gal λ und mindestens eine weitere, nicht charakterisierte Mutation	(Miroux und Walker 1996) Avidis, Saint Beauzire, Frankreich
C43 (C41-Abkömmling)	dcm ompT hsdS (r _B m _B) gal λ und mindestens zwei weitere, nicht charakterisierte Mutationen	(Miroux und Walker 1996) Avidis, Saint Beauzire, Frankreich

Tabelle 5. Genotypen der verwendeten Bakterienstämme mit Referenzen

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Aufreinigung von DNA

2.2.1.1 Aufreinigung von DNA aus *Plasmodium falciparum*

Als Ausgangsmaterial dienten 60 ml Plasmodienkultur mit einer Parasitämie von ca. 5%. Die Aufreinigung erfolgte in vier Schritten: Saponinlyse der Erythrozyten, Lyse der Parasiten, Phenol-Chloroform-Fällung zur Abtrennung der Proteine und Ethanolfällung der DNA zur weiteren Reinigung.

Saponinlyse. Die Erythrozyten werden abzentrifugiert (7 min, 1.400 g, RT) und 10 min in 20fachem Saponinpuffer bei 37°C lysiert. Das nach der Zentrifugation erhaltene Parasitenpellet wird bei 4°C 2-mal in 20fachem PBS-Puffer gewaschen.

Lyse der Parasiten. (nach Abderrazak *et al.* (1999), verändert). Zur Parasitenlyse wird das Pellet mit 400 µl Proteinkinase (100 mg/ml) in Lysis-Puffer für 2 h bei 42°C inkubiert.

Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Lösung wird in ein "Phase-Lock-Gel light"-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und mit gleichem Volumen 1:1 gemischten Phenol-Chloroforms 2 min lang geschüttelt, 5 min stehen gelassen und danach abzentrifugiert (10 min, 8.050 g, 4°C). Der Überstand wird in ein neues "Phase-Lock-Gel light" (Eppendorf) überführt und die Prozedur einmal wiederholt.

Ethanolfällung. Die erhaltene Lösung wird mit 1/10 Volumen 5 M NaCl und 3-fachem Volumen eiskalten Ethanols vermischt, 15 min im Eisbad inkubiert und die gefällte DNA abzentrifugiert (10 min, 13.600 g, 4°C). Das erhaltene Pellet wird mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, wieder abzentrifugiert (s.o.) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird 10 min luftgetrocknet, in 50 µl TE-Puffer gelöst und die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Aufreinigung von Plasmiden aus *Escherichia coli*

Die Aufreinigung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse entweder per Qiagen-Kit nach Angabe des Herstellers (Qiagen, Hilden), oder von Hand (Holmes und Quigley 1981). Bei der Methode von Hand werden knapp 1,8 ml über Nacht gewachsene Bakterienkultur bei 8.000 rpm (5150 g) für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200 µl P1-Puffer gelöst und die Bakterien durch Zumischen von 200 µl P2-Puffer mit 5 min Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Durch Zugabe von 200 µl eiskaltem P3-Puffer werden der pH-Wert neutralisiert und die Proteine ausgefällt. Nach der Zentrifugation (5 min bei 13.600 g) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit

500 µl Isopropanol präzipitiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (5 min bei 13.600 g) wird der Überstand entfernt und das DNA-Pellet mit 600 µl eiskaltem, 70% Ethanol gewaschen. Von dem nach weiterem Zentrifugieren erhaltenen Pellet wird der Überstand entfernt, das Pellet für einige Minuten getrocknet, und die DNA in 30 µl Wasser oder TE-Puffer gelöst.

2.2.1.3 Amplifikation von cDNA-Banken in *E. coli*-Zellen (XI -1-Blue)

Zur Amplifikation wurden die in Lösung erhaltenen Plasmide in *E. coli* XI1-Blue nach Standardprotokoll transformiert (s.u.). Im Unterschied zum Standard wurden jedoch 900 µl SOC-Medium verwendet. Die Kultur wurde nach einer Stunde bei 37°C noch einmal mit 900 µl SOC-Medium verdünnt und diese Suspension dann mit Hilfe eines Drigalskispatels möglichst gleichmäßig auf 20 große Petrischalen mit LB-Agar, der 50 µg/l Carbenicillin enthielt, ausgestrichen und 8-20 Stunden bei 37°C inkubiert. Gewachsene Klone wurden mit möglichst wenig LB-Medium und unter Zuhilfenahme des Drigalskispatels vom Agar gelöst und sorgfältig gemischt. Die Zellsuspension wurde mit reichlich der gleichen Menge Glycerin versetzt weggefroren oder die Plasmide wie oben extrahiert.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktionen

Grundlage unzähliger Verfahren in der Molekularbiologie ist die PCR. In der vorliegenden Arbeit wurden PCR-Reaktionen zur Gewinnung bestimmter Fragmente zur weiteren Klonierung und zur Kontrolle anderer Experimente eingesetzt.

Die das natürliche Synthetisieren von Okazaki-Fragmenten während der Mitose imitierende PCR beruht auf dem Enzym Polymerase, welches heute aus verschiedenen Organismen gewonnen, bzw. gentechnisch hergestellt wird. Die verschiedenen Polymerasen unterscheiden sich in ihrer Thermostabilität, Geschwindigkeit, d.h. Ausbeute der Reaktion, und Fehlerhäufigkeit. Die größte Ausbeute liefert die preiswerte Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, die höchste Genauigkeit Pfu (*Pyrococcus furiosus*), bzw. Pwo (*Pyrococcus woesei*), welche eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, d.h. Korrekturaktivität (proofreading) besitzen. Die Taq-Polymerase fügt zudem einen unspezifischen A-Überhang an das PCR-Produkt an, welcher in Klonierungen genutzt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden hot-start PCRs durchgeführt, welche durch einen initialen Denaturierungsschritt bei ~94°C (2-5 min) gekennzeichnet sind. Daran schließt sich der namensgebende, zeitlich enzymabhängige Temperaturzyklus an. Der zur Verfügung stehende PCR-Cycler ermöglichte mit seiner Gradienten-Funktion

ein paralleles Durchlaufen des Zyklus auf unterschiedlichen Temperaturniveaus. Zur PCR-Optimierung wurde nur die Annealing-Temperatur variiert, bei gleichbleibender Temperatur für Denaturierung und Elongation. Als Enzym wurde zum Testen der PCR und zum Nachweis eingebauter Fragmente in Plasmide in *E.coli* die Taq-Polymerase verwendet. Sollte das Produkt nachfolgend sequenziert und/oder zur Klonierung genutzt werden, kam als Polymerase Pfu zum Einsatz. Als PCR-Template diente die allgemein verwendete cDNA-Bank aus Blutstadien, bzw. Gametozyten des Parasiten, welche von Herrn Professor Kaslow (Rawlings und Kaslow 1992) erstellt wurde. Die verwendeten Primer waren aufgrund des bekannten A/T-Reichtums der Plasmodien-DNA (und damit auch cDNA) teilweise ungewöhnlich lang und hatten einen sehr niedrigen G/C-Anteil, welcher die Primerbindung erschwerte. Um unspezifische Bindungen aufgrund der GC-reichen Schnittstellen zu vermeiden, wurde zunächst das Fragment an sich amplifiziert und die Schnittstellen dann in einem zweiten PCR-Schritt angefügt.

PfAK	Primersequenz	T _M
AK2f	5'-AATGAAAATTTAGAAAATTTTCAACAATTGATTTGTTGAATG- 3'	61,8°C
AK2r	5'-ACCGTCTATATGTTGAGAGATTTTTTTTTCC- 3'	61,6°C
AK2Bamf	5'- <u>GCGCGGATCCA</u> ATGAAAATTTAGAAAATTTTCAAC- 3'	57,0°C
AK2Hindr	5'- <u>GCGCAAGCTTT</u> TAACCGTCTATATGTTGAGAGATTTTTTTTTCC -3'	61,6°C

Tabelle 6. Primer zur PCR-Amplifikation der Adenylatkinase aus *Plasmodium falciparum*. Als T_M ist die Schmelztemperatur des jeweiligen Primers angegeben. Die unterstrichenen Basen stellen die Sequenz der Schnittstelle mit Überhang dar und hybridisieren nicht.

PfGAK	Primersequenz	T _M
AK3f	5'-AGAATTGTATTATTTGGAGCTCCTGG-3'	61,1°C
AK3r	5'-TCATTTTAATTTTTCATTTTTCTG-3'	55,9°C
AK3Bamf	5'- <u>GCGCGGATCC</u> AGAATTGTATTATTTGGAGCTCCTGG-3'	61,1°C
AK3Hindr	5'- <u>GCGCAAGCTTT</u> CATTTTAATTTTTCATTTTTCTG-3'	55,9°C

Tabelle 7. Primer zur PCR-Amplifikation der GTP-abhängigen Adenylatkinase (PfGAK) aus *Plasmodium falciparum*. T_M bezeichnet die Schmelztemperatur des jeweiligen Primers. Die unterstrichenen Basen stellen die Sequenz der Schnittstelle mit Überhang dar ohne zu hybridisieren.

Typisches Temperaturprofil einer PCR	Temperatur	Dauer
Hot Start	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	55°C +/- 5°C*	30 sec
Elongation		45 sec (1 min /kb) [#]
Ende		2 min
Halten auf	4°C	

Dieser Zyklus wurde 25 - 33 x wiederholt

Tabelle 8. Typisches Temperaturprofil einer PCR mit "hot start". * Die Annealingtemperatur liegt meist 5°C unter der Schmelztemperatur des Primers. Da Vorwärts- und Rückwärtsprimer häufig unterschiedliche Temperaturen aufweisen, ist es günstig einen Gradienten von + / - 5°C um die Annealingtemperatur zu legen. [#] Die Faustregel für die Taq-Polymerase besagt 1 min Elongationszeit pro 1 Kilobase PCR-Produkt, aber mindestens 30 sec. Polymerasen mit Exonuclease-Aktivität ("proofreading") benötigen etwas länger.

Zur weiteren Verwendung wurde der PCR-Ansatz mit dem QIAquick PCR Reinigungskit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und das in Wasser aufgenommene Fragment bei -20°C gelagert.

2.2.3 Klonierung in Plasmidvektoren

2.2.3.1 Restriktionsverdau

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in Plasmidvektoren müssen zunächst die Enden durch Verdau mit der jeweils gleichen Restriktionsendonuklease kompatibel gemacht werden. Hierzu werden in Wasser aufgenommener Vektor und Insert mit Wasser, enzymespezifischem Puffer, sowie dem entsprechenden Restriktionsenzym versetzt und mindestens 3 h, besser über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Der Verdau bei Raumtemperatur ist günstiger für den Verdau des Inserts, wo nur wenige Basen Überhang die Arbeit der Endonuklease erschweren.

Um die Richtung der Ligation später kontrollieren zu können, werden zwei verschiedene Restriktionsenzyme für 5'- und 3'-Ende des Inserts verwendet. Dies kann in einem Doppelansatz geschehen, sofern beide Enzyme im gleichen Puffer arbeiten. Da dies nicht immer für beide Enzyme optimal ist, und die Aktivität der Enzyme selbst variiert, muss jede Enzymkombination einmal optimiert werden.

Insert	Vektor
14,5 µl H ₂ O	19,5 µl H ₂ O
10 µl PCR-Produkt (~70 ng/µl)	5 µl Vektor (~ 300 ng/µl)
3 µl Puffer	3 µl Puffer
1,5 µl <i>Hind</i> III	1,5 µl <i>Hind</i> III
1 µl <i>Bam</i> HI	1 µl <i>Bam</i> HI

Tabelle 9. Typisches Beispiel eines 30 µl Ansatzes für den Verdau von Insert und Vektor mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III.

Nach dem Verdau wird das Enzym bei 65°C für 10 min inaktiviert und der Ansatz mittels QIAquick PCR-Reinigungs-Kit aufgereinigt. Falls das ausgeschnittene Fragment über 90 bp groß ist, wird über ein Agarosegel mit angeschlossenen Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Das Eluat wird in 30 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration photometrisch im Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Dazu werden 65 µl Wasser in eine Uvette (Eppendorf) pipettiert, als Nullwert bestimmt, und 5 µl der DNA-Lösung blasenfrei gut eingemischt. Dann wird die optische Dichte bei 260 und 280 nm gemessen und die Extinktion, d.h. das Verhältnis der beiden Werte zueinander, berechnet. Dabei entspricht der gemessene Wert bei 260 nm der Konzentration der doppelsträngigen DNA in µg/µl (siehe Formel 2), eine Extinktion zwischen 1.8 und 2.0 weist auf eine ausreichend saubere Lösung hin.

Formel (2) : $OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = c[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ (Sambrook *et al.* 1990)

2.2.3.2 Ligation

Um die Ausbeute der Ligation zu maximieren, sollte das molekulare Verhältnis zwischen Insert und Vektor 5 :1 betragen, d.h. 5-mal mehr Moleküle Insert als Vektor.

Formel (3): Benötigte Menge Insert [ng] = (Vektor [ng] x Insertgröße [bp] x 5) / Vektorgröße [bp]

Üblicherweise werden bei einer Insertgröße von 500-1000 bp 65-100 ng Insert eingesetzt. Für die Ligation wurde Ready-to-go T4 Ligase (Amersham, Freiburg) verwendet und die Reaktion entsprechend den Empfehlungen des Herstellers angesetzt. Hierbei erwies sich eine Inkubation für 45 min bei 16°C als ideal. Der Ligationsansatz konnte direkt für die Transformation weiterverwendet, oder zur besseren Lagerung 10 min bei 65°C inaktiviert werden.

2.2.4 Transformation in *E. coli*

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

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen werden die entsprechenden Bakterien frisch auf Agar plattiert und einzelne über Nacht gewachsene Kolonien zum Animpfen von je 100 ml LB-Medium verwendet. Da hierbei meist ohne Antibiotika gearbeitet wird, musste ganz besonders auf Sterilität geachtet werden. Die Kultur wird bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 geschüttelt, danach 10 min auf Eis gestellt und abschließend in sterilen 50 ml Falcontubes bei 4°C und 3500 g 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 3 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4°C, 3500 g) wird jedes Pellet in 2 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung pro 50 ml Kultur aufgenommen und aliquotiert. Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff oder Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

2.2.4.2. Transformation

Für die Transformation werden 100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Ready-to-go-Ligationsansatz, oder einer Plasmidlösung mit ca. 1 µg DNA gemischt und ruhig 30 min auf Eis belassen. Es folgt ein Hitzeschritt von 45 sec bei 42°C, kurzes Abkühlen auf Eis und die Zugabe von 400 µl vorgewärmtem LB-Medium. Nach 45-minütiger Inkubation mit 160-200 Upm bei 37°C werden die Zellen auf durch Antibiotikazusatz selektivem Agar ausplattiert. Die Bakterien werden über Nacht in 37°C gestellt und die gewachsenen Klone morgens getestet.

2.2.4.3 Selektion positiver Klone

Zur Selektion auf positive Klone wird die *E. coli*-Flüssigkultur nach der Transformation auf Agarplatten mit verschiedenen Antibiotika plattiert. Die Vektoren pSK und pQE enthalten zu diesem Zweck Resistenzgene gegen Carbenicillin / Ampicillin, pREP4 in M15-Zellen zusätzlich eine Kanamycin-Resistenz. Zusätzlich befindet sich auf einigen Vektoren wie beispielsweise pSK das *lacZ*-Gen, welches eine IPTG/X-Gal-Mischung in einen blauen Farbstoff umsetzt. Wird dieses Gen durch Einbau eines DNA-Fragmentes über die multiple Klonierungsstelle innerhalb des Gens gestört, bleiben die entstehenden Kolonien weiß, Kolonien mit intaktem *lacZ*-Gen im Vektor färben sich dagegen blau. Die über Nacht gewachsenen weißen Klone werden am nächsten Morgen in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 3 h wird ein PCR-Mastermix auf ein Gesamtvolumen von 25 µl hergestellt. Dieser enthält neben den

insertspezifischen Primern auch schon die Taq-Polymerase. Je 24 µl Mix werden in Reaktionsgefäßen vorgelegt und jeweils 1 µl der wachsenden Kultur daraufpipettiert. Die PCR-Ansätze werden kurz im Vortex gemischt, herunterzentrifugiert und die PCR im Cycler gemäß des dem Insert zugrundeliegenden Protokolls durchgeführt. Die Kulturröhrchen verbleiben zwischenzeitlich bei 37°C im Schüttelinkubator. Die PCR-Proben werden mit Probenpuffer gemischt auf ein Agarosegel aufgetragen, eine Elektrophorese durchgeführt und nach Auftreten von Banden erwarteter Größe die entsprechenden Flüssigkulturen auf einer weiteren Agarplatte gesichert. Das Plasmid aus dem Rest der Flüssigkultur wird nach dem Qiagen-Protokoll isoliert, oder sofort als Vorkultur einer Expression verwendet.

2.2.5 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die Expression in Vektoren klonierter Gene erfolgte in *E. coli*-Zellen des Stammes M15, welcher einen glukosesensitiven Repressor auf dem pREP4-Plasmid enthält, oder in C41/C43-Zellen (Miroux und Walker 1996). Die Expression wird durch Zugabe von 0.1 - 1 mM IPTG gestartet.

Je eine frisch transformierte Kolonie wird in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz vormittags inokuliert und dies zum Animpfen einer Vorkultur von je 250 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz verwendet. Dieser Kulturansatz wird nun 8 Stunden bei 37°C und 160-180 rpm inkubiert. Für die eigentliche Expression wird antibiotikahaltiges LB-Medium mit 2.5% (v/v) der Vorkultur angeimpft und bis zu einem OD₆₀₀ von 0.4 (Sniffer) bis 0.6 (PfAK/PfGAK) wachsen lassen. Hierauf wird die Expression durch Zugabe von 1 mM (Sniffer) oder 0.3 mM (PfAK, PfGAK) IPTG (Endkonzentration) induziert und die Kultur nach weiterer Inkubation für 4 h (Sniffer) bis 8 h (PfAK, PfGAK) durch Überführung in Zentrifugenbecher und Zentrifugation bei 8.000 rpm (10.500 g; 4°C; 15 min) geerntet. Die erhaltenen Pellets werden in möglichst wenig US-Puffer mit 40 nM Cystatin, 150 nM Pepstatin und 10 µM PMSF resuspendiert und können so bei -20°C weggefroren, oder direkt aufgereinigt werden.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinreinigungen

2.3.1.1 Proteinextraktion aus Bakterien

Die Zellsuspension aus ca. 2 l Kultur wird mit US-Puffer, welcher 40 nM Cystatin, 150 nM Pepstatin, 10 µM PMSF und zusätzlich 0,2 mg/ml Lysozym sowie 1 mg/ml in 0,08% Na-Desoxycholat gelöste DNase I enthält, auf 25 ml aufgefüllt. Diese Mischung läßt man im Eisbad 30 min rühren, überführt sie in einen Zentrifugenbecher und zerstört die Zellen zusätzlich durch 60-120 Impulse Ultraschall (67%). Der Überstand nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 16.000 rpm (31.000 g) enthält den Inhalt des *E. coli*-Cytosols inklusive der überexprimierten Proteine.

2.3.1.2 Aufreinigung der markierten Proteine über eine Ni-NTA Säule (Sniffer, DmTrxR, PfAK, PfGAK)

Die verwendeten Plasmidvektoren der pQE-Familie (Qiagen) enthalten eine Hexahistidyl-Markierung, die N-terminal (z.B. pQE30) oder C-terminal an das vom Insert kodierte Protein angefügt wird. Diese Markierung bindet an Ni²⁺ und erlaubt so die Aufreinigung aus einem Proteinextrakt durch Metall-Affinitäts-Chromatographie. Das Säulenmaterial besteht aus Nickel-Nitrilotriessigsäure, welches an Sepharose CL-6B gekoppelt ist. Die durchschnittliche Bindungskapazität dieses Materials liegt bei 5-10 mg markiertem Protein pro ml Säulenmaterial. Eine detaillierte Beschreibung der Vektoren, Säulenmatrix und der Methode findet sich im Heft *The QIAexpressionist*TM Fifth Edition, März 2001, Qiagen.

Die Proteinlösung wird mit einer Geschwindigkeit von 8-10 sec pro Tropfen auf eine zuvor in US-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Da die benötigte Menge Säulenmaterial von der erwarteten Menge an Zielprotein abhängt, wurden für eine Proteinlösung aus 1 l Kultur 1,5 ml (PfAK, PfGAK) oder 4-5 ml (DmTrxR, Sniffer) Säulenmaterial verwendet. Müssen größere Mengen an Proteinlösung aufgebracht werden, kann die Säule zwischendurch vorsichtig mit reinem US-Puffer gespült werden. Nach dem Auftrag der Proteine wird die Durchflußgeschwindigkeit auf 4-6 sec pro Tropfen erhöht und die Säule zunächst mit purem US-Puffer und danach mit Waschpuffern aus US-Puffer mit steigendem Gehalt an Imidazol gewaschen. Ziel ist es, zunächst schwächer gebundene Proteine durch Imidazol von den Bindungsstellen zu verdrängen und das gewünschte Protein danach möglichst sauber zu eluieren. In der Testphase wird daher ein Imidazolgradient mit je 2 Säulenvolumen von US-Puffer mit Imidazolgehalt von 10 - 200 mM in Schritten von

10 mM verwendet. Ist die Imidazolkonzentration, bei der das Zielprotein eluiert, erst einmal bekannt, kann mit größerem Volumen eines Imidazolpuffers knapp unterhalb der Elutionskonzentration gewaschen, die Säule mit US-Puffer nachgespült und das Protein mit ausreichend Imidazol von der Säule gelöst werden.

2.3.1.3 Aufreinigung der TrxR über Affinitätschromatographie

2'5'-ADP-Sepharose bindet NADPH-abhängige Enzyme stark und gibt sie durch Zugabe von NADP wieder frei. Dies kann zur spezifischen Aufreinigung genutzt werden. Die Methode läßt sich sowohl für Aufreinigung unter nativen, als auch denaturierenden Bedingungen verwenden. Zur denaturierenden Reinigung wird allen Puffern beispielsweise 4-8 M Harnstoff zugegeben und das Eluat gegen sinkende Konzentrationen an Harnstoff dialysiert, wobei sich die denaturierten Proteine wieder falten sollen. Gleiches ist auch mit Guanidinhydrochlorid möglich. Um möglichst wenig Gesamtprotein auf die Säule aufzubringen, wird zunächst mit Ammoniumsulfat in einer Konzentration gefällt, bei der GR und TrxR noch in Lösung verbleiben.

Der abzentrifugierte Proteinextrakt (siehe 2.3.3) der *E. coli*-Zellen wird zunächst unter Rühren im Eisbad mit 70% Ammoniumsulfat versetzt. Nun dialysiert man zweimal gegen das zehnfache Volumen 5 mM Kaliumphosphat pH 7.4 mit 1 mM EDTA, und danach dreimal gegen das zehnfache Volumen 10 mM Kaliumphosphat pH 7.4 mit 1 mM EDTA, jeweils für mindestens 45 min. Die erhaltene Proteinlösung wird auf eine in Puffer A äquilibrierte 2'5'-ADP-Sepharose-Säule aufgegeben, zunächst mit 3 Säulenvolumen Puffer A, dann 1 Säulenvolumen 250 mM Kaliumchlorid und zum Schluß weiteren 3 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Hierauf erfolgt die Elution mit steigenden NADP-Konzentrationen, d.h. das Protein wird mit jeweils 2 Säulenvolumen erst 1 mM, dann 2 mM NADP in Puffer A eluiert und in Fraktionen aufgefangen. Proteinhaltige Fraktionen werden nach Kontrolle im SDS-Gel im Centricon eingeeengt.

2.3.1.4 Kontrolle mittels SDS-Page

Die Elektrophoresemethode nach Laemmli (Cleveland *et al.* 1977) trennt Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel auf. Neben dem Molekulargewicht gibt es weitere Faktoren, wie beispielsweise die Faltung, welche die Laufeigenschaften beeinflussen. Um diese zu minimieren, werden die Proteine vor dem Auftrag reduziert und denaturiert. Zur Probenvorbereitung wird die Proteinlösung mindestens mit gleichem Volumen Probenpuffer versetzt und 5-15

min. bei 95°C zur besseren Denaturierung inkubiert. Die Gele bestehen aus einem ca. 1,5 cm breiten 4%igen Sammelgel oben und dem 10-15%igen Trenngel. Für den Bereich unter 20 kDa verwendet man ein 15%iges, zwischen 20 und 40 kDa ein 12%iges, und bei über 40 kDa Größe des gesuchten Proteins ein 10%iges Polyacrylamidgel und setzt dieses vertikal in eine mit SDS-Kammerpuffer gefüllte Gelkammer. Die gekühlten und gut gemischten Proben werden auf das Gel, welches Harnstoff enthält, aufgetragen und die Elektrophorese in geschlossener Kammer bei einer Spannung von 150 V durchgeführt (8 V/cm im Sammelgel, 15 V/cm im Trenngel). Für eine sauberere und schonendere Auftrennung speziell bei anschließendem Western-Blot sollte die Spannung teilweise auf 100 V oder darunter gesenkt werden, wodurch der Lauf sich verlangsamt. Erreicht die Indikatorfront das untere Gel-Ende, so wird die Spannung abgeschaltet, das Gel entnommen und gefärbt. Hier stehen zwei unterschiedlich sensitive Methoden zur Verfügung, die jedoch nacheinander, bzw. gekoppelt durchgeführt werden können. Die einfachste Standardmethode ist die Färbung mit Coomassie-Blau. Hierfür wird das Gel 20 min in der Färbelösung auf dem Horizontalschüttler bewegt und nach Abspülen mit H₂O zweimal für je 20 min in 40%igem Methanol mit 10%iger Essigsäure entfärbt. Die Proteinbanden bleiben gefärbt und die Größe des Proteins kann mit dem Molekulargewichtsmarker (BioRad) verglichen und abgeschätzt werden. Bei geringen Proteinmengen und zum besseren Abschätzen von Verunreinigungen färbt man das Gel mit Silbernitrat. Hierfür wurde ein Kit der Firma Merck (Merck, Darmstadt) verwendet.

2.3.2 Proteinanalyse

2.3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer Proteinlösung lässt sich photometrisch bestimmen, wobei die Genauigkeit je nach vorhandener Vorinformation variiert. Kennt man die Aminosäuresequenz, so lässt sich der Extinktionsfaktor bei 280 nm (ϵ_{280}) berechnen und die Proteinkonzentration einer sauberen, wässrigen Lösung damit genau bestimmen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ eines Proteins ergibt sich aus der Summe der Absorptionen der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm (ϵ_{280} von Tyrosin ist ca. $1,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ϵ_{280} von Tryptophan beträgt ca. $5,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), sowie der Absorption eventuell vorhandener prosthetischer Gruppen wie z.B. FAD (ϵ_{280} ca. $37,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Diese Methode kann nach Warburg (Warburg *et al.*, 1941) auch bei Proteingemischen eingesetzt werden, indem ein Mittelwert (16 Mol%) an

absorbierenden Aminosäuren angenommen wird, liefert aber trotz des Korrekturterms für die im gleichen Bereich absorbierende Nucleinsäuren, bzw. Nukleotide aufgrund stark variierender Gehalts der Proteine an Tryptophan und Tyrosin häufig nur Näherungswerte. PfGAK besitzt beispielsweise nur 3,33 Mol% Tyrosin und kein Tryptophan.

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = 1,55 \times \Delta A_{280\text{nm}} - 0,76 \times \Delta A_{260\text{nm}}$$

2.3.2.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Säulenchromatographie

Eine weitere Methode zur Proteinaufreinigung, bei der das Molekulargewicht verwendet wird, ist die Säulenchromatographie. Zur Verfügung standen zwei HiLoad Säulen (Amersham Pharmacia), die Superdex 75, mit einem Trennbereich bis ca. 75 kDa und die Superdex 200 mit einem Trennbereich bis ca. 400 kDa. Dabei ist das Volumen zwischen Totvolumen und Retentionsvolumen proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes des Proteins (Formel 2). Zur genauen Berechnung muß zunächst für jede Säule und jedes Puffersystem eine Eichkurve mit Proteinen bekannten Molekulargewichtes erstellt werden. Daraus ergeben sich dann die Korrekturfaktoren der linearen Säulengleichung (Gleichung 2 und 3).

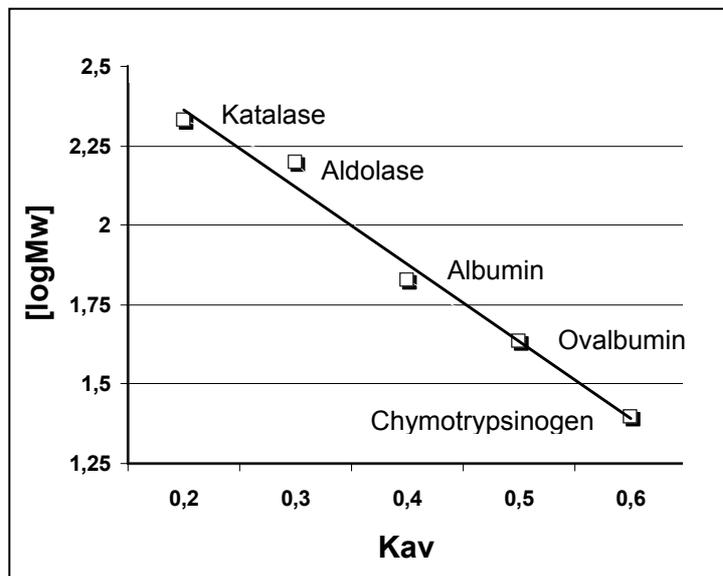


Abbildung 7. Kalibrierung der Superdex 200 Chromatographiesäule. Als Standards wurden Katalase (215 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Chymotrypsinogen (25 kDa) verwendet.

$$(1) K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_C - V_0}$$

mit V_R = Retentionsvolumen

V_0 = Totvolumen

V_C = Säulenvolumen

(2) Säulengleichung Superdex 75*: $\log(M_w) = -2,01666 \cdot K_{av} + 5,01511$

(3) Säulengleichung Superdex 200*: $\log(M_w) = -2,055 \cdot K_{av} + 2,603$

* in US-Puffer mit pH 7.5

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes eines Proteins wird eine Proteinlösung mit genau einstellbarer Fließgeschwindigkeit auf eine Säule aufgebracht und nach Größe aufgetrennt, wobei der Durchlauf in einzelnen Fraktionen gesammelt wird. Entscheidend für ein zufriedenstellendes Ergebnis sind neben möglichst frischem Protein der verwendete Puffer und die vollständige Entfernung jeglicher Schwebeteilchen in Probe und Puffer durch Zentrifugation oder Filtration (0,45 µm). Selbstverständlich muß auch darauf geachtet werden, daß keinerlei Luftblasen das gleichmäßige Laufen der Säule behindern. Bei der zur Verfügung stehenden Anlage wird zunächst die Probenschleife, dann die Pumpen und zuletzt die Säule mit dem verwendeten Puffer vorgewaschen. Stand die Säule zur Aufbewahrung in 20%igem Ethanol, so wäscht man mit mindestens 1,5 Säulenvolumen Wasser (bidest), in jedem Falle aber mit 1,5 - 2 Säulenvolumen des Puffers vor Aufbringen der Probe. Danach kann die Probe in die Probenschleife eingespritzt werden und der Lauf wird am Computer gestartet. Üblicherweise stellt man einen Vorlauf von mindestens 0,5 Säulenvolumen Puffer vor dem Probenauftrag ein. Die Fließgeschwindigkeit wird meist im Bereich zwischen 0,3 bis 2 ml pro Minute variiert, meist verwendet man zunächst eine Geschwindigkeit von 1 ml/min und sammelt in Fraktionen von 3 ml. Die Photoelektrode misst fortwährend die Absorption (in Absorptionseinheiten) bei 280 nm, parallel werden Leitfähigkeit, Temperatur und pH-Wert bestimmt. Die graphische Darstellung am Computer ermöglicht ein Identifizieren der Proteinpeaks und über das Retentionsvolumen ein Ausrechnen des zugehörigen Molekulargewichtes. Nach ihrem Molekulargewicht laufen als erstes die größten Proteine durch die Säule. Ist das Retentionsvolumen größer als das Säulenvolumen ($V_R > V_C$), so liegt eine Interaktion des Proteins mit dem Säulematerial vor.

2.3.3 Enzymassays

2.3.3.1 Adenylatkinase-Assays

Da zwischen Produkten und Substraten der AK-Reaktion kein photometrisch meßbarer Unterschied besteht, wurden zur Messung der Adenylatkinase-Aktivität gekoppelte Assays eingesetzt.

Hinreaktion

Dieser Assay nutzt die Hinreaktion der AK und die angeschlossene Pyruvatkinase-Reaktion recycelt das entstandene NDP, wobei Pyruvat entsteht (Berghäuser 1975). Dieses wird in der dritten Reaktion von Laktatdehydrogenase mit NADH zu Laktat und NAD^+ umgesetzt. Gemessen wird der NADH-Verbrauch anhand der Absorptionsänderung bei 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Reaktion	Reaktionsgleichung
AK-Reaktion	$\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2 \text{ADP}$
PK-Reaktion	$2 \text{ADP} + 2 \text{PEP} \rightarrow 2 \text{ATP} + 2 \text{Pyruvat}$
LDH-Reaktion	$2 \text{Pyruvat} + 2 (\text{NADH} + \text{H}^+) \rightarrow 2 \text{Laktat} + 2 \text{NAD}^+$
Gesamt	$\text{AMP} + 2 \text{PEP} + 2 (\text{NADH} + \text{H}^+) \rightarrow \text{ATP} + 2 \text{Laktat} + 2 \text{NAD}^+$

Tabelle 10. Übersicht über den gekoppelten Adenylatkinase-Assay mit ATP (Berghäuser 1975). Enthalten sind neben der zu messenden Adenylatkinase (AK) die Enzyme Pyruvatkinase (PK) und Laktatdehydrogenase (LDH). PEP steht für Phosphoenolpyruvat.

Um den Verbrauch an Enzym und Nukleotiden gering zu halten, wurde der Assay meist in einem Gesamtvolumen von 500 μl gemessen. Da auch das stabilere Lithiumsalz des GTP schnell hydrolysiert, muß vor dem Starten des Assays die Regeneration des GDP zu GTP durch die PK abgewartet werden. Teilweise war es dann auch nötig, die NADH-Konzentration am Anfang um den Prozentsatz des GDP ($[\text{GDP}]/([\text{GDP}]+[\text{GTP}])$) zu erhöhen. Eine Messung am Diodenarray-Spektrophotometer war nicht möglich, da die starke Lichtintensität zu einer vollständigen Hydrolyse des GTP führte. Der in Tabelle 11 genannte Assay zur AK-Hinreaktion wurde - je nach Enzym und Substratspektrum - modifiziert.

Reagens	Stammlösung	Endkonzentration	pro Assay
AK-Puffer	110 mM _(TEA-HCl)	110 mM	(466,5 - x) µl
NADH	10 mM	200 µM	10 µl
ATP / GTP	100 mM	800 µM	8 µl
PEP	20 mM	400 µM	10 µl
PK	2000 U/ml	10 U/ml	2,5 µl
LDH	5000 U/ml	10 U/ml	1 µl
AK-Lösung	variiert	ca. 5-10 mU/ml	x µl
AMP _(START)	100 mM	2,3 mM	11,5 µl

Tabelle 11. Pipettierschema des enzymatisch-optischen AK-Assays nach Berghäuser (Berghäuser 1975). Aufgrund starker Substratinhibition wurde AMP häufig in deutlich geringeren Konzentrationen eingesetzt (siehe Text).

Adenylatkinase Rückreaktion

Dieser Assay koppelt die AMP-Produktion an die Hexokinase- und die G6PDH-Reaktion (Gutierrez und Csonka 1995). Letztere ist NADP⁺-abhängig, so daß der Anstieg der NADPH-Konzentration ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), welcher proportional zur AMP-Bildung ist, bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden kann. Nachteilig ist, daß der Assay aufgrund der gekoppelten Enzyme nicht bei niedrigem pH-Wert abläuft. Da die Hexokinase nur ATP verwendet, kann eine GTP-abhängige Adenylatkinase in diesem Assay nicht gemessen werden.

Reaktion	Reaktionsgleichung
AK-Reaktion	$\text{ADP} + \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$
HK-Reaktion	$\text{ATP} + \text{Glukose} \rightarrow \text{Glukose-6-P} + \text{ADP}$
G6PDH-Reaktion	$\text{G6PDH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{6-Phosphoglucono-}\delta\text{-lacton} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

Tabelle 12. Übersicht über den gekoppelten reversen Adenylatkinase-Assay. Enthalten sind neben der zu messenden Adenylatkinase (AK) die Enzyme Hexokinase (HK) und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH).

Reagens	Stammlösung	Endkonzentration	pro Assay
AKr-Puffer _(pH 7.5)	100 mM _(Tris-HCl)	100 mM	(442 - x) µl
NADP ⁺	10 mM	500 µM	25 µl
ADP	100 mM	2 mM	10 µl
Glukose	250 mM	10 mM	20 µl
HK	1500 U/ml	3 U/ml	1 µl
G6-PDH	2500 U/ml	2,5 U/ml	2 µl
AK-Lösung _(START)	variiert	5-10 mU/ml	x µl

Tabelle 13. Pipettierschema des reversen enzymatisch-optischen AK-Assays nach Gutierrez (Gutierrez und Csonka 1995).

2.3.3.2 Insulinassay

Der turbodimetrische Insulinassay (Holmgren 1979) mißt die allgemeine reduktive Aktivität eines Proteins und beruht auf der Reduktion der Disulfidbrücken von Insulin. Reduzierte Insulinketten fallen aus und absorbieren bei 600 nm. Jeweils 200 µl Probe mit 1 mM DTT und 200 µl 1 mM DTT als Kontrolle werden mit 800 µl 0,17 mM Pankreasinsulin in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 mit 2 mM EDTA gut vermischt und die Absorptionzunahme bei 600 nm in allen Proben "gleichzeitig" über einen Zeitraum von 60 min gemessen. Das DTT in sämtlichen Proben ergibt einen internen Standard. Als Positivkontrolle diente DmTrx1.

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

2.3.3.3 Carbonylreduktase-Assay (nach Terada *et al.* (2000))

Die Carbonylreduktase reduziert eine Carbonylgruppe unter Oxidation von NADPH. Photometrisch gemessen wird der Umsatz des NADPH zu NADP⁺ als Abnahme der Absorption bei 340 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Der Abfall der Absorption ist negativ proportional zum Substratumsatz.

CR-Reaktion: $\text{R-CH=O} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-CH}_2\text{-OH} + \text{NADP}^+$

Temperiertem Puffer werden unterschiedliche Mengen des Substrates und ca. 8 mU Sniffer zugemischt und die Reaktion durch Zugabe von 100 µM NADPH gestartet.

2.3.3.4 Thioredoxinreduktase-Assays

Die Assays zur Bestimmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität (Gromer *et al.* 1998) liefen bei 25°C in einem Volumen von 1 ml und mit einem effektiven Lichtweg von 1 cm. Es wurden verschiedene Assaysysteme verwendet.

DTNB - Reduktionsassay



Als Substrat dient in diesem Assay das artifizielle Disulfidsubstrat DTNB, auch *Ellmans-Reagenz*, welches von allen bisher bekannten großen Thioredoxinreduktasen (Molekulargewicht pro Untereinheit von ca. 55 kDa oder darüber) NADPH-abhängig reduziert werden kann. Gemessen wird das entstehende Thiolat des TNB mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{TNB,412nm} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Da die Volumenaktivität rechnerisch jedoch auf den NADPH-Verbrauch bezogen wird und pro NADPH-Molekül zwei Moleküle TNB entstehen, muß die Absorptions-änderung halbiert werden.

Thioredoxinreduktase-Assaypuffer	(für ein Gesamtvolumen von 1 ml)
DTNB-Lösung in DMSO	ad 3 mM
Enzymprobe	x
NADPH in TrxR-Assaypuffer	ad 200 μM → Start

Tabelle 14. Pipettierschema für den DTNB-Reduktionsassay

Thioredoxin - Reduktionsassay (Gromer *et al.* (1998))



Für diesen Assay konnten die in der Arbeitsgruppe verfügbaren Thioredoxine aus *Drosophila melanogaster*, die heterolog in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA aufgereinigt worden waren (Kanzok 2001; Bauer *et al.* 2002), verwendet werden. Gemessen wird die NADPH-Oxidation als Absorptionsabnahme bei 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) während der linearen Phase.

Thioredoxinreduktase-Assaypuffer	(für ein Gesamtvolumen von 1ml)
<i>Dm</i> oder <i>E. coli</i> Thioredoxin	x (z.B. 20 μM)
NADPH in TrxR-Assaypuffer	ad 100 μM
Enzymprobe	5- 10 mU/ml → Start

Tabelle 15. Pipettierschema des Thioredoxin-Reduktionsassays

2.3.3.5 Berechnung kinetischer Parameter der DmTrxR, PfAK, PfGAK, Sniffer

Grundsätzlich erfolgte die Berechnung kinetischer Parameter auf der Basis der Gleichungen von Michaelis-Menten. Voraussetzung ist, daß sich das Enzym bei steigender Substratkonzentration einem Maximum annähert und es dann zu keinem weiteren Geschwindigkeitsanstieg, sondern zu einer Abflachung der Kurve kommt. Eine starke Beeinflussung der Substrate untereinander führt zu einer sigmoidalen Kurve und macht die Berechnung eines zusätzlichen Faktors, des sogenannten Hill-Koeffizienten nötig. Als Enzymeinheit wurde statt der gültigen SI-Einheit *katal* [$\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$] die gebräuchlichere Einheit *Unit* [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$] verwendet. Dabei entspricht 1 *Unit* $1,67 \cdot 10^{-8}$ *katal*. Die Kinetik von DmCR und DmTrxR ließ sich nach Michaelis-Menten berechnen.

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Für die Volumenaktivität der NADPH-Oxidation ergibt sich somit

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\text{min} \cdot 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot d} \cdot \frac{\text{Vol}_{\text{Gesamt}}}{V_i} \cdot \text{Vorverd\u00fcnnung}$$

Nach Lineweaver und Burk läßt sich dieser Zusammenhang als lineare Gleichung im Koordinatensystem darstellen, auf dessen x-Achse der Kehrwert der Substratkonzentration und der y-Achse der Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen wird. Die Michaelis-Konstante K_M ergibt sich dann als Kehrwert des Schnittpunktes mit der x-Achse, V_{\max} entspricht dem Kehrwert des Schnittpunktes mit der y-Achse. Beides läßt sich nach Bestimmung der der Gerade zugrundeliegenden Formel gemäß Lineweaver-Burk berechnen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

2.3.3.6 Inhibitorstudien

Die Hemmung der verschiedenen Enzyme wurde in dem jeweiligen Assay-System, üblicherweise mit den Standardsubstratkonzentrationen *in vitro* getestet. Alle angegebenen Werte repräsentieren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Bei der Messung im AK-Assay ist aufgrund des gekoppelten Systems besonders auf ausreichende Kontrollen zu achten. Dafür werden zunächst das Lösungsmittel des

Inhibitors und danach der Inhibitor selbst getestet. Der Testassay besteht zunächst aus den Bestandteilen für die AK-Reaktion, die man einige Minuten ablaufen lässt, um die Reaktionsprodukte zu gewinnen. Nun werden die weiteren Enzyme und der Inhibitor zupipettiert und der Assay für 1 min (oder entsprechend den sonstigen Hemmassays) inkubiert. Danach wird der Assay gestartet und die Aktivität mit dem gleichen Assay ohne Inhibitor verglichen.

2.3.3.7 Einwirkung von Metallionen auf die PfGAK

Der Zusatz von Metallionen zum laufenden Assay erfolgte mit Zinkchlorid, Eisen(II)-sulfat, Eisen(II)-Chlorid und Eisen(III)-citrat, welches jeweils in AK-Puffer vorgelöst war. Um die Einwirkung einer höheren Konzentration von Eisen auf das Enzym zu testen, ohne die Absorption aus dem messbaren Bereich zu bringen, wird die Enzymlösung 5 min mit der Eisenlösung inkubiert und dann zum Assay pipettiert. Zusätzlich wurde an der PfGAK versucht, den Gehalt an gebundenem Eisen durch Zugabe von 10 μM Eisenchlorid zum Medium der Expression in *E. coli* zu erhöhen.

2.3.4 Immunologische Methoden

2.3.4.1 Western-Blot-Analysen mit immunologischem Nachweis

Grundsätzlich stehen das Wet-Blot-Verfahren mit vertikalem Gel bei 4°C und das Semidry-Verfahren mit horizontalem Gel bei Raumtemperatur zur Verfügung. Im Allgemeinen wird heute das Semidry-Verfahren bevorzugt, da es schneller ist. Das deutlich langsamere Wet-Blot-Verfahren schont die Proteine jedoch durch geringere Spannung und niedrigere Temperatur. Genutzt wurde deshalb das Wet-Blot-Verfahren. Dafür lässt man ein SDS-Gel mit den gewünschten Proteinen und einem vorgefärbten Größenstandard laufen und schichtet es ungefärbt nach Herstelleranweisung mit Whatman-Papier und Transfermembran (Nitrocellulose) in eine Blot-Apparatur. Hierbei ist es wichtig, Luftblasen zu vermeiden, weshalb Papiere, Gel und Membran ständig feucht gehalten werden müssen. Die Kammer wird mit gekühltem Blotting-Puffer befüllt und die Proteine bei 4°C und 80-100 Volt für etwa 1 Stunde 20 min übertragen. Um die Proteine zu schonen, gehört zur Kammer ein Eispack und der Puffer wird mittels Magnetrührer laufend durchmischt. Am Standard lässt sich erkennen, ob Proteine aller gewünschten Größen auf die Membran geblottet wurden. Ist dies der Fall, entnimmt man die Nitrocellulose nach Markieren der Banden vorsichtig und überführt sie in eine Färbeschale. Zur Kontrolle kann jetzt in ca. 5 min mit Ponceau-S gefärbt werden. Nach kurzem Waschen mit

Wasser werden unspezifische Bindungsstellen mit 5% Magermilchpulver in TBST-Puffer bei 4°C für mindestens 1 Stunde oder über Nacht geblockt.

Zum immunologischen Färben wird der erste Antikörper 1:500 bis 1:2000 in TBST-Puffer, der 5% Magermilchpulver enthält, verdünnt und der Blot darin bei leichter Bewegung für 1 Stunde inkubiert. Zum Waschen spült man den Blot kurz mit TBST ab und schwenkt erst 15 min, dann 3-mal je 5 min in TBST. Der zweite Antikörper ist an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, wird nach Herstellerangabe in TBST mit 5% Magermilchpulver (Anti-Maus 1:1000) verdünnt, und der Blot für 1 Stunde bei leichtem Schwenken in dieser Lösung inkubiert. Nun wird wiederum wie oben beschrieben in TBST gewaschen.

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

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

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

2.3.4.2 Aufreinigung der Antikörper über Protein-A-Sepharose

Die Aufreinigung der Antikörper über Protein-A-Sepharose erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Amersham, Freiburg). Zur Erhöhung der Ausbeute wurde der Durchlauf nach dem Aufbringen des Antikörpers noch ein weiteres Mal aufgetragen.

2.3.4.3 Antigenspezifische Aufreinigung der Antikörper

Zur weiteren Aufreinigung kann das zugrundeliegende Protein/Antigen verwendet werden. Es ist verständlich, daß dieses möglichst 100%ig sauber sein muss, da die störenden Antikörper häufig gegen genau diese Verunreinigungen gebildet wurden und man den Fehler immer weiter mitschleppt. Es sind zwei Verfahren möglich, deren Unterschied vor allem in den eingesetzten Mengen an Protein und Antikörper liegt.

Aufreinigung über Nitrocellulose (Dot-Blots)

Die Aufreinigung erfolgte gemäß des Protokolls des Lab Manuals (Kapitel 6 (Harlow und Lane 1988)). Hierbei wurden 150 µl einer 80 µg/ml-Antigenlösung auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und der Puffer unter Vakuum nach unten abgesaugt. Die Nitrocellulosemembran wurde 3-mal für je 5 min in PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen danach durch Inkubieren für mindestens 2 Stunden in 3% BSA und 0,02% Natriumazid in PBS blockiert. Wieder wurde gewaschen und nun der Antikörper aufgebracht. Die Antikörperlösung verblieb für 1 Stunde bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken auf dem Blot. Danach wurde wie oben beschrieben 3-mal mit PBS gewaschen und die spezifische Antikörperfraktion mit 100 mM Glycin, pH 2.7 eluiert. Da der niedrige pH-Wert zu einer Denaturierung der Antikörper führen kann, wurde das pH durch Verdünnung mit 2 M Tris (pH nicht eingestellt) möglichst rasch neutralisiert.

Aufreinigung über Antigen-Säule

Die Prozedur folgte im Wesentlichen den Angaben des Herstellers (Pierce, Rockford, USA) des AminoLink®-Säulenmaterials. Die Antigenlösung wurde intensiv gegen 100 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7.0 dialysiert und auf 1-20 mg/ml eingestellt.

Vorbereiten der Säule. 2 ml der AminoLink-Suspension wurden in ein Säulchen gegeben, der Puffer entfernt und 3-mal mit gleicher Menge Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7.0) gewaschen. Im Abzug wurde das gleiche Volumen an vorbereiteter Antigenlösung aufgegeben und 50 µl 1 M NaCNBH₃ zugemischt. Die Säule wurde verschlossen und 2 Stunden lang durch langsames Rotieren gemischt und danach weitere 4 Stunden stehen gelassen. Nach Ablassen des Puffers wurde zweimal mit je 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7.4 gewaschen, wieder 1 ml Tris-HCl aufgegeben und 50 µl 1 M NaCNBH₃ zugemischt. Durch Mischen bei Raumtemperatur für 30 min wurden unspezifische Bindungsstellen des Antigens blockiert. Hierauf wurde mit 10 ml 1 M NaCl und dann 0,05% Natriumazid gewaschen. Die Säule wurde direkt verwendet oder als 50%ige Suspension in 0,05% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

Aufreinigen des Antikörpers. 5 ml gefilterte, oder stark abzentrifugierte Antikörperlösung wird in PBS mit D=5-6 verdünnt und auf die Säule gegeben. Nach 30 min läßt man es langsam durchlaufen und gibt den Durchfluß noch einmal auf. Gewaschen wird mit je 50 ml PBS, dann ImmunolinkWash2-Puffer, und nochmals PBS. Eluiert wird die gebundene Antikörperfraktion mit 100 mM Glycin, pH 2.2 und in 10 Fraktionen von 1 ml gesammelt. Der pH der Säule sollte für eine Weiterverwendung mit 2 M Tris-Puffer wieder angehoben werden. Die gesammelten

Fraktionen werden auf ihren Gehalt an Antikörpern geprüft und die positiven gegen PBS dialysiert, da der geringe pH-Wert die Bindung an das Antigen verhindert.

2.3.4.4 Immunfluoreszenz von parasitierten Erythrozyten

Zur Immunfluoreszenz wurden in jedem Schritt verschiedene Protokolle getestet.

Fixierung. Die ideale Fixierung ist für jedes Protein unterschiedlich. Abgewägt werden muß die Durchlässigkeit der Membranen und damit die Zugänglichkeit des Zielproteins mit dem Versuch die Struktur der Zelle möglichst gut zu erhalten, um dem entstehenden Bild viele Details entnehmen zu können. Methanol fixiert, speziell auch die Merozoiten, während Aceton die Zellmembranen permeabilisiert. Getestet wurden daher jeweils Methanol-, Methanol/Aceton- und Paraformaldehyd-Fixierung.

Methanol. Die Objektträger werden ca. 20 sec (oder 3 min) in eiskaltes Methanol gestellt und an der Luft getrocknet. Hierauf wird der Ausstrich mit Fettstift (PAP-PEN) in einzelne Kästchen unterteilt, bzw. umrandet. Dies minimiert den Verbrauch an Antikörpern und Ausstrichen, da mehrere Tests auf einem Objektträger durchgeführt werden können.

Methanol/Aceton. Die Objektträger werden für 2-5 min in 1:1 Methanol/Aceton fixiert, getrocknet und mit Fettstift umrandet, d.h. unterteilt.

Methanol+Aceton. Der Objektträger wird 20 Sekunden in Methanol getaucht, getrocknet und anschließend 3 min in eiskaltes Aceton gestellt. Danach werden die Objektträger luftgetrocknet und die Kästchen umrandet.

Paraformaldehyd. Zuerst werden gewünschte Bereiche mit Fettstift umrandet, dann die Objektträger in frischer Fixierlösung 30 min inkubiert und direkt mit PBS gewaschen. Danach darf man die Ausstriche nicht mehr trocken werden lassen.

Die Ausstriche werden 3-mal für je 5 min in der Färbekammer gewaschen. Darauf erfolgt eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit 3% BSA oder Milchpulver für 15 min bei 37°C, oder 1 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C. Wieder wird mit PBS gewaschen (s.o.). Zum Färben verdünnt man den spezifischen Erstantikörper 1:50 bis 1:1000 in PBS mit 1% BSA oder Milchpulver und pipettiert die Lösung in die Kammern des Objektträgers. Die Ausstriche werden nun für 30 min oder 1 Stunde in feuchter Kammer inkubiert. Zur Kontrolle wird je eine Kammer nur mit BSA in PBS inkubiert. Nach dem erneuten Waschen (s.o.) erfolgt die 2. Färbung mit dem in PBS/1% BSA verdünnten Zweitantikörper (Verdünnung nach Herstellerangabe) für 30 min oder 1 Stunde in feuchter Kammer. Hierbei ist immer zu kontrollieren, daß die Antikörper auch zusammenpassen, d.h. anti-Maus für in Mäusen produzierte Antikörper etc. Zudem muss auf Lichtschutz für den Fluoreszenzfarbstoff geachtet werden. Die Ausstriche werden jetzt noch einmal in

PBS gewaschen. An dieser Stelle ist eine zusätzliche Färbung mit einem DNA-Farbstoff wie z.B. SytoxGreen™ möglich. Hierfür werden ca. 50 µl 1:10000 in PBS verdünnte Sytox-Lösung auf dem Objektträger in die letzte PBS-Waschlösung verteilt, 5 min inkubiert und dann nochmals gewaschen. Je nach Einbettung belässt man die Ausstriche im Puffer (Mowiol), oder trocknet sie in mindestens 5 min vollständig (VECTASHIELD™, N-propyl-Gallat). Mowiol wird in großen Tropfen auf die Deckgläschen pipettiert und der noch nasse Ausstrich direkt mit der gefärbten Seite nach unten daraufgelegt und umgedreht. Die Ausstriche mit Mowiol werden über Nacht getrocknet.

VECTASHIELD™ und N-propyl-Gallat pipettiert man vorsichtig in die Kammern und legt dann das Deckglas auf. Da diese Medien nicht fest werden, sollte man die Deckgläschen an den Ecken mit Nagellack fixieren. Beim Einbetten und Abdecken ist darauf zu achten, daß sich keine Luftblasen im Medium unter dem Deckgläschen befinden. Die Färbung verblaßt leicht, weshalb in den ersten zwei Tagen mikroskopiert und photographiert wurde. Eine Lagerung ist für ca. 1 Woche bei 4°C in lichtdichter Box möglich.

2.4 Kultivierung von *Plasmodium falciparum* in vitro

2.4.1 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Blutstadien von *Plasmodium falciparum* basiert auf der Methode von Trager und Jensen (Trager und Jensen 1976). Die größte Vereinfachung besteht in der Nutzung eines Inkubators, welcher eine Regelung von Luftfeuchte, O₂- und CO₂-Gehalt erlaubt. Grundsätzlich wird eine Kultur von infizierten Erythrozyten mit serumhaltigem Medium und Erythrozyten der Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv, verdünnt und bei 37°C mit 3% CO₂, 3% O₂ und 95% Luftfeuchte inkubiert. Idealerweise sollte der Hämatokrit zwischen 1-2% und die Parasitämie nicht über 5% liegen. Je nach Anforderungen ist jedoch eine Parasitämie bis 10% vertretbar. Das Medium wird täglich gewechselt, um die Pufferkapazität nicht zu erschöpfen und dem hohen Bedarf der Parasiten an Glukose gerecht zu werden. Je nach *P. falciparum* Stamm verläuft der Zyklus über 48 h (3D7) oder 42 h (Dd2). Zur Überwachung der Parasitämie werden die auch in der Diagnostik standardmäßig durchgeführten Blutausstriche herangezogen. Dazu werden ca. 0,5 ml der gut gemischten Kultur abgenommen, zentrifugiert, 4 µl hiervon auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Dieser Ausstrich wird luftgetrocknet, 10-20 sec in Methanol fixiert und nach weiterem Trocknen für 2-5 min in Giemsa-Lösung

gefärbt. Nach Abwaschen der überschüssigen Farbe wird der getrocknete Ausstrich unter dem Mikroskop betrachtet und infizierte, sowie uninfizierte Zellen ausgezählt.

2.4.2 Synchronisation der Kulturen

Eine Synchronisation der Kulturen erfolgt durch Selektion auf Ringstadien mittels Sorbitol-Lyse der späten Trophozoiten und Schizonten. Dafür wird eine Kultur mit mindestens 5% Ringen abzentrifugiert (10 min, 1.000 rpm, ohne Bremse) und das weiche Pellet in zehnfachem Volumen 5%iger, steriler Sorbitollösung (in H₂O) aufgenommen. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird für 4 min (1.000 rpm, ohne Bremse) abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird mit vorgewärmtem Medium ohne weitere Erythrozytenzugabe versetzt und in neuer Kulturflasche in den Inkubator gestellt.

2.4.3 Selektion auf Gametozyten

Zum spezifischen Anreichern von Gametozyten in Kulturen von *Plasmodium falciparum* wurden verschiedene Methoden veröffentlicht, die jedoch leider nicht zu ausreichenden Anteilen an Gametozyten führten (Lasonder *et al.* 2002; Petmitr *et al.* 1997; Ifediba und Vanderberg 1981). Daher wurde auf eine "Nebenwirkung" von stresserhöhenden Antibiotika zurückgegriffen. Die Zugabe von WR 99210 (Walter Reed Laboratories, Washington) führt zu massivem Stress und damit Umwandlung in Gametozyten (Dr. M. Rug, WEHI, Melbourne, persönliche Mitteilung). 10 nM WR wurde auf Ringstadien gegeben und die Kultur weitergeführt. Nach spätestens 48 h waren ausreichend Gametozyten vorhanden und die Kultur konnte geerntet werden.

2.5 Kristallisation

Das *Hanging-Drop*-Verfahren

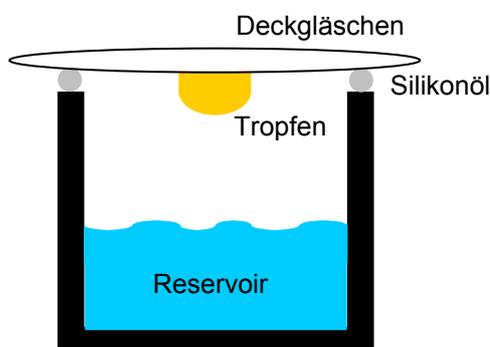


Abbildung 8. Schema eines Kristallansatzes nach dem hanging-drop-Verfahren

Beim *hanging-drop* Verfahren entzieht die Reservoirolösung dem Kristallisations-tropfen gleichmäßig Wasser und erleichtert durch Konzentrations-erhöhung ein vorsichtiges Kristallisieren. In die Vertiefungen einer Linbro Zellkulturplatte werden jeweils 800 µl Reservoirolösung pipettiert und die Proteinlösung mit Zusätzen in die Mitte des runden Deckgläschens gegeben.

Zur Abdichtung gegen Austrocknung wurde der obere Rand dick mit Silikonöl bestrichen und das vorbereitete, gedrehte Deckgläschen daraufgelegt (Abb. 8).

2.5.1 Kristallisations-Screening

Für ein erstes Screenen auf die Kristallisationsbedingungen eines noch nicht kristallisierten Proteins wurden die Lösungen des Kristallisations-Kits 1 und 2 von Hampton Research eingesetzt. Auf diese Weise können relativ schnell über 100 verschiedene Zusammensetzungen getestet werden. Das Kit ist so ausgelegt, daß unterschiedlichste Puffersysteme, Salze und pH Werte kombiniert werden. In der Regel wird mit einer Proteinlösung von 10 mg/ml begonnen und das Reservoir aus 600 µl Puffer mit 200 µl H₂O gemischt. Je 1 µl Proteinlösung wird mit 3 µl Reservoirlösung vermischt als Tropfen am Deckgläschen in die Platte gehängt. Die Platte wird möglichst erschütterungsfrei bei Raumtemperatur gelagert und nach frühestens 5 Tagen unter dem Binokular betrachtet. Weitere Auswertungen erfolgen Wochen bis Monate später. Ansätze, die Kristalle oder Mikrokristalle enthalten, verfolgt man weiter. Zur Kristallisation von Sniffer musste strikt auf eine Temperatur bei 4°C, bzw. unter 10°C geachtet werden, so daß das Pipettieren, die Lagerung der Ansätze und die Auswertung unter dem Binokular im Kühlraum erfolgten.

2.5.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Je nach Ausbeute variiert im 2. Durchgang die Konzentration von Puffer oder Protein, die Zusammensetzung des Puffers, das Tropfenvolumen, oder die Temperatur. Dabei können unterschiedliche Ziele verfolgt werden. Bleiben nahezu alle Tropfen für Monate klar, erhöht man die Pufferkonzentration im Reservoir, während einem Ausfallen eines Großteils der Ansätze mit Konzentrationserniedrigung von Puffer und Proteinlösung begegnet wird. Außerdem kann die Kristallisation bei Raumtemperatur, 4°C, oder 37°C versucht werden. Ansätze, die im ersten Durchgang Kristallwachstum zeigten (z.B. Mikrokristalle), werden wiederholt und den Tropfen je 1 µl der unterschiedlichen Zusätze des Additive Screen 2 (Hampton Research, USA) beigemischt. Hierdurch ergibt sich eine zusätzliche Variation der Bedingungen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Adenylatkinasen aus *Plasmodium falciparum*

3.1.1 Datenbankanalysen zu den Adenylatkinasen aus *P. falciparum*

Die Verfügbarkeit umfangreicher Sequenzdaten aus dem *Plasmodium falciparum* Genomprojekt im Internet ermöglichte die Suche nach Sequenzen, die auf Proteinebene der humanen Adenylatkinase ähneln. Hierfür wurde das Programm Basic Local Alignment Search Tools (BLAST (Altschul *et al.* 1990)) auf den Seiten des National Centers for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) und der Plasmodien-Datenbank (www.plasmodb.org) verwendet. Als Vorlage diente das vollständige offene Leseraster (ORF= Open Reading Frame) des Gens der humanen AK1 (Matsuura *et al.* 1989). Auf diese Weise konnten in *P. falciparum* zwei ORFs identifiziert werden, welche beide die AK-spezifischen, konservierten Bereiche (Tab.) aufweisen. Zudem beinhalten beide die ca. 25 Aminosäuren lange Insertion im Bereich der sogenannten LID-Domäne, was sie den großen AK-Enzymen zuordnet. Umgekehrt wurden die gewonnenen Sequenzen mit allen verfügbaren, beschriebenen Genen verglichen. In *Plasmodium yoelii* finden sich homologe Sequenzen für beide Enzyme mit 65,5% (PfGAK), bzw. 83,9% (PfAK) Identität. Zusätzlich zu den einzeln angegebenen Vorhersagen, sagt PROSITE (Motif search, A. Bairoch, P. Bucher, K. Hofmann) für PfAK und PfGAK noch zahlreiche posttranslationale Modifikationen voraus (s. Anhang, Tabelle A1). Dies ist jedoch nur als Möglichkeit zu verstehen und müßte experimentell nachgewiesen werden. Man geht davon aus, daß die in *E. coli* exprimierten Proteine diese Modifikationen nicht haben.

3.1.1.1 Sequenzvergleiche der PfAK auf *P. falciparum* Chromosom 10

Nukleotidsequenz und ORF der PfAK

Das gefundene offene Leseraster auf Chromosom 10 beinhaltete noch nicht das komplette Gen, sondern nur das zweite Exon ab dem Ende der NTP-Bindungsstelle (Gly42). Durch Vergleiche der in die Aminosäuren übersetzten Nukleotidsequenz *upstream* dieser Stelle, konnten drei mögliche Startsequenzen identifiziert werden von denen eine als wahrscheinlichster Start genauer analysiert wurde (Bestätigung durch PCR siehe unten). Als Anhaltspunkt diente dabei vor allem, daß die Sequenz den ersten Teil der Nukleotidbindungsstelle (Gly35 bis Lys41) enthalten mußte. Anhand bekannter Intron-Exon-Grenzen wurde zudem das wahrscheinliche Intron identifiziert (Abb. 9) und später durch Sequenzierung des PCR-Produktes bestätigt.

Ergebnisse

Innerhalb des ersten Exons fanden sich weitere mögliche Intron-Exon-Grenzen, von denen das zweite (MIKFC...) auch durch PCR mit cDNA als transkribiert nachgewiesen werden konnte.

1	- ATAGTTCATGATTAATGCTTTATTGTATTATTAATAATCGCTTATTTTTTTAGAAATGAA	- 60
	- I V H D * M L Y C I I N N R L F F * N E	
	- * F M I K C F I V L L I I A Y F F R M N	
	- S S * L N A L L Y Y * * S L I F L E * M	
61	- TGAAAATTTAGAAAATTTTTCAACAATTGATTTGTTGAATGAATTAAGAGGAGGTATGC	- 120
	- * K F R K F F S N * F V E * I K E E V C	
	- E N L E N F S T I D L L N E L K R R Y A	
	- K I * K I F Q Q L I C * M N * R G G M H	
121	- ATGTTTGAGTAAACCAGATGGTAGATATATTTTTTTAGGTGCCCCAGGATCTGGAAAAGT	- 180
	- M F E * T R W * I Y F F R C P R I W K S	
	- C L S K P D G R Y I F L G A P G S G K V	
	- V * V N Q M V D I F F * V P Q D L E K Y	
181	- ATAAAAAAAAAATGAAATATATATATATATATGTATGTATGTATTTATATATGA	- 240
	- I K K K * N I Y I Y I C M Y V C I Y I *	
	- * K K N E I Y I Y I Y V C M Y V F I Y E	
	- K K K M K Y I Y I Y M Y V C M Y L Y M N	
241	- ATAAGGGTTATGTCCAACGAGTGCATAATATATAACCCATATGTGTATATTATTGAATA	- 300
	- I R V M F Q R V L N I * P I C V Y Y * I	
	- * G L C S N E C * I Y N P Y V Y I I E *	
	- K G Y V P T S A K Y I T H M C I L L N K	
301	- AATGAACAAACAATAAATAAATAAATAAATATATATATATATATATATATATATATATA	- 360
	- N E Q T N K * I N K Y I Y I Y I Y M Y I	
	- M N K Q I N K * I N I Y I Y I Y I C I Y	
	- * T N K * I N K * I Y I Y I Y I Y V Y M	
361	- TGTATATATGTACGTTTCGTGTGTTTTATTAAATATGTCGTTGTATATGCATCGTCCACT	- 420
	- C I Y V R S C V F I K Y V V Y A S S T	
	- V Y M Y V R V F L L N M S L Y M H R P L	
	- Y I C T F V C F Y * I C R C I C I V H F	
421	- TTTATCCAATATATAATATATTTATTTATTTATTTATTTTTTTTTTTTACCTAGGGAA	- 480
	- F I Q Y I I Y L F I Y L F F F F L P R E	
	- L S N I * Y I Y L F I Y F F F F Y L G N	
	- Y P I Y N I F I Y L F I F F F F T * G T	
481	- CACAATCCTTGAACCTTAAGAAGTCTCATTGTTACTGTCATTATCAACAGGTGATTGT	- 540
	- H N P * T L R S L I V T V I Y Q V I C	
	- T I L E P * E V S L L L S F I N R * F V	
	- Q S L N L K K S H C Y C H L S T G D L L	
541	- TAAGAGAAGCAGCTGAGAAAAAACGGAACCTGGACTTAAAATTAGAACATCATAATG	- 600
	- * E K Q L R K K R N L D L K L R T S L M	
	- K R S S * E K N G T W T * N * E H H * *	
	- R E A A E K K T E L G L K I K N I I N E //	

Abbildung 9. Ausschnitt der Nukleotidsequenz von Chromosom 10 mit Aminosäuresequenz aller drei möglicher Leseraster. Die bestätigten Exons der PfAK sind fett gedruckt, weitere mögliche Start-Methionine schwarz unterlegt.

Alignments

Da die Aminosäuresequenz des ORF von Chromosom 10 die meisten identischen Aminosäuren mit ATP-abhängigen Adenylatkinasen verschiedener Spezies aufwies, wurde das Gen *pfak* genannt. Die Aminosäuresequenz der PfAK besitzt 49% Identität mit der bovinen, humanen, und *Arabidopsis thaliana* AK2, 48% mit der AK2 der Maus und 47% mit dem Hefeenzym (AKy, siehe Abb. 10). An konservierten Sequenzmotiven enthält die Sequenz der PfAK das sogenannte essentielle Lysin an

Ergebnisse

Position 41, die Nukleotidbindungsstelle zwischen Glycin 35 bis Glutamin 44, die Magnesiumbindungsstelle (Asp112), das katalytische Paar von Histidin 56 und Asparaginsäure 112 und weitere Aminosäurereste zur AMP-Bindung, spontanen Faltung und Stabilisierung des Übergangszustandes während der Katalyse (Tab. 16).

hAK2	-----MAPSVPAAEPEYPKGI R AVLLGPPGAGKGTQAPRLAENFCVCHLATG	47
AKy	-----MSSSE-----SIRMVLI G PPGAGKGTQAPNLQERFHAHLATG	38
PfAK	MNENLENFSTIDLLNELKRRYA C LSPDGRYIFLGAPGSG K GTQSLNLKSHCYCHLSTG	60
LdAK2	-----MKIVMEGPPQGGK T TVASVVKERYGLCYVSTS	32
	: : * . * . * * : : : . . : : * .	
hAK2	DMLRAMVASG-SELGK K LKATMDAGKLVSD E MVVELIEKNLET-PLCKNGFLLDGFPRTV	105
AKy	DMLRSQIAKG-TQLGLEAKKIMDQGG L VSDDIMVNMIKDEL T NNPACKNGFILDGFPRTI	97
PfAK	D L LREAAEK K -TEL G LKIKNIINEG K LVDDQMVLSLVDEKLKT-POCKKG F ILDGYPRNV	118
LdAK2	EAVRNAVRLGNSAYSSOLKQ L IDNELIPDSLE V KV C EATR-PCVNGFVLDGFP R TR	91
	: : * : . : * : : . * : * . : : : . * * : * * : * * : * .	
hAK2	RQAEMLDDIMEKRKEK L DSVIEFSIPD S LLIRITGRLIHPKSGRSYHEEFNPPKEPMKD	165
AKy	PQAEKLDQMLKEQGT P LEKAIELKVDELLVARITGRLI H PRSGRSYHKIFNPPKEDMKD	157
PfAK	K Q AE D LNKLLQ K NQTKLDGVFYFN V PDEVLVN R ISGRLI H KPSGRIYHKIFNPPK V PF R D	178
LdAK2	KQSR M QDLEN---VKVDIVVELEIS D KELQ T FRFGGRWYHPKSGRIYHTFY N PLNAGKD	148
	* : . : : : : : : : . : : * . * * : * * * * * * * * : * * * : *	
hAK2	DITGEPLIRRSDDNEKALKIRLQAYHTQT T PLIEYYRKRGIHSAIDASQTPDVVFASILA	225
AKy	DVTGEALVQRSDDNADAL K KRLAAYHAQTEPIVD F YKKTGIWAGVDASQPPATVWADILN	217
PfAK	DVTNEPLIQREDDNEDVL K KRLTVFKSE T SPLISYYKNKNLLINLDATQPANDLEKKISQ	238
LdAK2	DYTGEPLVQHSEDT P ERIRQ R MSQYRQ L SEVRSTFVG-NAWVTVEASGNVESVRNNVFA	207
	* * . * . * : : : : * . . : : * : : : : . : : . : : * * : : : .	
hAK2	AFSKATCKDLV M FI-----	239
AKy	KL G KD-----	222
PfAK	HID G -----	242
LdAK2	VLDPLYFAQ T SKKVPK P WWK F W	229
	: .	

Abbildung 10. Alignment der PfAK (Accession-Nr. AAM95703) mit AK2 - Isozymen des Menschen (hAK2, Accession-Nr. U39945) und *Leishmania donovani* (LdAK2, Accession-Nr. AAD39831), sowie der AK aus Hefe (AKy, Accession-Nr. X06304/Y00413).

Helical Wheel - Projektion

In Anlehnung an die Publikation von Schrickler *et al.* (2002) wurde der interne Bereich der PfAK auf das Vorhandensein einer amphiphatischen Helix überprüft. Diese gilt als wichtiges Importsignal für eine Translokation in die Mitochondrien, bzw. durch Membranen (Schrickler *et al.* 2002). Der Bereich zwischen den Aminosäuren Valin 118 und Lysin 130 lässt sich als ein solches "helical wheel" darstellen, bei dem die polaren Reste entlang der einen, und die hydrophoben Reste entlang der anderen Seite der Helix liegen (Abb. 11).

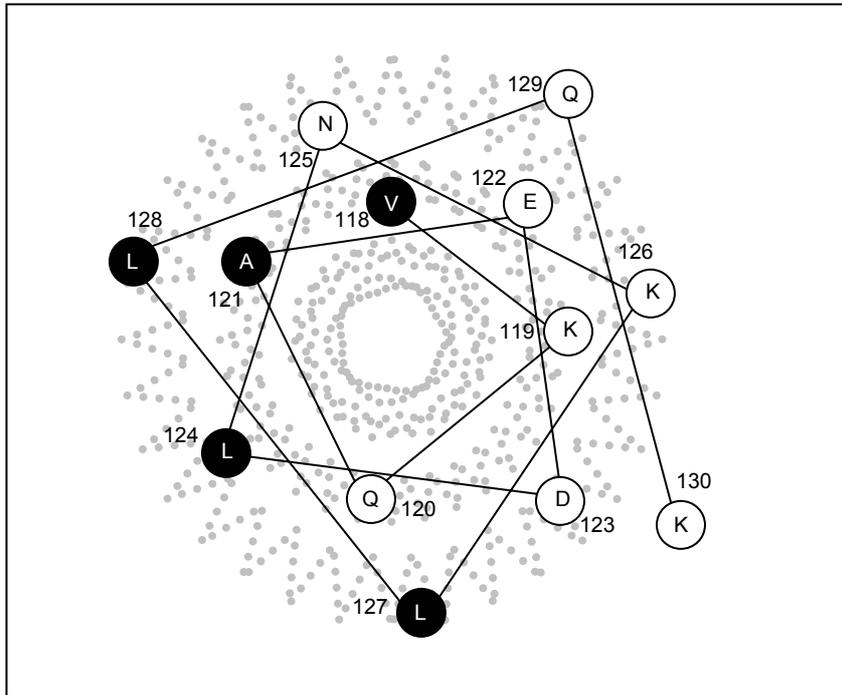


Abbildung 11. Helical-Wheel-Projektion der Aminosäuresequenz Val118 bis Lys130 der PfAK. Die Ansicht ist vom C-Terminus, wobei polare Reste als weiße und hydrophobe Reste als schwarze Kreise dargestellt sind.

3.1.1.2 Sequenzvergleiche der PfGAK von *P. falciparum* Chromosom 4

Das auf Chromosom 4 identifizierte offene Leseraster umfaßte ein komplettes Gen vom Start-Methionin bis zum Stop-Codon. Das entsprechende Genprodukt wurde aufgrund der Ähnlichkeit mit GTP-AMP-Transphosphorylasen GTP-abhängige Adenylatkinase (GAK) genannt. Alle bekannten konservierten Aminosäuren sind in GAK erhalten. Dazu gehören die an der AMP-Bindung beteiligten Reste (Lys13, Leu35, Gly46, Leu58, Val59, Gln94), der sogenannte P-Loop, welcher die NTP-Bindungsstelle darstellt (Gly7 bis Thr15) und die Reste, die eine spontane Faltung ermöglichen (Gly46 und Val59). Desweiteren gehören zu den konservierten Aminosäuren das "katalytische Paar" Histidin 28 und Asparaginsäure 86, wovon letztere Magnesium (Mg^{2+}) bindet, sowie je zwei Arginine und Asparaginsäuren (Arg124, Arg167, Asp169, Asp170), welche der Stabilisierung des Übergangszustandes dienen. Im Bereich der LID-Domäne wies die PfGAK zudem die für die großen Adenylatkinasen typische Erweiterung (Gly123 bis Asp170) auf. Als Besonderheit bei der Betrachtung dieser konservierten Reste fällt der komplett erhaltene Zinkfinger aus 4 Cysteinen und einem zusätzlichen Histidin innerhalb der LID-Domäne auf. Dieser Bereich findet sich auch in der Sequenz der NMP-Kinase aus *Babesia bovis*. Vergleicht man diesen Zinkfinger gesondert mit den Datenbanken

Das ähnlichste Enzym des Menschen ist die humane AK5, die zu den kurzen AK-Isoformen, gehört mit einer Identität von 25%.

3.1.1.3 Phylogramm der AKs von Plasmodien, Trypanosomen und Babesien

Beim Vergleich von Alignments (CLUSTALW) und Phylogramm fällt auf, daß nur eine der zahlreichen AKs aus Trypanosomen mit den Enzymen aus Plasmodien (PfAK) und *Cryptosporidium* clustern. Die weiteren AK-Isozyme aus Trypanosomen bilden eigene Gruppen, ebenso wie weitere AK-Isozyme aus *Plasmodium* zusammen mit der NMP-Kinase aus *Babesia* ein eigenes Cluster bilden. Im Gegensatz dazu zeigen Alignments eine weniger speziesspezifische Zuordnung, bei der sich die Plasmodienenzyme zu ihren Homologen aus *Trypanosomen* ordnen.

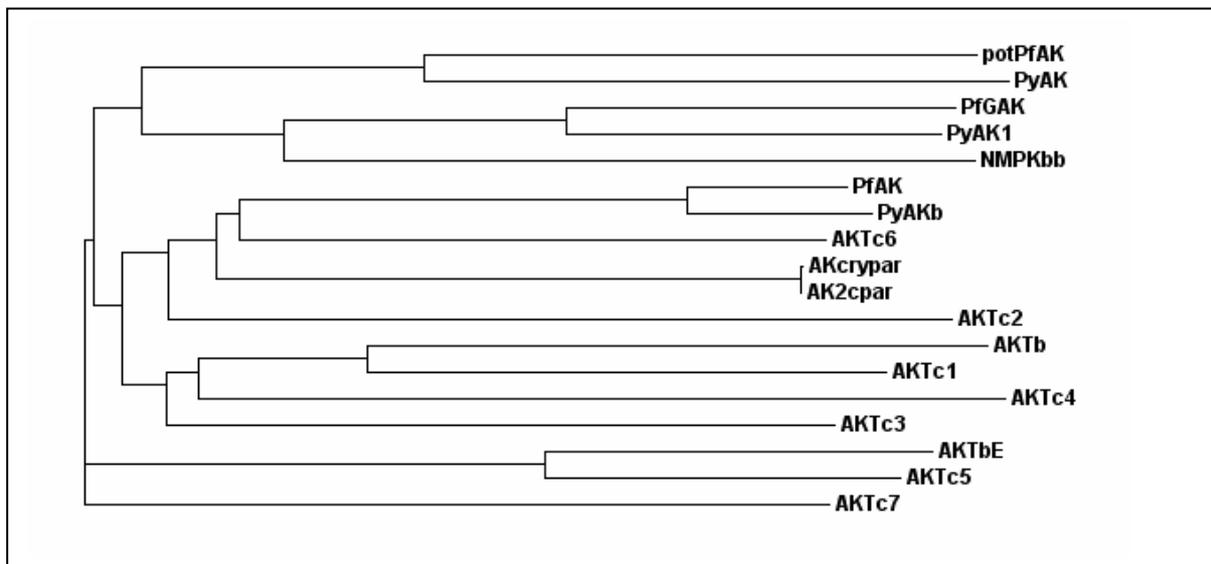


Abbildung 14. Phylogramm (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) der Adenylatkinasen aus *Plasmodium falciparum* (PfAK, GAK, potPfAK), *Plasmodium yoelii* (PyAK, PyAK1, PyAKb), *Trypanosoma brucei* (AKTb, AKTb1), *Trypanosoma cruzi* (AKTc1-7) und der NMP-Kinase aus *Babesia bovis* (NMPKbb).

Motiv	PfAK	PfGAK
Essentielles Lysin	Lys41	Lys13
Mg ²⁺ -Bindung	Asp112	Asp86
NTP-Bindung, $\beta\gamma$ Phosphatbindungs-Loop	Gly35 bis Gln44	Gly7 bis Thr15
AMP-Bindung	Lys41, Leu63, Gly74, Leu86, Val87, Gln120	Lys13, Leu35, Gly46, Leu58, Val59, Gln94
Katalytisches Paar	His56, Asp112	His28, Asp86
Stabilisierung des Übergangszustandes	Arg155, Arg188; Asp190, Asp191	Arg124, Arg167, Asp169, Asp170
Spontane Faltung	Gly74, Val87	Gly46, Val59
Extra-Loop in LID-Domäne	Gly162 bis Asp191	Gly123 bis Asp170
Amphiphatische Helix	Val118 bis Lys130	
Zinkfinger	---	Cys127, Cys130, Cys155, Cys158, HIS161

Tabelle 16. Übersicht über die konservierten Aminosäuren der PfAK und PfGAK

3.1.2 PCR-Amplifikation und Klonierung der Gene der PfAK und PfGAK

3.1.2.1 Amplifikation und Klonierung des Gens der PfAK

Die PCR mit AK2f/AK2r als Primern ergab sowohl mit gametozytischer, als auch mit cDNA aus Blutstadien als Matrize ein Produkt von ca. 750 bp, was der berechneten Größe von 730 bp entspricht. Das Produkt der PCR mit gametozytischer cDNA wurde als Matrize einer weiteren PCR mit Schnittstellen für *Bam*H1 (AK2Bamf) und *Hind*III (AK2Hindr) eingesetzt. Das *Bam*- und *Hind*- geschnittene Produkt der 2. PCR wurde in pSK ligiert und ergab *pfak*/pSK. Nach Klonierung zeigte dieses Plasmid geklont in der Sequenzierung ein durchgängiges Leseraster, in dem die Reste des vorhergesagten Introns fehlten. Die Sequenz entsprach somit den Vorhersagen, und damit dem Datenbankeintrag. Umklonierung mittels der Schnittstellen in den Expressionsvektor pQE30 ergab *pfak*/pQE30. Testexpressionen der PfAK in verschiedenen *E. coli*-Zellen zeigten die beste Expression in C41-Zellen nach Induktion mit 300 μ M IPTG. Die Aufreinigung aus dem *E. coli*-Extrakt erfolgte über Ni-NTA. Schon bei 40 mM Imidazol eluierte das Protein in unsauberen Fraktionen, so daß eine weitere Aufreinigung über FPLC nötig wurde. Nach diesem zusätzlichen

Reinigungsschritt zeigte die PFAK im SDS-Gel nur noch eine leichte Doppelbande, bei höherer Konzentration zusätzlich eine Doppelbande um 66 kDa (Abb. 15). Die Bande, die knapp unter der normalen PFAK im SDS-Gel lief, konnte mit N-terminaler Ansequenzierung ebenfalls als PFAK identifiziert werden und ist damit entweder Abbruchprodukt, oder eine andere Konformation des Proteins.

3.1.2.2 Amplifikation und Klonierung des Gens der PfGAK

Die PCR mit gametozytischer cDNA als Template und den Primern AK3f und AK3r ergab eine Bande von fast 700 bp und entsprach somit der erwarteten Größe von 690 bp. Die ausgeschnittene und aufgereinigte Bande wurde verdünnt (D=10) als Template der folgenden PCR mit Primern AK3Bamf und AK3Hindr eingesetzt. Das Produkt hatte nahezu die gleiche Größe wie das vorige mit wenigen zusätzlichen Basenpaaren für die Schnittstellen. Nach dem Verdau mit *Bam* und *Hind* und nachfolgender Aufreinigung wurde es in pSK kloniert. Die Sequenzierung ergab für pSK/PfGAK die bereits vermutete Sequenz ohne Austausch oder Fehler. Dieser Vektor wurde in *E. coli* (XL1-Blue) vermehrt, das Plasmid aufgereinigt, mit *Bam* und *Hind* verdaut und in vorgeschrittenen Vektor pQE30, bzw. pQE60 ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide waren *pfgak/pQE30* und *pfgak/pQE60*. Da durch Verwendung des Vektors pQE60 keine Verbesserung der Ausbeute erzielt wurde, erfolgte die Expression in pQE30. Die in C43-Zellen mit 1 mM IPTG exprimierte GAK (*pfgak/pQE30*) eluierte bei 75 mM Imidazol und wies im SDS-Gel mit Coomassie-Färbung eine Bande bei ca. 25 kDa auf (Abb. 15).

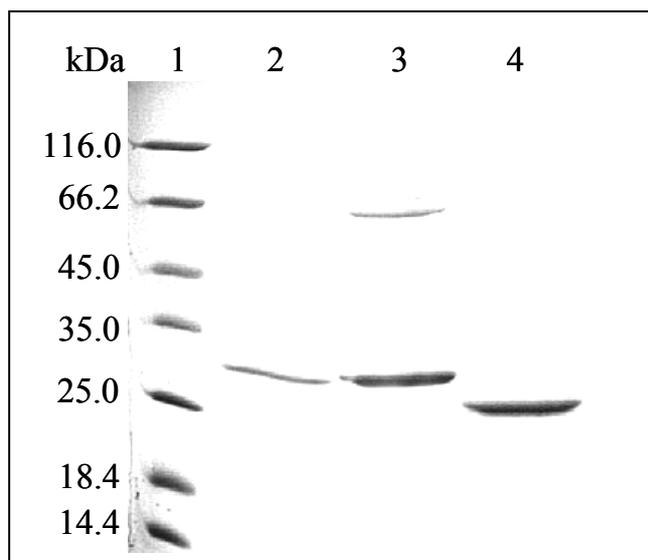


Abbildung 15. SDS-PAGE der rekombinanten, aufgereinigten PFAK und PfGAK, gefärbt mit Coomassie.

Spur 1: Molekulargewichtsstandard;

Spur 2: rekombinante PFAK der 32 kDa-Fraktion nach Aufreinigung über Säulenchromatographie (Superdex 200 in US-Puffer, pH 7.5, 1ml/min);

Spur 3: rekombinante PFAK der 95 kDa-Fraktion nach Aufreinigung über FPLC;

Spur 4: rekombinante PfGAK

3.1.2.3 Gelfiltration der PfAK: Molekulargewicht und Assoziation mit HSP70

Gelfiltration noch verunreinigter Fraktionen über eine Superdex 200 - Säule zeigten zahlreiche Peaks unterschiedlicher Größe, von denen drei Fraktionen deutliche AK-Aktivität aufwiesen (Abb. 16). Die diesen Peaks entsprechenden Molekulargewichte lagen bei 37, 90 und 180 kDa. Nachfolgende Analyse im SDS-Gel zeigte Banden in der Größe von 30 und 68 kDa, die beide N-terminal ansequenziert wurden.

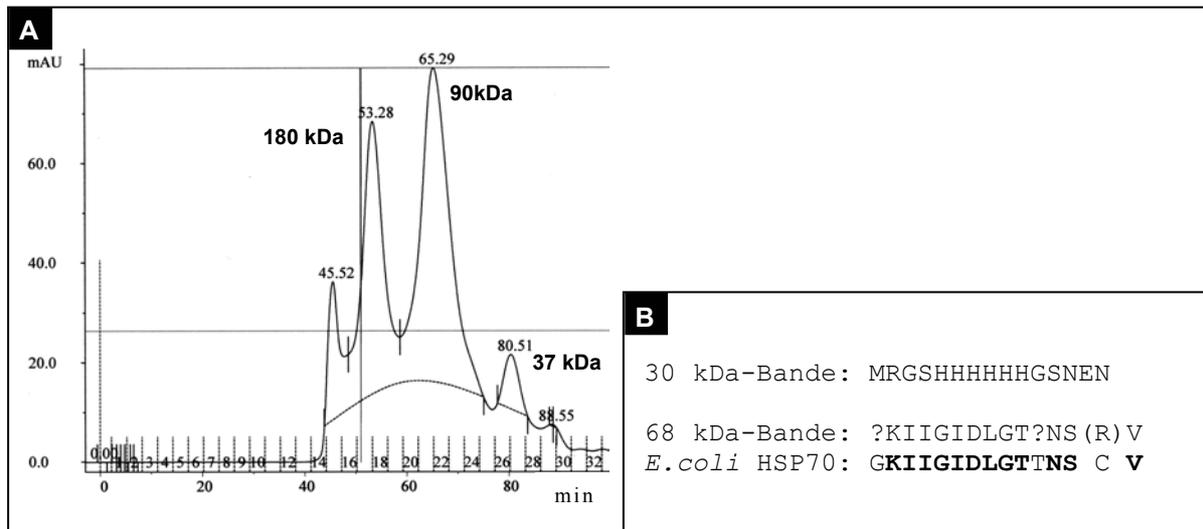


Abbildung 16. Säulenchromatographie der PfAK und Analyse der Fraktionen. **A** Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute. Angegeben sind die berechneten Molekulargewichte der Fraktionen mit AK-Aktivität. **B** N-terminale Sequenzierung der beiden im SDS-Gel identifizierten Banden und die Sequenz des *E. coli* HSP70 (accession P04475). "?" steht als Platzhalter für eine nicht identifizierbare Aminosäure, die Klammern zeigen eine nicht eindeutig identifizierte Aminosäure an.

Die obere Sequenz entspricht dem N-terminalen His-tag und den ersten drei Aminosäuren der gesuchten PfAK. Die untere Sequenz ließ sich durch Datenbankrecherchen eindeutig als *E. coli* Hitzeschockprotein von 70 kDa identifizieren. Die im Standardassay bestimmte AK-Aktivität war mit 20 U/mg für das 90 kDa-Fragment am höchsten und wies damit das 2.5-fache der Aktivität der freien PfAK auf (Tab. 17).

Gelfiltration Superdex 200	SDS-Gel 12%	Aktivität im AK-Assay	entsprechendes Protein (nach Ansequenzierung)
ca. 37 kDa	30 kDa* [#]	4 U/mg [#]	30 kDa: rekombinante PfAK
ca. 90 kDa	30 kDa + 68 kDa	20 U/mg	68 kDa: <i>E. coli</i> HSP70
ca. 180 kDa	30 kDa* + 68 kDa	10 U/mg	rek. PfAK + <i>E. coli</i> HSP70

Tabelle 17. Übersicht über die Untersuchungen im Zusammenhang mit der Gelchromatographie der PfAK. Es sind die Peaks der Säulenchromatographie, die Banden des SDS-Gels, die AK-Aktivität und die Ergebnisse des N-terminalen Ansequenzierens zusammengestellt.

* nur sehr schwache Bande sichtbar, [#] weitere Verunreinigungen im Gel

Der Bindungsplot für die DnaK, das HSP70-Protein aus *E. coli* (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) zeigte mehrere wahrscheinliche Bindungsstellen in der Sequenz der AK (Abb. 17).

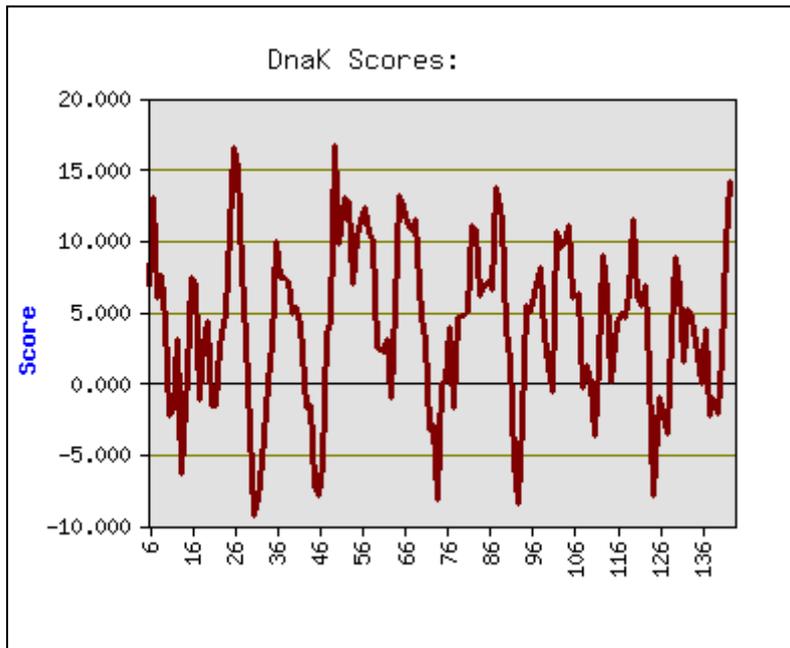


Abbildung 17. Plot potentieller DnaK-Bindungsstellen der PfAK. Positionen mit einem Wert von unter -5 gelten als gute DnaK-Bindungsstellen (Rudiger *et al.* 1997). DnaK ist das HSP70 aus *E. coli* und steht als Modell für die HSP70-Proteine und allgemein.

3.1.3 Enzymkinetische Charakterisierung der PfAK und PfGAK

3.1.3.1 pH- und Pufferprofile

Für die Reaktion in Richtung ADP wurden für beide Adenylatkinasen verschiedene Puffer mit pH-Werten zwischen 5.0 und 8.5 getestet. Erhöhte Salzkonzentrationen bis zu 250 mM KCl hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität beider Enzyme. Da der Salzgehalt die Lagerfähigkeit verbesserte, wurde dennoch ein Puffer mit üblichem, das heißt gut vergleichbarem Salzgehalt gewählt.

PfAK zeigte die höchste Aktivität in Tricine-Puffer, pH 5.0 mit einem weiteren Maximum bei pH 8.0. In TEA-HCl-Puffer lag das Maximum bei pH 5.5 ohne weitere Maxima im Bereich bis pH 8.5 (Abb. 18). Obgleich der höchste Aktivitätswert bei pH 5.0 lag, wurden die Messungen bei pH 6.0 durchgeführt, um Nebeneffekte aufgrund des sehr sauren Milieus zu verringern.

Ergebnisse

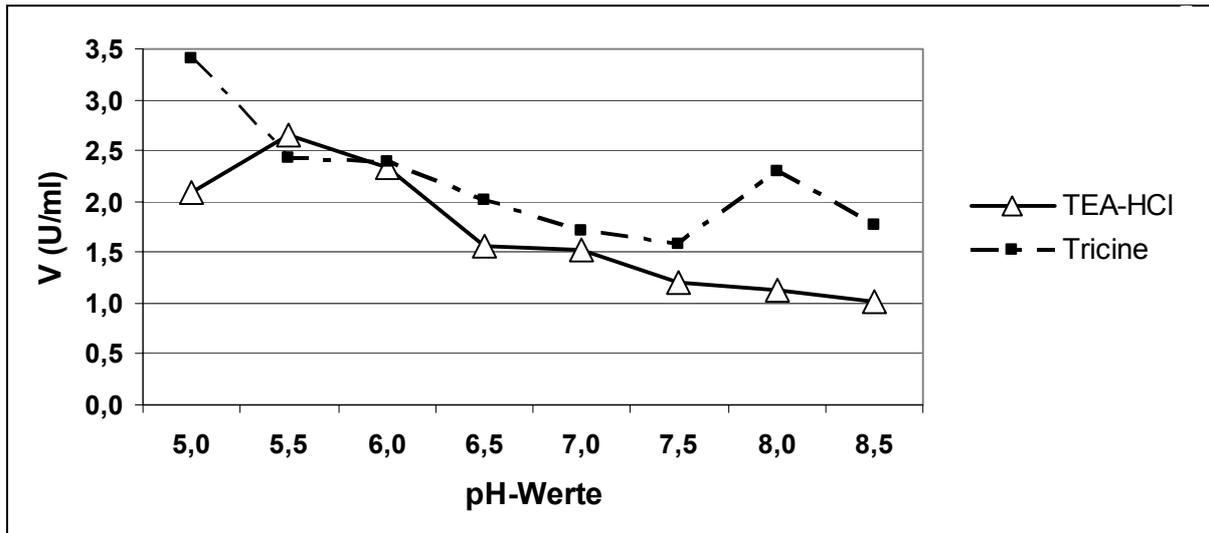


Abbildung 18. pH-Profil der PfkA mit den Puffern TEA-HCl (110 mM TEA-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 60 mM KCl) und Tricine (60 mM Tricine, 1,5 mM MgCl₂, 110 mM KCl). Die pH-Werte wurden zwischen 5.0 und 8.5 variiert. Auf der y-Achse ist die Volumenaktivität aufgetragen (V). Sämtliche Werte sind Mittelwerte aus 3 Einzelbestimmungen.

Das Pufferprofil der PfkGAK zeigte für TEA-HCl ein Maximum bei pH 6.0 und für den Tricine-haltigen Puffer zwei Maxima bei pH 5.5 und 8.0 (Abb. 19). Obgleich der Wert im Tricine-Puffer bei pH 5.5 am höchsten war, wurde bei pH 6.0 in TEA-HCl-Puffer gemessen, da die Ergebnisse so am besten mit bereits publizierten Daten verglichen werden konnten.

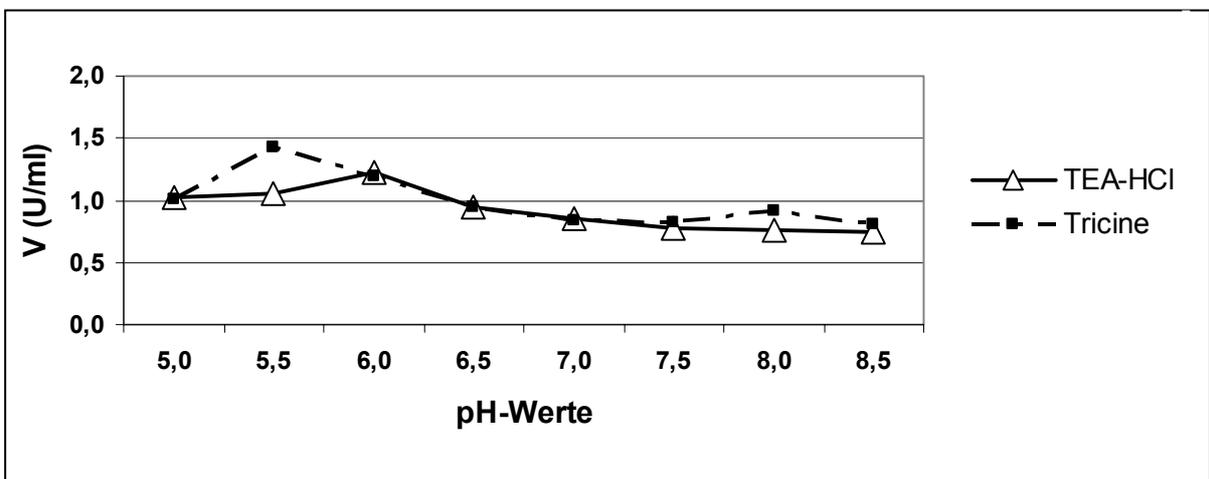


Abbildung 19. pH-Profil der PfkGAK mit den Puffern TEA-HCl (110 mM TEA-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 60 mM KCl) und Tricine (60 mM Tricine, 1,5 mM MgCl₂, 110 mM KCl). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Volumenaktivität (V) aus drei Einzelbestimmungen. Die pH-Werte wurden zwischen 5.0 und 8.5 variiert.

3.1.3.2 Substratspektren

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Aktivität der Enzyme mit verschiedenen, strukturell sehr ähnlichen Substanzen getestet. Dafür kommen bei AKs die Mono- und Triphosphate von Adenosin, Cytidin, Guanosin, Inosin und Uridin in Frage. Bei

der Bestimmung der Substratspektren zeigte sich für beide eine deutliche Spezifität für das Monophosphat AMP, während neben ATP, bzw. GTP auch andere Triphosphate umgesetzt wurden (Tab. 18). Interessanterweise zeigte sich für die PfAK bei physiologischem pH von 7.4 ein deutlich anderes Substratspektrum mit geringerer Spezifität der Triphosphat-Bindungsstelle. Während die Aktivität mit ATP auf weniger als die Hälfte absank, nahmen die spezifischen Aktivitäten der alternativen Substrate deutlich zu. Für die PfGAK wurde keine deutliche Veränderung bei pH 7.4 festgestellt.

Substratspektrum	PfAK bei pH 6.0		PfAK bei pH 7.4		PfGAK bei pH 6.0
	[U/mg]	[%]	[U/mg]	[%]	
Monophosphate					
AMP	13.25	100	9.62	72.6	100
IMP	< 0.2	0	< 0.2	0	4
GMP/CMP/UMP	< 0.2	0	< 0.2	0	<2
Triphosphate					
ATP	16.8	100.0	7.1	42.3	< 2
UTP	2.3	14.0	3.3	19.6	27.4
ITP	1.4	12.0	2.9	17.3	27.2
CTP	1.4	8.8	1.6	9.5	22.2
GTP	1.3	7.8	1.6	9.5	100.0

Tabelle 18. Substratspektren der PfAK bei pH 6.0 und 7.4, sowie der PfGAK bei pH 6.0 in TEA-HCl-Puffer. Prozentzahlen der AK beziehen sich auf den Wert mit AMP bei pH 6.0 für die Monophosphate und ATP bei pH 6.0 für die Triphosphate. An der PfGAK wurden der Wert mit AMP für die Monophosphate und der Wert mit GTP für die Triphosphate als 100% gesetzt.

3.1.3.3 Bestimmung kinetischer Konstanten (K_M , V_{max})

Der K_M an einem Enzym entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Umsetzungsgeschwindigkeit für dieses Substrat erreicht wird. Hierbei ist die Affinität des Enzyms für das Substrat umso höher, je geringer der K_M -Wert ist. Ermittelt wurden die Werte im Lineweaver-Burk-Diagramm mit doppelt-reziproker Darstellung von Reaktionsgeschwindigkeit über Substratkonzentration mittels linearer Regression.

Zum Vergleich der Plasmodienenzyme mit Adenylatkinasen anderer Spezies wurden K_M - und V_{max} -Werte nach Michaelis-Menten bestimmt. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten wurde der Mittelwert der delta A über 90 Sekunden jeweils nach einer Minute Laufzeit des Assays gewählt, da hier ein nahezu linearer Verlauf beobachtet werden konnte.

Bestimmung kinetischer Konstanten an PfAK

Unter obigen Bedingungen und in Anwesenheit von 400 μM AMP ergab sich an der PfAK ein K_M für ATP von 130 μM . Für AMP lag der K_M in Anwesenheit von 250 μM ATP, pH 6.0 bei 175 μM , in doppelt konzentriertem Tris-HCl (220 mM) mit 110 mM MgCl_2 bei pH 8.6 betrug der K_M für AMP nur 50 μM . In Anwesenheit von 2 mM AMP wurde zudem ein K_M von 200 μM für GTP gemessen. Im reversen Assay, welcher die Bildung von ATP und AMP aus zwei ADP-Molekülen mißt, wurde zudem ein K_M von 400 μM für ADP bei pH 7.5 bestimmt. Besonders der V_{max} -Wert war deutlich abhängig von der Laufzeit des Assays. Unter den oben beschriebenen Bedingungen ergab sich an der PfAK ein V_{max} - Wert von 75 U/mg und damit ein Substratumsatz (k_{cat}) von 2160 pro min.

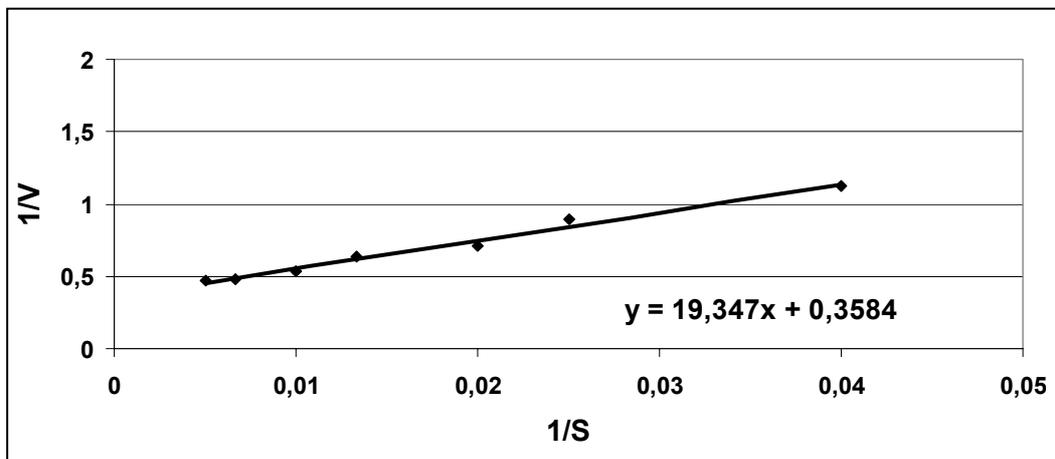


Abbildung 20. Diagramm eines K_M -Wertes nach Lineweaver-Burk für AMP an der PfAK. Der K_M bei pH 8.6 in Anwesenheit von 0,8 mM ATP beträgt 54 μM . Aufgetragen ist der Kehrwert der Volumenaktivität über dem Kehrwert der Substratkonzentration. Angegeben ist zudem die der Trendlinie zugrunde liegende lineare Gleichung.

Bestimmung kinetischer Konstanten an PfGAK

Die K_M -Werte wurden jeweils in Anwesenheit von 800 μM des zweiten Substrates gemessen und lagen bei 210 μM für AMP und bei 130 μM für GTP. Der V_{max} -Wert der PfGAK betrug 100 U/mg und der Substratumsatz (k_{cat}) damit 2800 min^{-1} . Problematisch war die Messung von ITP als Substrat der PfAK und PfGAK. Hier zeigte sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf, der eine einfache K_M -Messung unmöglich machte. Da ITP nur mit sehr niedriger Präferenz umgesetzt wird, wurde dieses Phänomen nicht näher verfolgt.

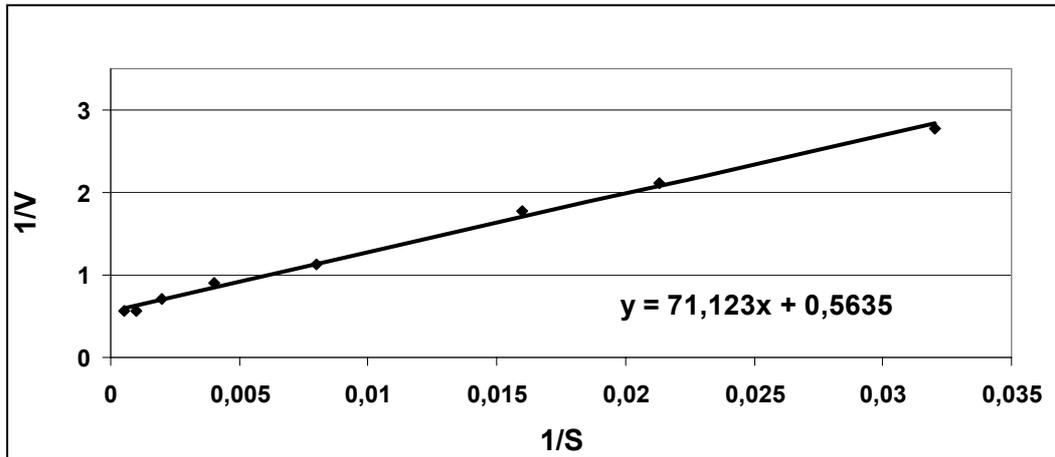


Abbildung 21. Diagramm eines K_M -Wertes nach Lineweaver-Burk für GTP an der PfGAK. Der K_M bei pH 6.0 in Anwesenheit von 1 mM AMP beträgt 126 μM . Aufgetragen ist der Kehrwert der Volumenaktivität über dem Kehrwert der Substratkonzentration. Angegeben ist die der Trendlinie zugrunde liegende lineare Gleichung.

3.1.4 Inhibitorstudien

3.1.4.1 Hemmung durch AP₅A, GP₅A

Die Hemmung durch AP₅A, bzw. GP₅A an PfAK, bzw. GAK war abhängig von der Konzentration der Substrate. Keine Hemmwirkung in Konzentrationen von bis zu 5 mM hatten die Malariatherapeutika Chloroquin, Primaquin, Mefloquin und Artemisinin.

Für AP₅A an PfAK ergab sich ein IC_{50} von 1,15 μM bei pH 6.0 und 300 nM bei pH 7.5 mit ATP und AMP bei doppelter K_M -Konzentration, das heißt 250 μM und 400 μM , respektive (Tabelle 19). Für GP₅A betragen die IC_{50} -Werte an der PfAK 21 μM (pH 6.0) und 11 μM (pH 7.5). Der K_i -Wert für AP₅A bei pH 6.0 wurde aus dem IC_{50} -Wert berechnet (s. Methoden) und im Dixon-Plot bei knapp 400 nM bestätigt. Obgleich hier kein eindeutiger Hemmtyp bestimmt werden konnte, wurden aufgrund der guten Übereinstimmung auch für die anderen IC_{50} K_i^{app} -Werte unter Annahme einer kompetitiven Hemmung berechnet. Auf weitere Dixon-Plots verzichtete ich jedoch wegen der inkonsistenten Meßergebnisse innerhalb des ersten Plots. Atractylosid zeigte einen nur schwachen Hemmeffekt, der zu einem IC_{50} von 18 mM führte.

GP₅A an der PfGAK führte zu einem IC_{50} von 16 μM in Anwesenheit von je 1 mM GTP und AMP, sowie 1,5 μM mit GTP-Konzentration bei K_M und AMP bei 800 μM (~ doppelte K_M -Konzentration). Atractylosid hemmte die GAK deutlich schlechter mit einem IC_{50} von 1 mM. Deferoxamin als Eisenchelator hemmte die PfGAK nicht.

Enzym	Inhibitor	pH	IC ₅₀ (μM)	K _i ^{app} (μM)
PfAK	AP ₅ A	6.0	1,15	0,38
		7.5	0,30	0,10
	GP ₅ A	6.0	21	7
		7.5	11,1	3,7
PfGAK	AP ₅ A	6.0	32	11,4
	GP ₅ A	6.0	1,5	0,5

Tabelle 19. Inhibition der rekombinanten PfAK und PfGAK durch die Disubstratanaloga AP₅A und GP₅A. Die Werte für K_i^{app} wurden unter der Annahme einer kompetitiven Hemmung berechnet.

3.1.4.2 Test des Inhibitors GP₅A an Malaria-Kulturen

Die Einwirkung des Inhibitors auf Malariakulturen über 48 Stunden führte bei einer Konzentration von unter 120 μM zu keinen signifikanten Unterschieden im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Bei 120 μM GP₅A waren die Ringe etwas kleiner und es waren etwas mehr Parasiten im Trophozitenstadium verblieben. Auffällig war jedoch eine in einem Teil der Parasiten stark vergrößerte Vakuole.

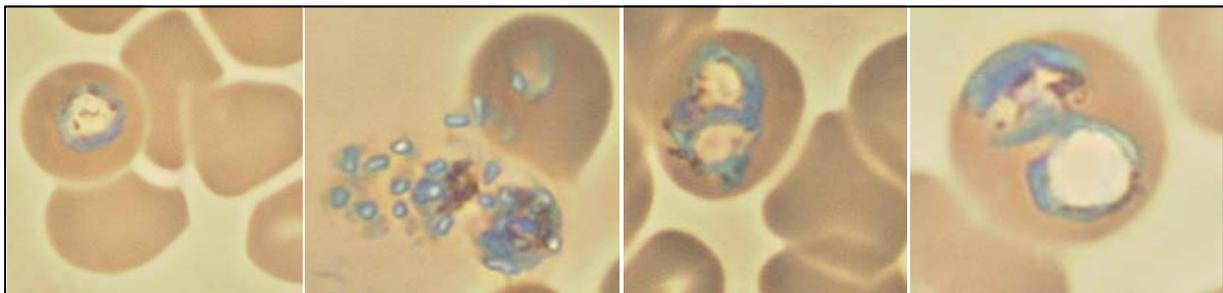


Abbildung 22. Infizierte Erythrozyten nach Behandlung mit 120 μM GP₅A. Deutlich zu sehen ist die große Vakuole im Inneren der Parasiten. Die Ausstriche für die Photos waren mit Giemsa gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet (100-fache optische Vergrößerung).

3.1.5 Proteinnachweis mit Antikörpern

3.1.5.1 Nachweis im Plasmodienextrakt mittels Western-Blot

PfAK-Antikörper auf Plasmodienextrakt zeigte deutliche Banden in gleicher Größe wie das aufgereinigte Protein im SDS-Gel bei höherer Konzentration (Abb. 23). Das gleiche Muster zeigte sich auch im Extrakt transformierter, PfAK-überexprimierender *E. coli*-Zellen, während eine Färbung mit einem gegen den HIS-tag gerichteten Antikörper im *E. coli*-Extrakt nur die PfAK und im Parasitenextrakt nur ein bekanntes, histidinreiches Protein anfärbte.

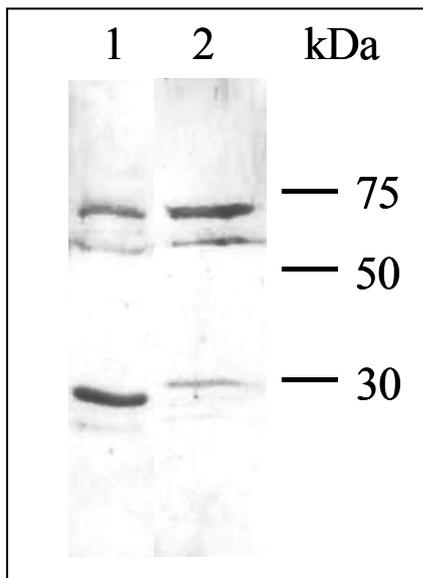


Abbildung 23. Western-Blot der PfAK. Verwendet wurden polyklonale Kaninchen-Antikörpern, die gegen das rekombinante Protein gerichtet waren.

Spur 1: Rekombinante PfAK

Spur 2: *P. falciparum* - Extrakt

Die Bande bei ca. 30 kDa entspricht dem Molekulargewicht der monomeren PfAK. Die Bande bei ca. 68 kDa konnte in der Aufreinigung der rekombinanten PfAK aus *E. coli* durch N-terminales Ansequenzieren als HSP70 identifiziert werden. Analog dazu handelt es sich im Parasitenextrakt dabei wahrscheinlich um das plasmodiale HSP70.

3.1.5.2 Lokalisation in fixierten infizierten Erythrozyten mit Immunfluoreszenz

Zur Bestätigung der vermuteten Lokalisation der Adenylatkinasen innerhalb der Parasiten wurden die Proteine in fixierten, infizierten Erythrozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Da die PfAK vermutlich in allen Kompartimenten vorliegt, konzentrierte ich mich hauptsächlich auf die PfGAK. Nach Aufreinigung des Antikörpers über an Säulenmaterial gebundenes Antigen, zeigten erste Immunfluoreszenzanalysen Anfärbungen einer Struktur im Inneren von Gametozyten. Auf dieser Basis sollen in Kürze weitere Studien zur Lokalisation beider Enzyme folgen.

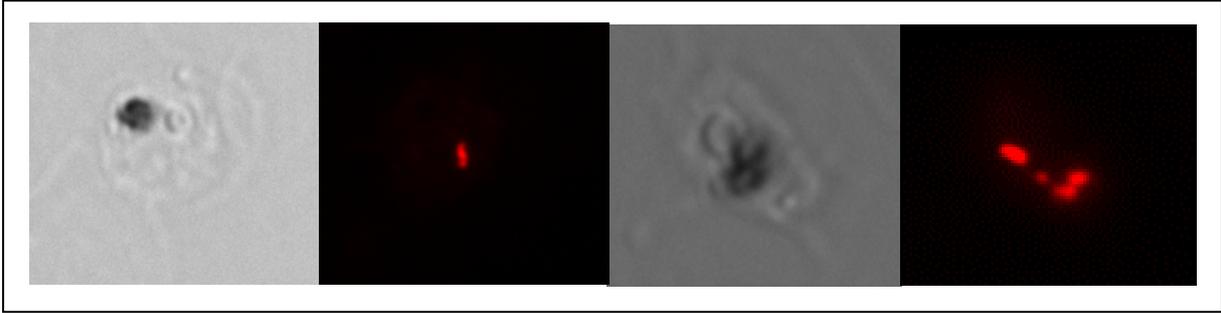


Abbildung 24. Lokalisation der PfGAK mittels Immunfluoreszenz. Der gegen das rekombinante Protein gerichtete Antikörper war über eine Antigensäule aufgereinigt. A und C zeigen Phasenkontrastaufnahmen (100-fache optische Vergrößerung), in B und D ist die Immunfärbung zu sehen. Angefärbt ist eine Struktur im Inneren des Parasiten, vermutlich das Mitochondrion (s. Text).

3.1.6 Metallbindung der PfGAK

3.1.6.1 Metallbestimmung in GAK mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie

Die Metallbestimmung per Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) erfolgte im Labor P. Seelig und Kollegen in Karlsruhe. Dabei wurden neben Zink und Eisen auch Kobalt, Kupfer und Mangan gemessen. Vier verschiedene Aufreinigungen mit unterschiedlicher Proteinkonzentration (0,3-1,0 mg/ml) und einmal Eisenzusatz (10 μ M zum LB-Medium) ergaben jeweils eine Stöchiometrie von 1 Mol Fe auf 3 Mol PfGAK. Abgesehen von einer Probe mit leichter Verunreinigung mit Nickel, welches vermutlich von der Affinitätssäule stammte, waren weitere Metalle in den Proben nicht enthalten.

3.1.6.2 Spektrum der GAK im Vergleich mit PfAK

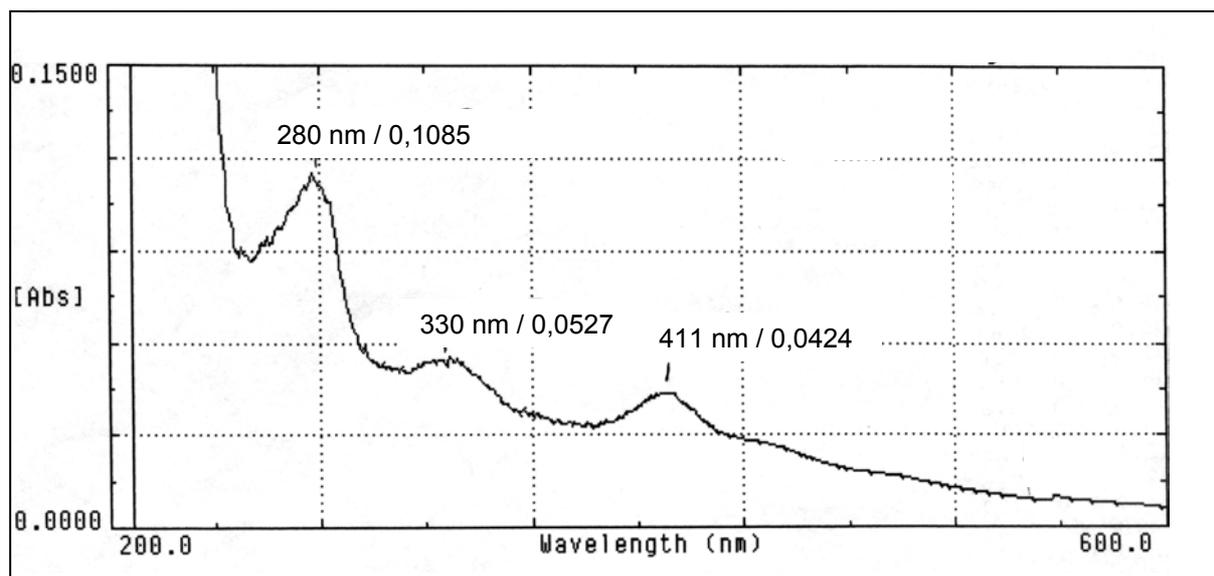


Abbildung 25. Scan einer Probe der PfGAK über 200 bis 600 nm Wellenlänge. Angegeben ist zu jedem Peak die Wellenlänge des Maximums und dessen ΔA .

Photometrische Spektren der PfGAK ergaben neben dem Proteinpeak bei 280 nm zwei weitere bei 330 nm und 410 nm (Abb. 25). Die Peaks bei ca. 320 nm und 410 nm sind typisch für Hämproteine, wobei zweiwertiges Eisen die Absorption bei ca. 330 nm, und Häm die als Soret-Bande bezeichnete Absorption bei 410 nm bedingt. Für die PfAK zeigte sich lediglich der Proteinpeak bei 280 nm.

3.1.7 Kristallisation der PfGAK

In den Kristallansätzen aufgereinigter PfGAK mit einer Konzentration von 8 mg/ml zeigten sich im Ansatz mit dem Crystal Screen 1 (Hampton Research) Puffer Nr. 45 (siehe Material, Puffer) kleine, rundliche Kristalle (Abb. 26). Puffer Nr. 45 enthält Zinkacetat, Natriumcacodylat und Polyethylenglykol. Interessant ist der offenbar günstige Einfluß von Zinkionen, weshalb die Kristallisation in Zukunft mit anderen zweiwertigen Metallionen und vor allem Eisen versucht werden soll. Der Test auf Salzkristalle ergab, dass es sich eindeutig um Protein handelte. Daher können diese Kristalle nun als Ansatzpunkt für weitere Kristallisationen dienen.

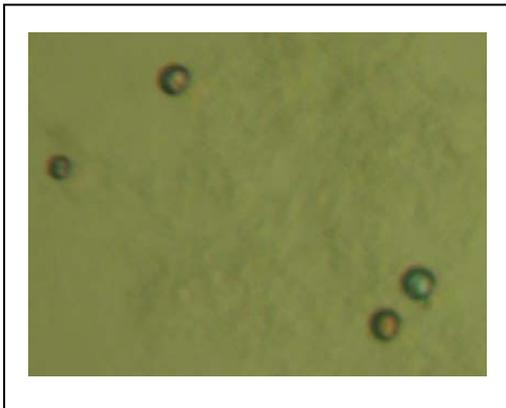


Abbildung 26. Kristalle der PfGAK unter dem Polarisationsfilter. Diese Proteinkristalle wuchsen bei pH 6.5 in einem Zinkacetat-Puffer mit 18% Polyethylenglykol 8000. Die Kristallisation des Enzyms wird weiterverfolgt.

Ergebnisse

Eigenschaften	PfAK	PfGAK
GenBank acc. no.	AY118172	AF308612
Lage im <i>P. falciparum</i> - Genom	Chromosom 10	Chromosom 4
Größe des ORF (inkl. Start-Codon)	726 bp	687 bp
Aminosäuren	242	229
Molekulargewicht*	27.6 kDa	26.7 kDa
Isoelektrischer Punkt*	9,17	10.10
ϵ_{280}^*	10.72 mM ⁻¹ cm ⁻¹	10.24 mM ⁻¹ cm ⁻¹
pH-Optimum	5.5	6.0
V _{max}	75 U/mg	100 U/mg
K _M für AMP ¹	175 µM	210 µM
K _M für ATP ¹	130 µM	nicht meßbar
K _M für GTP	200 µM	130 µM
K _M für ADP ¹	400 µM	nicht bestimmt
Metallgehalt	---	0.3 mol Fe/mol Protein

Tabelle 20. Übersicht über die biochemischen Eigenschaften von AK und GAK aus *Plasmodium falciparum*.

* berechnet für das rekombinante Protein mit Histidinmarkierung

¹ Konzentration der weiteren Substrate siehe Text

3.2 Untersuchungen zum Redoxstoffwechsels von *Drosophila melanogaster*

Nachdem Stefan Kanzok in der Arbeitsgruppe die Thioredoxinreduktase 1 aus *Drosophila melanogaster* kloniert hatte, konnte ich zur kinetischen Charakterisierung des Trx/TrxR-Systems in *Drosophila* beitragen. Die Ergebnisse flossen in die Dissertation von Stefan Kanzok ein, weshalb sie hier nicht noch einmal dargestellt werden. Die daraus folgende Veröffentlichung findet sich im Abschnitt 10 (I). Anknüpfend an diese Arbeiten war es natürlich interessant mit Untersuchungen auf diesem spannenden Gebiet weitere Besonderheiten des Redoxmetabolismus von Insekten zu entdecken und diese dann zu charakterisieren. Die enge Zusammenarbeit mit einer auf *Drosophila*-Genetik spezialisierten Arbeitsgruppe in Göttingen ermöglichte die Nutzung von knock-outs um die Funktionen der einzelnen Bestandteile der antioxidativen Abwehr detailliert aufzuklären. Im folgenden sollen die Ergebnisse des Vergleiches zweier Spleißvarianten der DmTrxR-1 und der Untersuchungen zu einem neu identifizierten Gen, dessen Protein zu den Carbonylreduktasen gehört, und dessen Fehlen das Absterben von Nervenzellen bedingt, dargestellt werden.

3.2.1 Datenbankanalysen

3.2.1.1 Datenbankanalysen zur Carbonylreduktase Sniffer

Der identifizierte offene Leserahmen einer putativen Carbonylreduktase hatte eine Länge von 741 bp, bzw. 247 Aminosäuren und ließ sich in Datenbankvergleichen im Internet (Blast, (Altschul *et al.* 1990)) eindeutig den Enzymen der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen ("*Short Chain Dehydrogenases/Reductases*" = SDR) zuordnen, bei denen die Struktur stark konserviert ist, nicht jedoch die Primärsequenz. In Vergleichen mit zu den SDRs gehörenden Carbonylreduktasen verschiedener Spezies lagen die Identitäten daher bei 20-30%, bei 22% mit humaner CR-01 und 20% mit humaner CR-03 (Tab. 22). Die besten Werte erhält man mit Proteinen, deren Zuordnung zu den SDRs bisher nur vorhergesagt wurde und für die keinerlei biochemische Daten vorliegen. Biochemisch charakterisiert sind FixR aus *Bradyrhizobium japonicum* und CsgA aus *Myxococcus xanthus*, mit 22%, bzw. 31% Übereinstimmungen. Sniffer enthält alle für Carbonylreduktasen essentiellen Sequenzmotive. Dazu gehören die NADPH-Bindungsstelle, die katalytische Triade, die "active site" und das typische Konsensusmotiv "NNAGI" (Tab. 21). Zur Unterscheidung zwischen NADH und NADPH an der Dinukleotid-Bindungsstelle gehört zudem noch das konservierte Arginin 36. Die active site des Enzyms ist denen der humanen CR3 und der Schweine CR nahezu identisch.

Ergebnisse

Motiv	Aminosäuren
NAD(P)H-Bindung [Gx(NR)GxG]	Gly7 (N9,R10) bis Gly13
Catalytische Triade [Ser-Tyr-Lys]	Ser153, Tyr169, Lys173
Motiv NNAGI [PGWVxTDMxG]	Asn88 bis Ile92 Pro199 bis Gly208

Tabelle 21. Konservierte Motive der Carbonylreduktase Sniffer aus *D. melanogaster*. Die hier verwendete Nummerierung der Aminosäuren entspricht der Nummerierung in Sniffer.

Identität	Sniffer	CsgA	FixR	3βHSD	pigtCR	hCR-1	hCR-3
Sniffer	100%						
CsgA	31%	100%					
FixR	22%	22%	100%				
3βHSD	13%	14%	24%	100%			
pigtCR	12%	21%	14%	11%	100%		
hCR-1	19%	21%	12%	16%	84%	100%	
hCR-3	21%	13%	14%	13%	70%	71%	100%

Tabelle 22. Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Kurzketten-Dehydrogenasen (SDR).

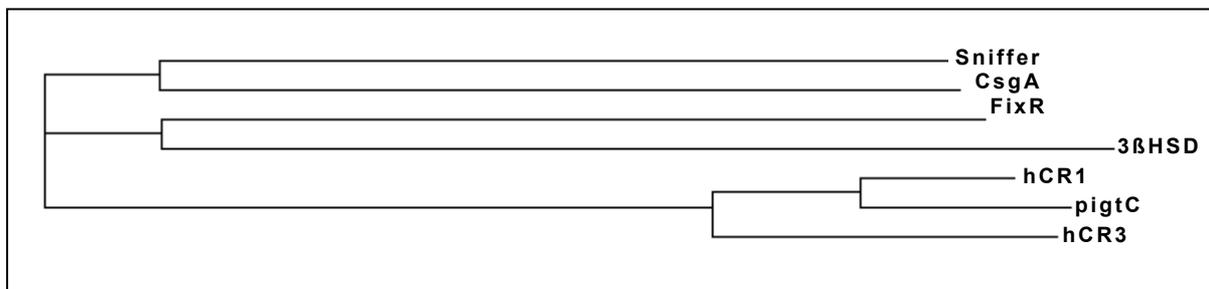


Abbildung 27. Phylogramm der Kurzketten-Dehydrogenasen aus obiger Tabelle.

3.2.1.2 Datenbankanalysen zur Spleißvariante der TrxR

Die Spleißvariante der TrxR unterscheidet sich von der bereits bekannten DmTrxR1 durch das erste Exon, welches um 105 Aminosäuren länger ist. Die letzten 5 Aminosäuren der Spleißvariante sind mit der bekannten DmTrxR-1 identisch. Analyse des Exon 1 der Spleißvariante mit dem Programm TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/targetP/) ergibt eine große Wahrscheinlichkeit für eine N-terminale Signalsequenz, mit Abspaltung nach 105 Aminosäuren und eine folgende mitochondriale Lokalisation des Proteins. Ein Vergleich dieser Sequenz (BLAST) mit bekannten Proteinen ergibt - abgesehen von kleinen Fragmenten unbekannter Proteine - nur die *Drosophila*-Sequenz. Aufgrund dieser Daten und histologischer Untersuchungen der Arbeitsgruppe Jäckle in Göttingen wurde die bereits bekannte TrxR als DmTrxR^{cyto} und ihre Spleißvariante als DmTrxR^{mito} bezeichnet.

TrxR ^{cyto}	-----	
TrxR ^{mito}	MNLCNSRFSVTFVVRQCSTILTSPSAGIIQNRGSLTTKVPHWISSSLSCAHHFTFQRTMNL	60
TrxR ^{cyto}	-----	
TrxR ^{mito}	GQRGSRDSTGATGGNAPAGSGAGAPPPFQHPHCDRAAMYAQPVRK	110
		MSTKG 5
		MSTKG 110

Abbildung 29. Alignment des Exon 1 der DmTrxR^{cyto} und der DmTrxR^{mito}. Übereinstimmende Aminosäuren sind fett dargestellt.

3.2.2 Organisation der Gene der TrxR und Sniffer

Sowohl die TrxR mit ihrer Spleißvariante als auch Sniffer besitzen ein erstes Exon, welches im Verhältnis zum Gesamtgen recht kurz ist. Die beiden Enzymvarianten der TrxR entstehen durch differentielles Spleißen des *dmtrxr-1*-Transkripts. DmTrxR1^{cyto} wird demnach von den Exons 1 und 3-5 kodiert, während die Exons 2-5 für die mitochondriale Variante DmTrxR1^{mito} mit N-terminaler Signalsequenz kodieren. Innerhalb des ersten Introns der TrxR zwischen den Exons der Spleißvarianten liegt das erste Exon des Sniffer, dessen Gen auf dem Gegenstrang liegt und der dementsprechend in entgegengesetzter Richtung der DmTrxR abgelesen wird.

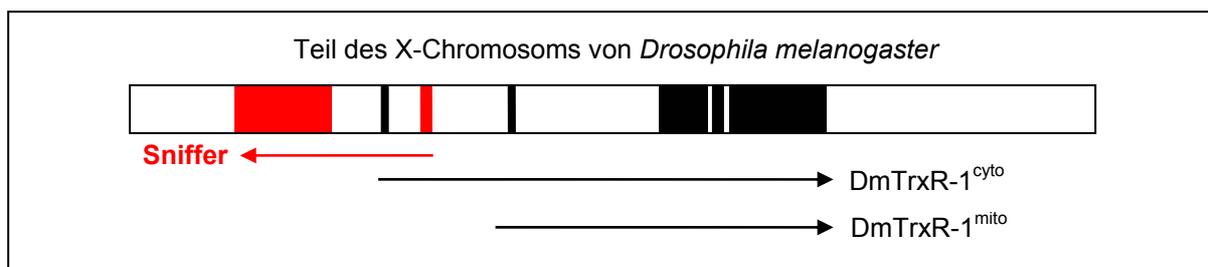


Abbildung 30. Der genomische Aufbau der DmTrxR-1 und des Sniffer. Die beiden Exons des Sniffer sind als rote Boxen, die Exons der DmTrxR-1 als schwarze Boxen dargestellt. Die Ableserichtung der Gene und ihrer Varianten ergibt sich aus der jeweiligen Pfeilrichtung.

3.2.3 Klonierung und heterologe Expression

3.2.3.1 Klonierung und heterologe Expression der Carbonylreduktase

Das Gen der Carbonylreduktase war inklusive des Stop-Codons von unserem Kooperationspartner José Botella-Munoz (Arbeitsgruppe Professor Jäckle, Universität Göttingen) in PQE60 kloniert und in *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert worden. Für die Überexpression reinigte ich diesen Vektor auf und transformierte ihn in *E. coli* M15-Zellen. Pro Liter Überexpressionskultur konnten 40 mg Sniffer-Protein aufgereinigt werden (Abb. 31).

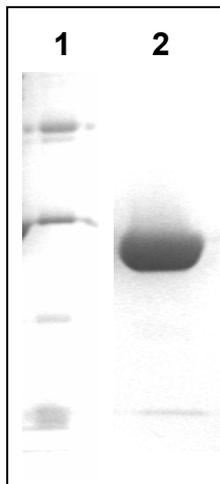


Abbildung 31. SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) der rekombinanten Carbonylreduktase Sniffer.

Spur 1: Molekulargewichtsstandard

Spur 2: rekombinantes Sniffer-Protein, die Bande läuft knapp unterhalb der 30 kDa-Bande des Standards

3.2.3.2 Klonierung und heterologe Expression der Spleißvariante der DmTrxR-1

Das Gen der Spleißvariante der DmTrxR war von Fanis Missirlis in der Arbeitsgruppe von Professor Jäckle (Universität Göttingen) in pRSETA kloniert und in *E. coli* BL21-Zellen transformiert worden. Die Überexpression ergab ein Protein von 69 kDa und damit den erwarteten Größenunterschied zur DmTrxR-1 mit 53 kDa. Die native Aufreinigung über eine NiNTA-Säule ergab entweder eine 69 kDa Bande, oder eine Bande ungefähr entsprechend der Größe der DmTrxR-1, weshalb analog der DmTrxR eine 2'5'-ADP-Sepharose unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff vorgeschaltet wurde. Diese doppelte Reinigung ergab eine saubere Bande von 69 kDa im SDS-Gel.

3.2.4 Enzymkinetische Charakterisierung der Carbonylreduktase Sniffer

3.2.4.1 *In vitro* Funktionstests

Da die Funktion des Enzyms unbekannt war, wurden verschiedene Tests durchgeführt. Als erstes wurde die Aktivität im Insulinassay getestet, welcher allgemeine Redoxaktivität anzeigt. Sniffer reduziert Insulin dosisabhängig (Abb. 32). Schon 5 μ M Sniffer reduziert Insulin deutlich stärker als die Kontrolle von 1 mM DTT.

In einem zweiten Insulinassay zeigte sich, daß der Unterschied zwischen 5 μM und 10 μM Sniffer deutlich geringer ist, als die Aktivitätszunahme bei Erhöhung der Sniffer-Konzentration von 10 μM auf 20 μM . Nach einer halben Stunde hat 5 μM Sniffer nahezu den Wert der gleichen Menge DmTrx1 erreicht.

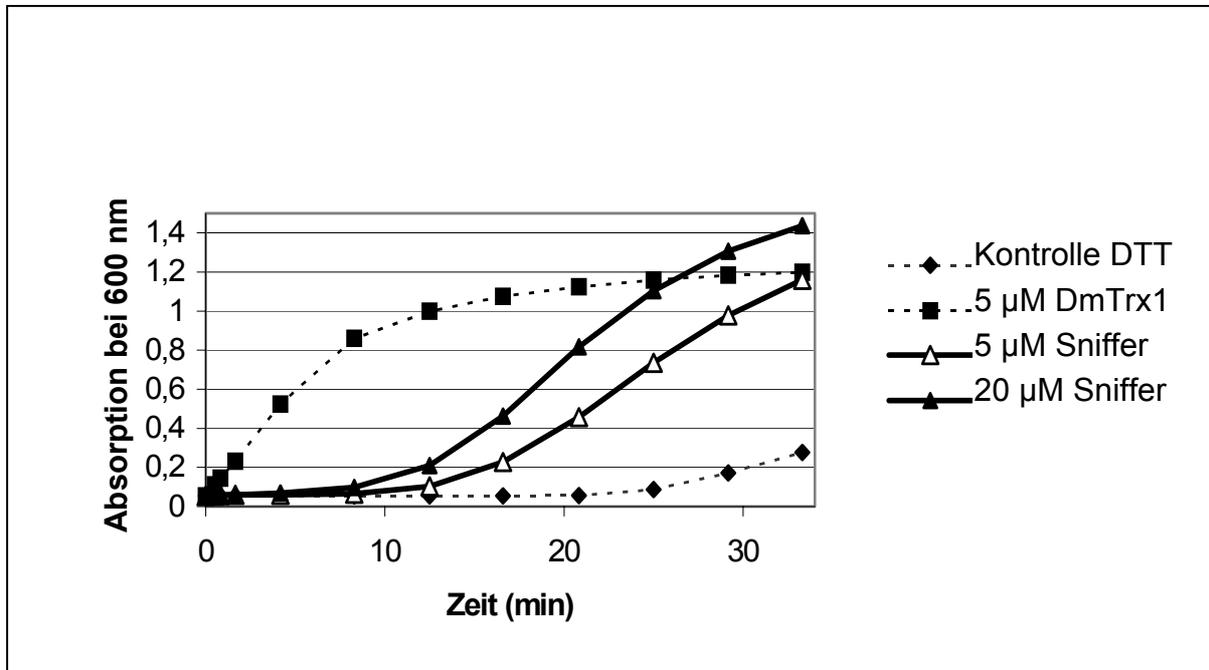


Abbildung 32. Insulinassay der Carbonylreduktase Sniffer. Eingesetzt wurden 5 μM und 20 μM frisches Sniffer-Protein, sowie 5 μM DmTrx1 als Positivkontrolle und DTT als Negativkontrolle. Gemessen wurde die Absorptionszunahme bei 600 nm über die Zeit. Sniffer zeigt konzentrationsabhängig eine deutliche Reduktion der Disulfidbrücken des Insulin.

Sniffer zeigte keine Aktivität im Acyl-CoA-Dehydrogenase-Assay (Masterson *et al.* 2000) mit Acyl-CoA und Butyryl-CoA (40 μM) als Substrat und (gemessen bei 308 nm, pH 7.2 und 25°C in Anwesenheit von 450 μM Zyankali, 200 μM N-Ethylmaleimid, 33 μM 2,6 Dichloroindophenol und 33 mM Phenazin-Methosulfat). Zudem reduziert Sniffer D-Glukose (1 mM) in Anwesenheit von 100 mM NADPH nicht. Im Thioredoxinreduktase-Assay erhöhte Sniffer die Aktivität der DmTrxR-1 leicht. Die gleiche Menge an BSA hatte keinen signifikanten Einfluss. Diese Fragestellung eines Einflusses von Sniffer auf die DmTrxR wird weiterverfolgt. Starke Aktivität war in einem Assay mit verschiedenen für Carbonylreduktasen beschriebenen Substraten in Anwesenheit von NADPH meßbar (s.u.).

3.2.4.2 Carbonylreduktase-Aktivität des Sniffer

Das pH-Profil im Natriumphosphatpuffer zwischen pH 6.0 und pH 8.0 mit 300 μM Nitrobenzaldehyd als Substrat zeigt einen Verlauf mit zwei Maxima bei 6.2 und 7.0. Die Kurve besitzt einen Sattel am zweiten Maximum um pH 7.4 und fällt danach ab. Zum besseren Vergleich mit publizierten Werten und, um im physiologischen pH-

Bereich zu messen, wurde pH 7.4 für den Puffer gewählt. Dieser konnte dann ebenfalls für die Messungen an Fliegen (s.u.) verwendet werden.

Günstig für die Messungen der K_M -Werte war der konstante Absorptionsabfall über mehrere Minuten und die Existenz einer Inhibition bei sehr hohen Substratkonzentrationen wies auf eine Michaelis-Menten-Kinetik hin, was die Berechnung der K_M und V_{max} -Werte nach Lineweaver-Burk ermöglichte. Der so bestimmte K_M für NADPH lag in Anwesenheit von 1 mM Pyridincarboxyaldehyd bei 8 μM . Die höchste Aktivität von 23 Units pro mg Sniffer-Protein bezogen auf V_{max} war mit Phenanthrenquinon zu verzeichnen. Phenanthrenquinon hat mit einem K_M von 1 μM auch die höchste Affinität zum Enzym und der Wert für k_{cat} über K_M liegt der Diffusion am nächsten. Nitrobenzaldehyd und Pyridincarboxyaldehyd besitzen K_M -Werte von 200 und 350 μM respektive, sowie ähnliche Werte für V_{max} , k_{cat} , und k_{cat}/K_M . Methylglyoxal besitzt an Sniffer mit 3,5 mM zwar einen sehr hohen K_M , doch die spezifische Aktivität und k_{cat} liegen noch etwas über den Werten der Aldehyde. Die spezifische Aktivität von Sniffer mit Benzoylpyridin ist mit 0,78 Units pro mg sehr gering und das Substrat hat zudem mit 550 μM einen recht hohen K_M .

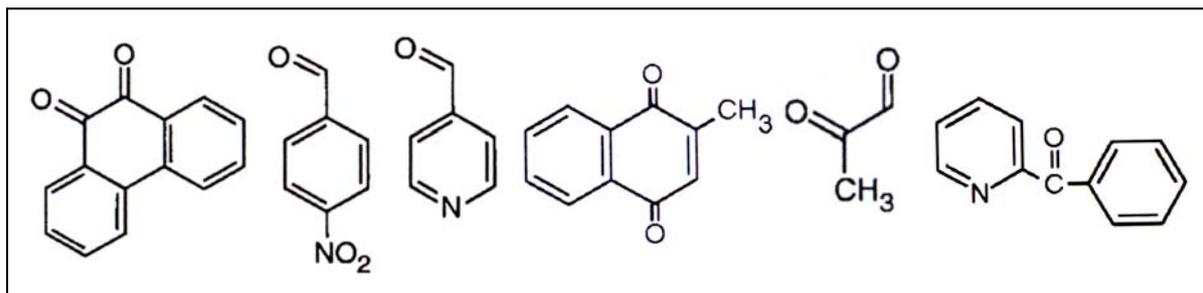


Abbildung 33. Substrate der Carbonylreduktase Sniffer. Phenanthrenquinon, Nitrobenzaldehyd, Pyridincarboxyaldehyd, Menadion, Methylglyoxal, Benzoylpyridin (von links).

Substrat	K_M [μM]	V_{max} [U/mg]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]
Phenanthren-9,10-quinon	1	23	640	11×10^6
p-Nitrobenzaldehyd	200	8,2	230	1.9×10^4
Pyridin-4-carboxyaldehyd	350	8,5	240	1.1×10^4
Menadion	250	4,7	130	8.7×10^3
Methylglyoxal	3500	9,8	270	1.3×10^3
Benzoylpyridin	550	0,78	22	6.7×10^2

Tabelle 23. Substratspezifität des rekombinanten Sniffer. Carbonylreduktase-Aktivität wurde photometrisch in 100 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7.4 in Gegenwart von 100 μM NADPH bei 25°C bestimmt. Gemessen wurde der NADPH-Verbrauch ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit verschiedenen Konzentrationen des zweiten Substrates. Die angegebenen K_M -Werte sind Mittelwerte von mindestens 3 verschiedenen Messungen mit weniger als 10% Differenz.

3.2.4.3 Hemmung der Carbonylreduktase Sniffer

Zur weiteren Charakterisierung des Proteins als Carbonylreduktase wurden verschiedene bekannte Inhibitoren getestet und deren IC_{50} -Werte an Sniffer bestimmt (Tab. 24). Quercetin und Rutin sind Flavonoide (Abb. 34).

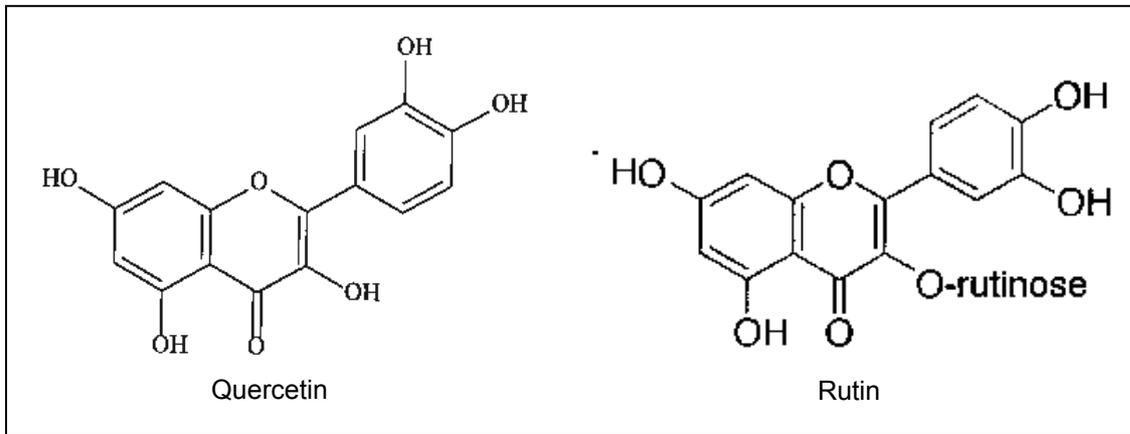


Abbildung 34. Chemische Strukturformeln der Inhibitoren Quercetin und Rutin

Rutin, welches aus Quercetin und dem Disaccharid Rubinose besteht und Quercetin selbst hemmt Sniffer am besten mit einem IC_{50} von 2 μM , bzw. 9,5 μM . Die Messungen erfolgten in Anwesenheit von 100 μM NADPH und 1 μM Phenanthrenquinon. Hydroxymercuribenzoat zeigte mit 11,5 μM ebenfalls einen deutlichen Hemmeffekt, während Pyrazol mit einem IC_{50} von fast 200 mM kaum mehr als Hemmstoff bezeichnet werden kann. Hydroxymercuribenzoat zeigte bereits nach 1 min Inkubationszeit die maximale Hemmung, eine weitere Zeitabhängigkeit war nicht gegeben.

Inhibitor	IC_{50}
Rutin*	2 μM
Quercetin [#]	9,5 μM
Hydroxymercuribenzoat [#]	11,5 μM
Pyrazol	185 mM

Tabelle 24. IC_{50} -Werte verschiedener Inhibitoren an Sniffer. Die Substanzen waren in Puffer, DMSO (*) oder 50%igem Methanol ([#]) gelöst. Gemessen wurde in Anwesenheit von 100 μM NADPH und 1 μM Phenanthrenquinon.

3.2.4.4 Aktivitätsmessung in homogenisierten Fliegen

Nachdem für Sniffer eine Carbonylreduktase-Aktivität *in vitro* nachgewiesen worden war, sollten nun zur weiteren Abklärung der Funktion *in vivo* Fliegen, in denen das Gen für Sniffer gentechnisch ausgeschaltet worden war (*knock-outs*) biochemisch charakterisiert werden. Hierzu wurde die Carbonylreduktaseaktivität der Mutanten mit der Aktivität in normalen Fliegen (Wildtyp) verglichen. Da eine Lokalisation des

Sniffer vornehmlich im Gehirn durch Untersuchungen in Regensburg feststand, wurde nur in Fliegenköpfen gemessen. Proteinextrakte der Fliegenköpfe wurden im bereits beschriebenen Assay mit zwei verschiedenen Substraten gemessen. Es zeigte sich, daß die Aktivität mit beiden Substraten in der Mutante halbiert ist. Zudem liegt die Aktivität mit Nitrobenzaldehyd bei knapp unter der Hälfte der Aktivität mit Phenanthrenquinon. Mißt man gereinigten sniffer, so beträgt der V_{\max} -Wert mit Nitrobenzaldehyd bei 36% des Wertes mit Phenanthrenquinon.

Aktivität (mU/mg)	Phenanthrenquinon	Nitrobenzaldehyd
Wildtyp	121,3 ± 13,6	58,4 ± 1,3
sniffer	61,8 ± 7,0	30,5 ± 1

Tabelle 25. Reduktion der Carbonylreduktase-Aktivität in Fliegen mit der Mutation *sniffer*. Eingesetzt wurden als Substrate 0,4 mM p-Nitrobenzaldehyd, bzw. 0,04 mM Phenanthren-9,10-quinon.

3.2.5 Enzymkinetische Charakterisierung der DmTrxR^{mito} im Vergleich mit der bereits beschriebenen DmTrxR^{cyto} aus *Drosophila melanogaster*

Schon direkt nach der Aufreinigung über die Ni-NTA-Säule zeigte sich der erste Unterschied zwischen den beiden Spleißvarianten. Während die cytosolische DmTrxR1 ein oxidiertes Spektrum zeigt, liegt die DmTrxR1^{mito} offensichtlich im reduzierten Zustand vor. Das pH-Profil beider Enzyme im TrxR-Assaypuffer ist identisch mit einem Optimum bei pH 7.1. Die Untersuchung der Thioredoxinreduktase-Aktivität ergab, daß beide Enzyme NADPH-abhängig sind und sowohl die Thioredoxine 1 und 2 aus *Drosophila*, als auch das künstliche Substrat DTNB reduzieren können. Die K_M -Werte für alle getesteten Substrate an beiden Varianten zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Enzym	K_M für NADPH	K_M für DmTrx-1	K_M für DmTrx-2	K_M für DTNB
DmTrxR ^{mito}	1 μ M	14 μ M*	11 μ M	315 μ M
DmTrxR ^{cyto}	1 μ M	15 μ M	10 μ M	310 μ M

Tabelle 26. Vergleich der Michaelis-Menten-Konstanten der cytosolischen DmTrxR und ihrer mitochondrialen Spleißvariante. Alle Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

* einzelne Messungen variierten um Faktor 2

3.2.6 Kristallisation des Sniffer und erste Strukturdaten

Die Kristallisation von Sniffer erfolgte im Kühlraum, da das Protein fortwährend bei Temperaturen um 4°C gehalten werden mußte. Von den 98 Puffern des Crystal Screens I und II wuchsen Proteinkristalle innerhalb von Stunden in #22, einem Tris-HCl-Puffer mit pH 8.5, der 200 mM Natriumacetat und 30% (w/v) PEG 4000 enthält

(Abb. 35b). Trotz des schnellen Wachstums war die Qualität der Kristalle sehr gut. Die Kristallform wird im Englischen als "rod" bezeichnet und besteht aus lauter Röhren quadratischen Querschnitts, die aus einem Ursprungspunkt wachsen (Abb. 35a). Weitere Kristallformen traten auch unter anderen Bedingungen nicht auf, es wuchsen jedoch Kristalle gleicher Form in geringerer Größe und Qualität auch in weiteren Tropfen. Das Protein hat demnach eine ungewöhnlich große Affinität in genau dieser Form zu kristallisieren. Im Laufe der Zeit verdickten sich die Wände der Röhren. Zur Auflösung der Struktur entstand eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Klebe, Universität Marburg und hier vor allem mit Tanja Sgraja und Dr. Milton Stubbs. Die Kristalle wurden von Dr. Stubbs und Tanja Sgraja am Synchrotron vermessen und eine Struktur in Anlehnung an die porcine Carbonylreduktase mit einer Auflösung von 1,7 Angström erstellt (Abb. 36). Die Ähnlichkeit zum Enzym des Schweines zeigt sich vor allem an der Dinukleotidbindungsstelle und in der als Substratbindungsbereich beschriebenen Schleife ("Loop"), welche sowohl in Sniffer, als auch in der ptCR deutlich kürzer ausfällt, als bei anderen SDR-Enzymen. Ebenfalls ungewöhnlich ist die klar definierte Struktur dieser Schleife auch ohne Substrat- oder Cofaktor-Bindung. Obgleich die Ergebnisse der Gelfiltration und die Analogie zu anderen bekannten Carbonylreduktasen auf ein Vorliegen als Dimer hindeuteten, bestand die asymmetrische Einheit nur aus einem Monomer. Daher wurde das Dimer nachträglich rechnerisch generiert.

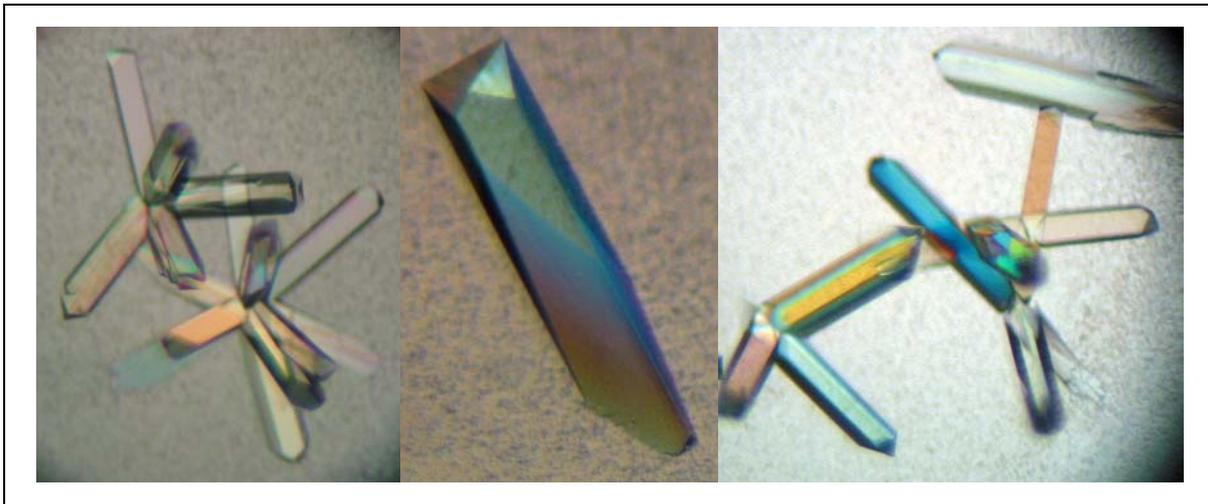


Abbildung 35. Photos der Kristalle der Carbonylreduktase Sniffer aus *Drosophila melanogaster*. Kristallisiert wurde das rekombinante in *E. coli* produzierte Protein nach dem *hanging-drop*-Verfahren in Tris-HCl-Puffer, pH 8.5 mit 200 mM Natriumacetat und 30% (w/v) PEG 4000. Zu sehen sind die sogenannten "rods", ein einzelner Balken und ein Blick in einen Tropfen mit mehreren Balken in verschiedenen Ebenen (von links). Auf den Photos sieht man die Kristalle durch einen Polarisationsfilter.

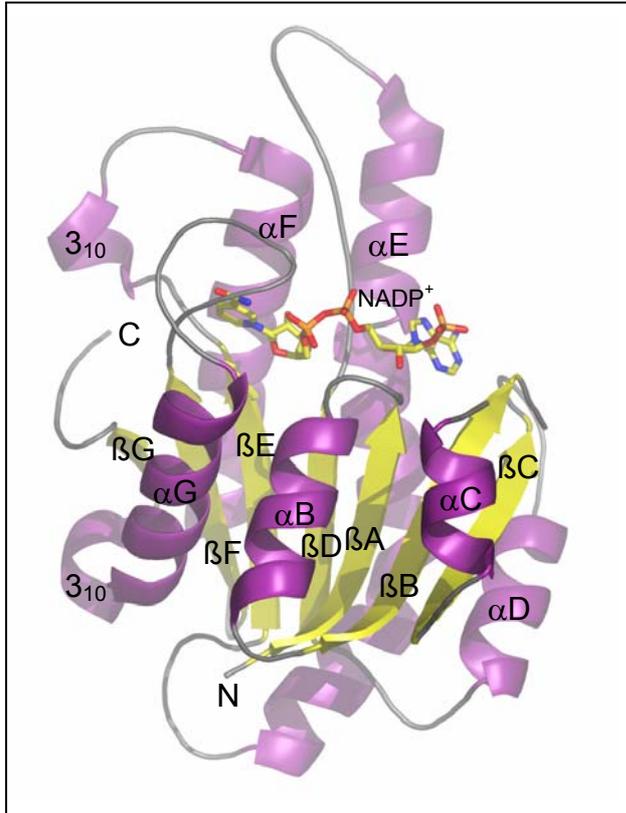


Abbildung 36. Schematische Darstellung einer Untereinheit der als Dimer vorliegenden Carbonylreduktase Sniffer aus *Drosophila melanogaster*. Die sekundären Strukturelemente sind bezeichnet, ebenso das Amino- (N) und Carboxy-Ende (C) des Polypeptids. Helices sind lila, β -Faltblätter gelb gefärbt. Das NADP⁺-Molekül ist am aminoterminalen Ende des β -Faltblattes zu finden. Die Zuordnung der sekundären Strukturelemente erfolgte mit dem Programm PROMOTIF (Hutchinson und Thornton 1996).

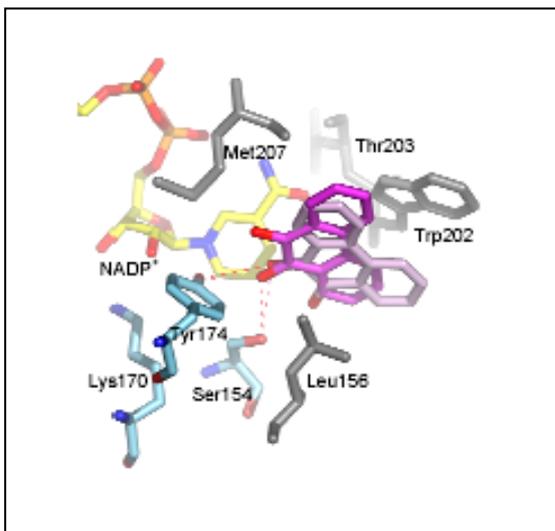


Abbildung 37. Modellierung der Anlagerung des besten Substrates Phenanthrenquinon in die *active site* des Sniffer mit dem Programm Autodock (Morris et al. 1998). Dargestellt ist die energetisch günstigste Position des Substrates (violett) zwischen der Nikotinamid-Gruppe des Cofaktors (gelb) und den Aminosäuren der katalytischen Triade (cyanblau) gelagert. Die zweitbeste Position des Phenanthrenquinons ist in hellerem Violett gezeigt. Die Carbonylgruppe des Substrates formt jeweils eine Wasserstoffbrücke mit den Seitenketten des Tyr174 und Ser154.

4 Diskussion

4.1 Zu den Adenylatkinasen in *Plasmodium falciparum*

Adenylatkinasen gehören zu den am besten beschriebenen und bearbeiteten Enzymen. Sequenz, Struktur und Reaktion sind bereits seit langem detailliert bekannt. Dennoch wird über die Funktion der AKs immer wieder neu und kontrovers diskutiert, ihre wichtigste Aufgabe im Erhalt des Energiegleichgewichts, der Energieverteilung, oder der Erleichterung des Energietransportes aus den Mitochondrien gesehen. Somit bleibt der entscheidende Punkt, das Verständnis der Zusammenhänge, auch heute noch offen und damit spannend. Ganz besonders gilt dies im Zusammenhang mit Parasiten der *Apicomplexa*, zu deren Energiemetabolismus es viele Hypothesen, doch wenig genauere Kenntnisse gibt.

4.1.1 PfAK

Genauere Datenbankanalysen lassen vermuten, daß die PfAK durch alternatives Spleißen entsteht und das mature Protein dementsprechend zumindest in Cytosol und Mitochondrien, vermutlich auch im Apicoplasten vorliegt. Eine mögliche Signalsequenz für eine Lokalisation im Apicoplasten ist anhand der Größe des PCR-Produktes mit dem entsprechenden Primer auf cDNA als wahrscheinlich anzunehmen. Das Gen dieser Sequenz besteht aus drei Exons von 15 (MIKFC-YFFR), 28 (LNELK-PGSGK) und 201 Aminosäuren, wobei das letzte Exon in allen Spleißvarianten gleich bleibt. Das zweite Exon wird für die Apicoplastenvariante um 12 Aminosäuren verkürzt.

Studien auf RNA-Ebene haben gezeigt, daß die PfAK zu den am intensivsten exprimierten Genen in nahezu allen Blutstadien gehört (Bozdech *et al.* 2003; Le Roch *et al.* 2003). Ein zweiter Anstieg im Merozoitenstadium könnte auf den besonderen Energiebedarf im Zusammenhang mit Invasionsprozessen deuten (s.u.). Nach den ersten im Internet verfügbaren Daten von Massenspektrometrie-Analysen ist das Protein dementsprechend in Gametozyten, Merozoiten und Trophozoiten nachgewiesen worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenfalls einen klaren Nachweis des Proteins in Blutstadien mittels Western-Blot, sowie eine Anfärbung in infizierten Erythrozyten mittels Immunfluoreszenz. Vergleicht man das RNA-Expressionsprofil der PfAK mit den bislang bekannten Profilen aller anderen Proteine aus *Plasmodium*, so zeigt sich größte Übereinstimmung mit der Expression eines Oberflächenantigens aus Merozoiten (QF122, AE014830, Korrelation 0,95), einer vermuteten Leucin-Aminopeptidase (Leu-Peptidase, Accession PF14_0439,

Korrelation 0,941), der regulatorischen Untereinheit einer vermuteten Casein-Kinase 2 (CaseinKII, Accession PF13_0232, Korrelation 0,939), der Adeninnukleotid-Translocase (ADP/ATP transporter, Accession PF10_0366, Korrelation 0,933) und dem vermuteten Elongationsfaktor EF-1 (put. EF-1, Accession PFC0870w, Korrelation 0,929). Die Ähnlichkeit mit dem Expressionsprofil des Oberflächenantigens aus Merozoiten ergibt sich aus der starken Expression der PfAK auch in diesem Stadium, was auf erhöhten Energiebedarf, bzw. bessere Energieausnutzung während der kurzen exoerythrozytären Phase hindeutet. Die permanente und starke Expression erklärt die große Übereinstimmung mit dem Expressionsverlauf des Elongationsfaktor EF-1, dessen Wichtigkeit in dem sich sehr schnell vermehrenden Parasiten auch aus der Perzentile ersichtlich ist. Mit Ausnahme der etwas geringeren Werte in den mittleren bis späten Schizonten trifft dies auch für die PfAK zu. Besonders interessant ist das Clustern des ADP-ATP-Transporters in diese Gruppe. Dieses ist ein weiteres Gen, welches in Phasen hohen Energieumsatzes (Hilgarth *et al.* 1991) benötigt wird. Massenspektrometrisch konnte es in Invasionsstadien (Merozoiten und Sporozoiten) sowie Gametozyten nachgewiesen werden und damit in all den Stadien, in welchen man aktive Mitochondrien vermutet. Obgleich dieser Transporter in bezug auf die Aminosäuresequenz den in der inneren mitochondrialen Membran lokalisierten Transportern am ähnlichsten ist, besitzt zumindest die in Datenbanken abgelegte Sequenz kein N-terminales mitochondriales Signalpeptid (Bender 2002).

Die Berechnung kinetischer Konstanten nach Michaelis Menden ist bei AK-Enzymen zwar üblich, jedoch aufgrund der durch Produktaktivierung nichtlinearen Assays weniger verlässlich als bei anderen Enzymen. Für K_M -Werte lassen sich Durchschnittswerte zum immer gleichen Zeitpunkt innerhalb der Assays verwenden, was gute und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Schwieriger ist die Ermittlung von spezifischer Aktivität, bzw. V_{max} . Hier könnte der Unterschied zu publizierten Werten darin liegen, daß es möglich ist, deutlich höhere Aktivitäten durch Verwendung des höchsten delta A innerhalb eines über 15 min laufenden Assays zu erreichen. Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen dennoch mit den bereits publizierten Werten, so fällt auf, dass die spezifische Aktivität zwar deutlich geringer ist, als bei den AKs aus Säugetieren (Luz *et al.* 1990), *E. coli* (Tomasselli und Schulz 1987) und *Chlamydia pneumoniae* (Miura *et al.* 2001), aber noch stärker ist der Unterschied zur AK aus *Leishmania donovani* (Villa *et al.* 2003). Die spezifische Aktivität des Enzyms dieses relativ nahen Verwandten der Plasmodien beträgt nur 0,18 U/mg im Vergleich zu 75 U/mg, bzw. 100 U/mg für PfAK und PfGAK, respektive. Betrachtet man die K_M -Werte der verschiedenen Spezies, so zeigen sich

auch im Verhältnis der beiden Werte untereinander massive Differenzen. Hinzu kommen starke Abweichungen zwischen verschiedenen Studien zum gleichen Enzym. Interessant ist die höhere Affinität der Plasmodienenzyme zu ATP/GTP im Vergleich mit dem Enzym der Erythrozyten, der humanen AK1. Im gesamten Wirt-Parasit-System wird der Parasit demnach besser versorgt, als die umgebende Wirtszelle. Auch Leishmanien besitzen mit 104 μM einen deutlich niedrigeren K_M für ATP (Villa *et al.* 2003) als das Humanenzym (Luz *et al.* 1990). Gleiches gilt für die K_M -Werte für AMP, wenn man die Werte um pH 7.4 vergleicht. Plasmodien und Leishmanien haben mit 50, bzw. 75 μM eine 2,4- bis 3,6-fach höhere Affinität zu AMP als die humane AK1. Der K_M für ATP an der PfAK entspricht dem Wert, der an aus Plasmodien aufgereinigtem Enzym bestimmt wurde (Becker, K., persönliche Mitteilung) . Der mit 320 μM höhere K_M für AMP kann darauf hindeuten, dass die Bindungsstelle für AMP noch nicht vollständig der des murens Plasmodienenzym entspricht. Dies kann an besserer Faltung, bzw. einer Stabilisierung durch in der Aufreinigung aus *Plasmodien* oder einer Vielzahl möglicher posttranslationaler Modifikationen im nativen Protein liegen. Beide K_M -Werte liegen im mikromolaren Bereich und widerlegen damit die Thesen von Kanaani und Ginsburg (1989), die K_M -Werte im millimolaren Bereich erwarteten. Somit ist auch die These, dass der Parasit sein ATP aufgrund stark unterschiedlicher K_M -Werte über die Adenylatkinase der Wirtszelle recycelt, hinfällig. Die höchste Aktivität wiesen die Enzyme jedoch bei Substratkonzentrationen um 1 mM und damit in etwa dem Wert einer möglichen intrazellulären Konzentration von ATP auf.

Assoziation der PfAK mit HSP70

Die Ergebnisse der Gelfiltration zeigen eine klare Assoziation der in *E. coli* exprimierten PfAK mit einem ca. 70 kDa großen Protein, welches als bakterielles Hitzeschockprotein 70 identifiziert wurde. Ein Protein gleicher Größe zeigt sich auch in Arbeiten an aus Parasiten aufgereinigter AK (Becker, K., persönliche Mitteilung). Auch in Western-Blots mit polyklonalem Antikörper, welcher aufgrund der Verunreinigung auch gegen das *E. coli* HSP70 gerichtet ist, zeigt sich im Parasitenextrakt eine zusätzliche Bande in der Größe von 70 kDa. Damit ist wahrscheinlich, daß die beobachtete Assoziation auch im Parasiten selbst vorkommt. Die Bindung der AK an HSP70 erscheint für die Zelle aus verschiedenen Gründen plausibel. Erstens entsteht durch zusätzliche Proteine Faltungsstreß in der Zelle, da ungefaltete, fremde Peptide im Cytosol vorliegen. Zweitens ist anzunehmen, daß Plasmodien-HSP70 die Faltung der AK und den Transport in die Mitochondrien

erleichtert und damit auch reguliert, da die intrazelluläre Verteilung vermutlich von der Faltungsgeschwindigkeit abhängt. Drittens scheint HSP70, zusammen mit zwei weiteren Proteinen der Größen 32 und 34 kDa, an der Regulation der Polymerisierung von F-Aktinfilamenten beteiligt zu sein, was in *Plasmodium* beschrieben wurde (Tardieux *et al.* 1998). Die beiden kleineren Proteine wurden nicht identifiziert, aber in Analogie zu einem Komplex in *Dictyostelium* vermuten die Autoren, daß es sich um capping Proteine handelt. Diese behindern zusammen mit dem cytosolischen Hitzeschockprotein HSC70 die Polymerisierung von F-Aktinfilamenten, eine Funktion, die auch beim Komplex aus *Plasmodium* nachgewiesen werden konnte (Tardieux *et al.* 1998).

4.1.2 PfGAK

Das Gen der PfGAK besteht aus zwei Exons, wovon das erste 10 Aminosäuren eines möglichen Signalpeptids beinhaltet. Das zweite Exon besteht aus dem restlichen Teil des vorhergesagten Signalpeptids von insgesamt 39 Aminosäuren, sowie der Adenylatkinase, wie sie in der vorliegenden Arbeit kloniert und charakterisiert wurde. Eine Analyse des Signalpeptids mit unterschiedlichen Vorhersageprogrammen (SignalP, TargetP, PlasmoAP) ergab einen Transport über den Sekretionsweg (TargetP), und damit ein Import in die Apicoplasten (PlasmoAP) als wahrscheinlichste Lokalisation. SignalP sagt einen Signalanker des Typs II von Membranproteinen vorher. Dementsprechend könnte PfGAK in der Apicoplastenmembran lokalisiert sein. Obgleich sowohl verfügbare Daten zur RNA-Expression als auch zur Massenspektroskopie die PfGAK in Trophozoiten detektieren, gelang der Nachweis des Proteins im Parasitenextrakt mittels Western-Blot in der vorliegenden Arbeit noch nicht. Eine Erklärung bietet nur die schlechte Qualität des Antikörpers. Es ist möglich, daß das Ergebnis mit dem aufgereinigten Antikörper anders ausgefallen wäre. Innerhalb dieser Arbeit konnte darauf nicht weiter eingegangen werden, teilweise auch, da die Menge des gereinigten Antikörpers für einen weiteren Western-Blot zu gering war. Diese Ansätze werden jedoch weiterverfolgt. Insgesamt deutet jedoch alles auf eine geringe Expression in nahezu allen Blutstadien hin. Der Anstieg des Profils (Le Roch *et al.* 2003) im Trophozoitenstadium läßt sich mit der maximalen Stoffwechsellleistung der Parasiten zu dieser Zeit erklären. Vergleicht man auf plasmodb (www.plasmodb.org) das Expressionsprofil der PfGAK mit sämtlichen bekannten Profilen aus *Plasmodium*, so zeigen sich in erster Linie unbekannte Proteine, welche ebenfalls unbekannt Proteinen aus Pflanzen ähnlich sind. Diese besitzen nahezu ausnahmslos N-terminale Signalpeptide, für die ein Transport über den sekretorischen Weg in den Apicoplasten vorhergesagt wird

(*PlasmoAP*). Ebenso ist die vom Expressionsprofil sehr ähnliche potentielle Pyruvatkinase (PF10_0363) vermutlich im Apicoplasten lokalisiert. Die Pflanzenproteine und die im Apicoplasten lokalisierte Pyruvatkinase lassen es möglich erscheinen, daß die PfGAK nicht in den Mitochondrien, sondern im Apicoplasten lokalisiert sein könnte, wobei immer die hohe Fehlerrate in der Abgrenzung zwischen Apicoplasten- und mitochondrialer Lokalisation beachtet werden muß. Relativ viele Proteine für die eine Apicoplastenlokalisierung vorhergesagt war, fanden sich tatsächlich in den Mitochondrien. Dem entsprechen die ersten Aufnahmen der Immunfluoreszenz, so daß man zumindest zusätzlich auch von einem Transport in die Mitochondrien ausgehen sollte. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen RNA-Expression und Auftreten des Proteins selbst könnte eine post-transkriptionale Regulation sein, wie sie für die humane AK2 gezeigt wurde (Noma *et al.* 1998).

Metallbindung der PfGAK

Die Primärsequenz der PfGAK zeigt ein typisches 4-Cys Zinkfinger-Motiv. An *E. coli* wurde gezeigt, daß allein dieses Motiv zur Metallbindung ausreicht (Perrier *et al.* 1998). Während in diesem Experiment Zink gebunden wurde, zeigten Untersuchungen der PfGAK mittels Atomabsorptionsspektroskopie einzig die Anwesenheit von Eisen. Somit rückt die GTP-abhängige AK aus *Plasmodium* in die Nähe der AK aus *P. denitrificans*, welche ebenfalls Eisen bindet (Deligiannakis *et al.* 1997). Zinkfinger-Domänen sind ein strukturelles Merkmal vieler AKs gram-positiver Bakterien, während bei gram-negativen einzig *P. denitrificans* als metallabhängig beschrieben ist. *P. denitrificans* bindet simultan sowohl Zink als auch Eisen im Verhältnis eins zu eins, wobei jedes Dimer aus einem zink- und einem eisenbindenden Monomer besteht. Somit wäre denkbar, daß die mehrfach bestimmte Stöchiometrie von 1 Molekül Eisen pro 3 Moleküle PfGAK durch Trimerisierung zustande kommt, wobei die Metalle der weiteren Untereinheiten des Trimers noch unbekannt wären. Sicher ist, daß es sich hierbei nicht um Zink, Kupfer oder Kobalt handelt, da diese Elemente mitbestimmt wurden. In der Messung begründete Unstimmigkeiten sind aufgrund der exakten Stöchiometrie in wiederholten Messungen unterschiedlicher Proteinaufreinigungen und -konzentrationen nahezu auszuschließen. Die vollkommene Abwesenheit von Zink läßt sich auch nicht auf einen Mangel im Medium zurückführen, da zumindest ein kleiner Teil der Proteine das Metall inkorporiert haben müßte. Interessant ist in diesem Zusammenhang die erfolgreiche Kristallisation der PfGAK unter sauren Bedingungen, wie sie für eine besonders hohe Aktivität günstig waren, und in

Anwesenheit von Zink. Ob andere zweiwertige Metallionen, insbesondere Eisen, einen noch stärkeren, positiven Effekt auf die Kristallisation haben, soll in weiteren Studien versucht werden. Eine abschließende Klärung der Frage, ob eine bekannte oder völlig neue Struktur vorliegt, ist erst aufgrund der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse zu erwarten. PfGAK weist die als Hinweis auf Eisenbindung beschriebenen sauren Aminosäuren innerhalb des Zinkfingers zwischen den Cysteinpaaren auf, wenngleich auch an anderer Stelle als bei *P. denitrificans* (Perrier *et al.* 1998). Vergleicht man eisenbindende mit zinkbindenden Zinkfingern, so fällt auf, daß letztere saure Reste zwischen dem zweiten Cysteinpaar aufweisen, während eisenbindende Zinkfinger dies nicht zeigen. Im Vergleich mit Rubredoxin, welches auch für die *P. denitrificans* herangezogen wurde, zeigen sich deutliche Ähnlichkeiten, wenn man die Kürze der Schleife zwischen den Cysteinen der AK von 24 statt 29 AS beim Rubredoxin bedenkt. Das Wellenlängenspektrum der PfGAK zwischen 200 und 800 nm zeigt deutliche Ähnlichkeiten zu Häm und deutet damit auf eine andere Eisenbindung als in der AK aus *P. denitrificans* hin (Deligiannakis *et al.* 1997). Weiterhin ist der Bereich des Zink-Fingers der PfGAK dem Zinkfinger des Transkriptionsfaktors IIS sehr ähnlich, welcher an Oligonukleotide bindet und seine Funktion in der Regulation der Transkription hat (Agarwal *et al.* 1991). Als einzige bisher beschriebene Zusatzfunktion einer metallbindenden AK wurde für die AK aus *P. denitrificans* die Reduktion des oxidierten Cytochrom c gezeigt (Perrier *et al.* 1998). Diese Reduktion wurde vor kurzem auch für eine selenhaltige Thioredoxin-reduktase nachgewiesen (Nalvarte *et al.* 2004).

4.1.3 Der Energiehaushalt von *Plasmodium falciparum*

Die Funktion der Adenylatkinase (PfAK) in Plasmodien läßt sich analog zu gleichen Isozymen anderer Spezies betrachten. Neben ihrer lange bekannten Rolle zur Wahrung eines Energiegleichgewichtes (energy charge concept) zeigte sich die Weitergabe von Signalen zur Regulation der Mitochondrien durch eine Kettenreaktion der AK einer einfachen Diffusion weit überlegen. In Plasmodien kommen nun aber noch neue, spezifische Rollen hinzu. Das pH-Optimum der PfAK bei 5.5 ist interessant im Zusammenhang mit der pH-regulierenden, ATP-abhängigen H⁺-Pumpe (Ginsburg 2002). Eine Aktivierung der AK bei niedrigem pH, wenn diese Pumpe besonders viel ATP zum H⁺-Export benötigt, erscheint sinnvoll.

Kanaani und Ginsburg (1989) sehen in einer AK mit millimolaren K_M-Werten den limitierenden Schritt der ATP-Versorgung des gekoppelten Parasit-Wirt-Systems. Aufgrund der vielen, essentiellen ATPasen im Apicoplasten ist davon auszugehen, daß die PfAK auch hierhin transportiert wird, worauf zudem potentielle Signal-

Transfer-Peptide hinweisen. Die Invasionsstadien des Erregers sind zu einer Motilität befähigt, die im Falle der Merozoiten essentiell für eine erfolgreiche Infektion der Wirtszelle ist. Nachgewiesen wurden Actomyosinmotoren und Dyneine (Pinder *et al.* 1998; Fowler *et al.* 2001), die ihre Energie aus ATP, Creatinphosphat oder Argininphosphat beziehen. Während im Menschen die Energiebereitstellung vor allem durch das Creatinkinase-System erfolgt, findet sich in niederen Organismen, und damit auch in Trypanosomen, das Argininkinase-System. Erste Datenbankrecherchen der vollständigen Sequenzen aus Plasmodien zeigten keine potentielle Argininkinase oder Creatinkinase, das gleiche scheint für *Leishmania donovani* und *Toxoplasma gondii* zu gelten. Beschrieben wurde die Abwesenheit von CK und ArgK für die Flagellen von *Chlamydomonas reinhardtii* (Watanabe und Flavin 1976). Damit würde die Bewegungsfähigkeit dieser Organismen vollständig von der Aktivität der Adenylatkinase abhängen. Schon vor langem konnte in Cilien gezeigt werden, daß eine AK in den Flagellen das ATP regeneriert (Hyams und Borisy 1978). In *Chlamydomonas reinhardtii* konnte dies noch durch vollständige Hemmung der Flagellenbewegung nach Zugabe der AK-Inhibitors AP₅A bestätigt werden (Noguchi *et al.* 2001).

Die Funktion der mit großer Wahrscheinlichkeit in den Mitochondrien lokalisierten PfGAK ist deutlich schwieriger zu bestimmen. Da noch immer gemutmaßt wird, wenn es um die eigentliche Rolle und Wichtigkeit der Mitochondrien in Plasmodien geht, bleibt auch eine Einordnung der GAK hoch spekulativ. Gesichert ist durch die Versuche mit GP₅A lediglich die Relevanz des Proteins für das Überleben der Parasiten. Die starke Substratspezifität für GTP deutet zudem auf eine Lokalisation in einem Kompartiment mit einer erwünscht hohen ATP-Konzentration, wie in ATP-produzierenden Mitochondrien hin. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine - neben der Glykolyse - zusätzliche Energiegewinnung in Plasmodien. Bedenkt man die unvollständige Atmungskette, so erscheint eine Cytochrom-ähnliche Zusatzfunktion der GAK möglich. Diese würde die Hämbindung des Proteins erklären, die von der Eisenbindung anderer Kinasen abweicht. Übereinstimmungen mit Zinkfingersequenzen von Transkriptionsfaktoren könnten auf eine Regulation der Transkription deuten. Auch hier würde die GAK zwei Rollen in einem System übernehmen, nämlich Regulation der Transkription (über den Zinkfinger) und Energiebereitstellung für die Translation (über GTP).

4.2 Der Redoxstoffwechsel in *Drosophila*

Betrachtet man den Redoxstoffwechsel in *Drosophila*, so fällt als erstes die Absenz der Glutathionreduktase auf, welche beispielsweise in allen Wirbeltieren parallel zur Thioredoxinreduktase die antioxidative Abwehr verstärkt. Daher erschien es besonders interessant, die erwarteten fatalen Folgen einer Verminderung der TrxR-Aktivität in der Taufliege zu überprüfen. Die Ergebnisse waren divers. Die Identifizierung von Sniffer stellt nun Untersuchungen zur Thioredoxinreduktase in Frage, in welchen mit genomischen Fragmenten gearbeitet wurde, die vermutlich auch das Gen des Sniffer beinhalten (Mockett *et al.* 1999).

4.2.1 Die TrxR Spleißvarianten

Nach dem Nachweis der alternativen Thioredoxinreduktase 1 ergibt sich für *Drosophila* ein ähnliches Bild wie für die Thioredoxinreduktasen des Menschen (Sun *et al.* 2001). Es existieren zwei verschiedene Isoenzyme, von denen im Menschen beide, in *Drosophila* zumindest die TrxR-1, Spleißvarianten für unterschiedliche Lokalisationen besitzen. Zusammen mit der Gruppe um Prof. Jäckle, Göttingen, konnten wir nachweisen, daß beide Varianten der DmTrxR-1 die gleichen kinetischen Eigenschaften besitzen und essentiell für das Überleben der Taufliegen sind. Die besondere Relevanz mitochondrialer Redoxenzyme versteht sich leicht, da in den Mitochondrien im Rahmen der Atmungskette reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Der N-Terminus der mitochondrialen Spleißvariante enthält die notwendige Signalsequenz, welche durch ihre vorhergesagte Schnittstelle zu einem Protein mit exakt der gleichen Größe wie die cytosolische Variante führt.

4.2.2 Sniffer

4.2.2.1 Die Organisation der Gene TrxR/Sniffer

Das Gen des Sniffer fiel zunächst durch seine außergewöhnliche Lokalisation auf, da sein erstes Exon innerhalb des Introns, welches die ersten Exons der cytosolischen und mitochondrialen Variante der DmTrxR-1 trennt, liegt. Über die Folgen dieser Lokalisation für die Expression der Gene läßt sich zunächst nur spekulieren. Interessant ist, daß die Exons der humanen TrxR-3 mit dem Gen für Catechol-O-Methyltransferase (COMT), welches auf dem Gegenstrang liegt, überlappend angeordnet (Sun *et al.* 2001) sind. Das erste Exon der membrangebundenen Form der COMT liegt allerdings direkt auf dem Gegenstrang des ersten Exons der Spleißvariante, deren Protein im Kern lokalisiert ist. In *Drosophila* liegt das Exon des Sniffer auf dem Gegenstrang des Introns zwischen den alternativen

Startmethioninen. Damit verläuft die Regulation in beiden Organismen vermutlich ähnlich, nicht aber identisch. Wie sich die Expressionsregulation der beiden Gene untereinander beeinflusst, ob parallel oder entgegengesetzt, bleibt eine Frage für kommende Forschung. Die Anordnung von TrxR und COMT scheint jedenfalls konserviert zu sein, denn sie wurde auch in Mäusen und Ratten nachgewiesen (Sun *et al.* 2001).

4.2.2.2 Sniffer im Vergleich mit anderen Carbonylreduktasen

Die geringen Übereinstimmungen mit Carbonylreduktasen anderer Spezies von maximal 31% deutet auf frühe Divergenz in der Evolution hin. Vor allem überrascht, daß die größte Ähnlichkeit mit CBRs besteht, die in Organismen wie *Bradyrhizobium japonicum* (Thony *et al.* 1987) und *Myxococcus xanthus* (Lobedanz und Sogaard-Andersen 2003; Sogaard-Andersen *et al.* 2003) an Regulationsprozessen beteiligt sind. CsgA aus *M. xanthus* ist dabei sogar als N-terminal verkürztes Protein ohne Cofaktor-Bindungsstelle aktiv (Lobedanz und Sogaard-Andersen 2003). Ob hier funktionale Ähnlichkeiten vorliegen, oder es sich mehr um Zufälle handelt, wird sich mit genauerer Untersuchung der SDR-Funktion dieser Proteine zeigen. Interessant ist zunächst, daß die Regulation von FixR aus *B. japonicum* sauerstoffabhängig ist (Thony *et al.* 1987). Proteine wie Sniffer scheinen jedenfalls in vielen Organismen eine spezifische Rolle zu spielen, da sich in den Datenbanken unzählige potentielle Proteine finden, die als einzige Beschreibung die Ähnlichkeit zu Sniffer aufweisen.

4.2.2.3 Die Carbonylreduktase Sniffer und ihr Substratspektrum

Sniffer paßt hinsichtlich seines Molekulargewichtes und seiner NADPH-Abhängigkeit gut zu den Carbonylreduktasen (CBRs). Die als besonders gute Substrate von CBRs geltenden Phenanthren-Chinon und Menadion (Forrest und Gonzalez 2000) sind auch an Sniffer ausgezeichnete Substrate, wobei der Umsatz des Modellsubstrates Menadion deutlich geringer ist. Insgesamt ist das Substratspektrum dem der Carbonylreduktase aus Schweinehoden sehr ähnlich (Tab. 27). Die einzig relevante Differenz ergibt sich für Methylglyoxal, dem Substrat mit dem höchsten K_M -Wert von 3,5 mM. Sniffer wird, wie typischerweise alle Carbonylreduktasen im Gegensatz zu Aldehydreduktasen und Alkoholdehydrogenasen (Forrest und Gonzalez 2000), von Flavonoid-Inhibitoren wie Rutin und Quercetin gehemmt. Üblicherweise sind Carbonylreduktasen Pyrazol gegenüber unempfindlich. Ausnahmen hiervon sind jedoch für CBRs aus der Lunge bekannt (Nakayama *et al.* 1982; Nakanishi *et al.*

1995). Ob ein IC_{50} von fast 200 mM als Nachweis einer Empfindlichkeit des Sniffer gegenüber Pyrazol gewichtet werden kann, ist sehr fraglich.

Substrat	DmSniffer	ptCR [#]	CHO-CR [*]	hCR ⁺
Phenanthren-9,10-chinon	280	362	2940	600
p-Nitrobenzaldehyd	100	100	100	100
Pyridin-4-carboxyaldehyd	104	-	230	30
Menadion	57	63	52	350
Methylglyoxal	120	282	-	115
Benzoylpyridin	9,5	-	435	-
Testosteron	-	0	33	3

Tabelle 27. Vergleich der Carbonylreduktasen aus *Drosophila* (DmSniffer), Schwein (ptCR), Hamster (CHO-CR) und Mensch (hCR) anhand der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten.
[#] (Tanaka *et al.* 1992); ^{*} (Terada *et al.* 2000); ⁺ (Wermuth 1981)

4.2.2.4 Kristallisation und Struktur

Die Kristallbildung erfolgte sehr schnell - innerhalb von Minuten - und in immer der gleichen Form. Eine weitere Besonderheit ist die Temperaturempfindlichkeit des Enzyms, welches bei stärkeren Temperaturschwankungen quantitativ ausfiel und daher konstant bei ca. 4°C gehalten werden mußte. Somit erfolgte auch die Kristallisation, im Gegensatz zu den bisher bekannten CBRs, nicht bei Raumtemperatur, sondern im Kühlraum. Dies paßt gut zur schnellen Kristallisation, wenn man die Kristallisation als geordnetes Ausfallen des Proteins versteht. Die Strukturaufklärung erfolgte in der Gruppe von Prof. Klebe, Marburg, und ergab eine für Carbonylreduktasen typische Faltung (Jornvall *et al.* 1995). Obgleich das Enzym in Lösung als Dimer vorliegt, zeigte die Einheit im Kristall nur ein Monomer. Daher wurde das Homodimer durch eine kristallographische zweifache Rotationsachse generiert. Besonderheiten der Struktur von Sniffer sind die sehr starke Bindung des Cofaktors NADPH und die dabei auch in Abwesenheit des Substrates definierte Struktur der Substratbindungsschleife. Der Vergleich der Kristallstruktur des Sniffers mit denen anderer, bekannter Carbonylreduktasen zeigt größte Ähnlichkeit mit dem Enzym aus Schweinehoden (Ghosh *et al.* 2001), welches im Gegensatz zu Sniffer eine Insertion von 41 Aminosäuren im Anschluß an den Strang βE enthält. Insbesondere der Bereich der Substratbindung ist nahezu gleich.

4.2.2.5 Hypothese zur Situation *in vivo* - mögliche Substrate und Funktion

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Schneuwly, Regensburg, konnte gezeigt werden, daß Sniffer im Gehirn von *Drosophila* essentiell zum Schutz von Neuronen vor oxidativem Streß ist und dabei sekundär auch Gliazellen den apoptotischen Prozessen anheimfallen. Ungeklärt ist dabei, über welche Moleküle der aufgrund seines Substratspektrums als Carbonylreduktase identifizierte Sniffer durch seine Redoxreaktion die Apoptose steuert, bzw. in diesem Fall verhindert. Mögliche Substrate für Sniffer sind dabei sehr zahlreich und es ist noch zu klären, ob Sniffer direkt und spezifisch den Zelltod auslösende Substanzen entgiftet, oder ob die Wirkung indirekt über eine allgemeine Entgiftung ROS-induzierender Substanzen verläuft. Daher wird die Suche nach den *in-vivo*-Substraten schwierig, würde aber die direkte Verbindung zwischen oxidativem Stress und neuronalem Zelltod weiter erhellen. Einen Hinweis kann die Anordnung der Gene im Vergleich mit dem humanen System geben. Die Catechol-O-Methyltransferase ist durch Inaktivierung von Catecholöstrogen am Östrogenmetabolismus beteiligt (Creveling 2003) und relevant für die Funktion des Gehirns (Winterer und Goldman 2003). Die COMT-katalysierte Methylierung von Neurotransmittern ist eine erste Abwehr in der Entgiftung. Chemisch reaktive, hochtoxische Chinone des Dopamins entstehen durch Oxidation und gelten als eine mögliche Ursache von Krankheiten wie Morbus Parkinson, Chorea Huntington und Krebs (Sulzer und Zecca 2000; Asanuma *et al.* 2003; Choi *et al.* 2003; Zhu 2004). Die neurotoxischen Effekte der Dopamin-Chinone können durch Induktion, bzw. Anwesenheit von Chinonreduktase verzögert werden (Choi *et al.* 2003). Das in *Drosophila* an nahezu identischer Stelle der Thioredoxinreduktase wie die COMT sitzende Gen des Sniffer könnte als Carbonylreduktase mit starker Affinität zu Chinon-Substraten eine ähnliche Funktion übernehmen. Dafür sprechen die neurotoxischen Effekte des Ausschaltens der Sniffer-Expression mit den beobachteten motorischen Störungen und auch das Fehlen eines COMT-Gens im bisher bekannten Genom von *Anopheles* und *Drosophila*, dessen annähernde Vollständigkeit eine Abwesenheit dieses Gens extrem wahrscheinlich macht.

Gezeigt wurde, daß CBRs an der Umsetzung und Entgiftung xenobiotischer Stoffe wie beispielsweise Krebstherapeutika beteiligt sind (Forrest und Gonzalez 2000). Eine ähnliche Entgiftungsfunktion durch CBRs wurde im Mikroorganismus *Comamonas testosteroni* für Insektizide gezeigt (Rekka *et al.* 1996; Maser und Oppermann 1997; Oppermann *et al.* 1998; Maser *et al.* 2000; Maser *et al.* 2001). Dementsprechend könnte auch Sniffer an Insektizidresistenzen beteiligt sein.

4.3 Ausblick: Aspekte zur Bekämpfung des Parasiten und seines Vektors

4.3.1 Bekämpfung des Parasiten

Aufgrund der starken Abweichung der PfGAK von bisher bekannten Adenylatkinasen, speziell denen des Menschen, ist sie als *drug target* geeignet. Günstig für die Nutzung als Ziel einer Medikamentenentwicklung ist auch, dass Adenylatkinasen nicht im Überschuß vorhanden sind (Gutierrez und Csonka 1995). Ihre Funktion in den Mitochondrien macht die AK der Plasmodien besonders zur Verhinderung weiterer Transmission nutzbar. Da die Mitochondrien jedoch auch für die Invasion neuer Blutzellen durch Merozoiten essentiell sind, kann man eine direkte Wirkung auf die Parasitämie innerhalb von 48 Stunden erwarten. Der verhältnismäßig geringe Effekt des spezifischen Inhibitors GP₅A in Kultur kann auf einer geringen Verfügbarkeit am Zielort beruhen, da 5 Membranen durchdrungen werden müssen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist eine geringe Stabilität der vorliegenden Charge des Hemmstoffs, welcher nach einigen Stunden im Inkubator auch in Substrate der AK zerfallen vorgelegen haben kann. Zudem ist eine gametozide Wirkung wahrscheinlich, die in den vorliegenden asexuellen Stadien in den Plasmodienkulturen nicht getestet wurde. Ziel muss daher ein äußerst membrangängiger, stabiler Inhibitor sein. Um diesen zu entwickeln, sollen in nächster Zeit verschiedene Projekte vorangetrieben werden. Zum einen die Strukturaufklärung der PfAK und PfGAK, um deren Zinkfinger spezifisch angreifen zu können und zum anderen weitere Untersuchungen zur Funktion der Adenylatkinasen, auch hier insbesondere des Zinkfingers, im Metabolismus der Malariaerreger.

4.3.2 Bekämpfung des Vektors *Anopheles gambiae*

Der Ansatz, *Drosophila* als Modell für den Malariavektor *Anopheles* zu wählen, wurde durch das vollständige Durchlaufen der Vektorzyklen von *Plasmodium gallinacum* in *Drosophila* experimentell gestützt (Schneider und Shahabuddin 2000). Nach der Charakterisierung des Thioredoxinsystems in *Drosophila melanogaster* konnten im Malariavektor *Anopheles gambiae* ebenfalls die Thioredoxinreduktase, nicht aber eine Glutathionreduktase identifiziert und beschrieben werden (Bauer *et al.* 2003). Die Hypothese, daß das Redoxsystem in Insekten keine Glutathionreduktase besitzt wurde damit weiter bestätigt.

Durch Datenbankanalysen (www.anobase.org) konnte ein dem Sniffer entsprechendes Gen im Malariavektor aus zwei abgelegten Sequenzen (XP_310515 = EAA06310 und BM604122 = BM581188) zusammengesetzt werden. Der N-

Terminus liegt nur als EST ohne Hinweis auf das entsprechende Chromosom vor, der Hauptteil liegt auf dem X-Chromosom. Da sich die Sequenzen auf 56 Aminosäuren überschneiden, kann man davon ausgehen, daß es sich um zwei Teile eines Gens handelt. Dieses ist auf Aminosäureebene zu 58,7% mit Sniffer identisch (Abb. im Anhang). Der hohe Wert repräsentiert eine Übereinstimmung, die außer den für Carbonylreduktasen notwendigen Aminosäuren noch zahlreiche weitere beinhaltet, so daß von gleicher Lokalisation und Funktion im Organismus ausgegangen werden kann. Zudem sind alle weiteren Ähnlichkeiten deutlich geringer, nach Sniffer ist eine SDR aus *Coxiella burnetii* (38% Identität) dem Protein am ähnlichsten und danach schon die auch für Sniffer gefundenen CsgA und FixR (s.o.). Im Hinblick auf den bei Sniffer diskutierten Beitrag zur Insektizidresistenz sollte das Enzym nach den Untersuchungen im Modellorganismus nun vor allem in *Anopheles* charakterisiert werden.

Die Interaktionen zwischen *Plasmodium* und *Anopheles* werden in Zukunft deutlich intensiver untersucht werden können, da neue Techniken eine Kultivierung aller Stadien *in vitro* möglich machen (Al-Olayan *et al.* 2002).

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Zur Bekämpfung der Malaria werden allgemein drei Wege verfolgt. Entweder wird über eine Vektorkontrolle die Krankheitsübertragung verhindert oder die Krankheit selbst bekämpft und damit zumeist die Erreger im Menschen. Zukünftig könnte auch als dritter Weg eine Unterbrechung der Infektionskette durch Impfung zur Verfügung stehen. In dieser Doktorarbeit wurden das Redoxsystem als Angriffspunkt in Insekten und der Energiemetabolismus als Ziel einer möglichen antiparasitären Therapie im Menschen gewählt. Als Modellorganismus in Insekten diente *Drosophila melanogaster*, die Arbeit an Plasmodien erfolgte mit *P. falciparum*, dem Erreger der *Malaria tropica*. Für die Untersuchungen an *Drosophila* kooperierte ich mit verschiedenen Arbeitsgruppen an den Universitäten in Göttingen, Regensburg und Marburg.

In Säugetieren existieren im wesentlichen zwei Abwehrsysteme gegen oxidativen Streß, in welchen die Glutathionreduktase (GR) und Thioredoxinreduktase (TrxR) Schlüsselenzyme sind. Beide weisen zwischen Säugern, Bakterien, Pilzen und Würmern einen hohen Grad an Konservierung auf. Es konnte gezeigt werden, dass in *D. melanogaster* das Gen für eine GR gänzlich fehlt und nur eine neuartige TrxR zur Aufrechterhaltung der Redoxbalance zur Verfügung steht. Dies kann aufgrund der vorliegenden Daten für Insekten allgemein vermutet werden. Die TrxR aus *Drosophila* ist NADPH-abhängig und über ihr Substrat Thioredoxin in der Lage, GSSG zu reduzieren. Ein einzelnes Gen der Taufliege, genannt *dmtrxr-1*, kodiert sowohl für die durch alternatives Splicing entstehende cytoplasmatische und mitochondriale Form der DmTrxR-1. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß sich die mitochondriale Form durch eine N-terminale Verlängerung von 105 Aminosäuren von der cytoplasmatischen Variante unterscheidet. Die kinetische Charakterisierung beider Formen des Enzyms ergab identische Parameter für Aktivitäten und die Affinität gegenüber den vermuteten *in vivo* Substraten DmTrx-1, DmTrx-2 sowie auch gegenüber DTNB und dem Cofaktor NADPH. In Kooperation konnte nachgewiesen werden, daß die mitochondriale Variante einen Verlust des cytoplasmatischen Enzyms teilweise ausgleichen kann, während die mitochondriale Form im umgekehrten Fall nicht ersetzt werden kann. Zum Teil innerhalb des *dmtrxr-1*-Gens findet sich auf dem Komplementärstrang ein weiteres Gen, welches *sniffer* genannt wurde. In Kooperation wurde nachgewiesen, daß dieses Gen essentiell zur Verhinderung alterungsbedingter Neurodegeneration ist. Durch biochemische Charakterisierung konnte das rekombinant hergestellte Produkt dieses Gens in der vorliegenden Arbeit als Carbonylreduktase, ein zu den Kurzketten-Dehydrogenasen (short-chain dehydrogenases) gehörendes Enzym, identifiziert werden. Sniffer weist

das für Carbonylreduktasen typische Substratspektrum mit Phenanthrenequinone als bestem Substrat auf und wird von Flavonoiden wie Quercetin und Rutin sowie Hydroxymercuribenzoat gehemmt. In verschiedenen Ansätzen konnten Kristalle des rekombinanten Proteins gewonnen werden, die inzwischen in Kooperation vermessen wurden und so zu einer Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1,7 Angström führten. Durch diese Arbeiten konnte zum ersten Mal eine Verbindung zwischen einem charakterisierten Gen (*sniffer*), oxidativem Streß und neurodegenerativen Effekten auf molekularer Ebene nachgewiesen werden.

Parasiten haben während ihres Lebenszyklus einen hohen Bedarf an Energie und sind abhängig von einer starken Syntheseleistung. Zur Bewältigung dieses Stresses benötigen sie hohe Aktivitäten an Adenylatkinase (AK; $\text{ATP} + \text{AMP} \leftrightarrow 2 \text{ADP}$) und GTP-AMP-Phosphotransferase (GAK; $\text{GTP} + \text{AMP} \leftrightarrow \text{GDP} + \text{ADP}$). Beide Enzyme wurden in Blutstadien des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* identifiziert und die entsprechenden Gene der PfAK und PfGAK auf den Chromosomen 10 und 4 respektive lokalisiert. Klonierung und heterologe Expression in *E. coli* ergab enzymatisch aktive Proteine mit einer Größe von 28,9 (PfAK), bzw. 28,0 kDa (PfGAK). Das rekombinante Protein der PfAK entspricht in seinen biochemischen Charakteristika denen der authentischen PfAK. Dies gilt auch für eine mögliche Assoziation mit einem stabilisierenden Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa und der hohen Substratspezifität für das Monophosphat-Nukleotid AMP. Die Spezifität für das Triphosphat-Substrat ist weniger stringent. Das beste Triphosphat-Substrat ist ATP mit einem V_{max} -Wert von 75 U/mg und einem k_{cat} von 2800 min^{-1} . Die Sequenz der PfAK enthält eine amphiphatische Helix, welche als notwendig für die Translokation zytosolischer Adenylatkinasen in den Intermembranraum der Mitochondrien beschrieben wurde. Die PfGAK bevorzugt GTP und AMP als Substrat (100 U/mg; $k_{\text{cat}} = 2800 \text{ min}^{-1}$ bei 25°C) und zeigt als Besonderheit keine messbare Aktivität mit ATP. Im Gegensatz zu ihrem Ortholog im Menschen (AK3) enthält die Sequenz der PfGAK ein Zinkfinger-Motiv und bindet Eisenionen. Erste Immunfluoreszenz-Analysen lokalisieren die PfGAK in den Mitochondrien. PfAK und PfGAK werden von den Dinukleosid-Pentaphosphat-Verbindungen AP_5A beziehungsweise GP_5A gehemmt. Die K_i -Werte liegen mit ca. $0.2 \mu\text{M}$ ungefähr 250-fach niedriger als die K_M -Werte der entsprechenden Nukleotidsubstrate. Diese Disubstrat-Inhibitoren sind zum einen nutzbar für die Untersuchung der enzymatischen Mechanismen der PfAK und PfGAK sowie ihrer Funktion in der Homöostase der Adeninnukleotide und repräsentieren zum anderen interessante Modellstrukturen zur Entwicklung von Nucleosiden als Antiparasitika. Zur Lösung der vor allem im Rahmen einer rationalen Medikamentenentwicklung notwendigen Kristallstruktur des Zielmoleküls konnten bereits Kristalle der PfGAK erhalten werden.

5.2 Summary

In general, there are currently three ways to combat malaria. Either by inhibition of transmission via vector control, or by fighting the disease itself, which usually means destroying the parasite within the human host. The third method which should become applicable in the near future is to interrupt the cycle of infection by vaccination as soon as a reliable vaccine comes available. In this work, the redox system in insects was chosen as a potential target for vector control, and the energy metabolism of the parasite was identified and characterized as a potential drug target for antiparasitic therapy in humans. *Drosophila melanogaster* was used as a model in insects, work in *Plasmodium* was done with *P. falciparum*, the parasite causing *Malaria tropica*. Experiments with the insects were done in cooperation with groups at the Universities of Göttingen and Regensburg (Prof. Jäckle and Prof. Schneuwly, respectively), elucidation of protein structure in cooperation with the group of Prof. Klebe at the University of Marburg.

In mammalia, two major systems with glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TrxR) as key enzymes defend the organism against oxidative stress. Both systems are highly conserved between mammalia, bacteria, fungi and worms. It has been shown, that *D. melanogaster* possesses no GR gene and therefore relies completely on the identified TrxR for maintaining redox balance. Taking together the available data, it is likely that all insects lack a GR enzyme. The NADPH-dependent *Drosophila* TrxR can reduce GSSG via its substrate thioredoxin. The single copy gene *dmtrxr-1* codes for both the cytoplasmic and mitochondrial form of DmTrxR-1, generated by alternative splicing. In this thesis, it could be shown that the mitochondrial form differs from the cytoplasmic variant by an N-terminal extension of 105 amino acids. Kinetic characterization of both variants gave identical values for enzyme activities and affinity towards the likely *in vivo* substrates DmTrx-1 and DmTrx-2 as well as towards DTNB and the cofactor NADPH. In cooperation with the group of Prof. Jäckle, it was proved that the mitochondrial variant can compensate a loss of the cytoplasmic form to some extent, while in the reverse case the mitochondrial variant cannot be replaced. Another gene, located on the complementary strand partially within the *dmtrxr-1* gene, could be identified and was named *sniffer*. This gene is essential for prevention of age-related neurodegeneration, as could be shown in a cooperation with the group of Prof. Schneuwly. In this thesis, biochemical characterization of the recombinant protein identified sniffer as a carbonyl reductase, an enzyme belonging to the short-chain-dehydrogenases. Sniffer shows the typical substrate spectrum of carbonyl reductases with phenthrenequinone as best substrate and is inhibited by the flavonoids quercetin and rutin and also by hydroxymercurybenzoate (HMB). Protein

crystals could be obtained under different conditions. In a cooperation with the group of Prof. Klebe, these already lead to a crystal structure with a resolution of 1.7 angstrom. The work on sniffer is the first that directly links a characterized gene (*sniffer*), oxidative stress and neurodegeneration on the molecular level.

For coping with energetic and synthetic challenges, parasites require high activities of adenylate kinase (AK; $\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2 \text{ADP}$) and GTP:AMP phosphotransferase (GAK; $\text{GTP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2 \text{ADP}$). These enzymes were identified in bloodstream stages of *Plasmodium falciparum*. The genes encoding PfAK and PfGAK are located on chromosomes 10 and 4, respectively. Molecular cloning and heterologous expression in *E. coli* yielded enzymatically active proteins of 28.9 (PfAK) and 28.0 kDa (PfGAK). Recombinant PfAK resembles authentic PfAK in its biochemical characteristics including the possible association with a stabilizing protein and the high specificity for AMP as the mononucleotide substrate. Specificity is less stringent for the triphosphate, with ATP as the best substrate (75 U/mg ; $k_{\text{cat}} = 2160 \text{ min}^{-1}$). PfAK contains the sequence of the amphiphatic helix that is known to mediate translocation of the cytosolic protein into the mitochondrial intermembrane space.

PfGAK exhibits substrate preference for GTP and AMP (100 U/mg ; $k_{\text{cat}} = 2800 \text{ min}^{-1}$); notably, there is no detectable activity with ATP. In contrast to its human orthologue (AK3), PfGAK contains a zinc finger motif and binds ionic iron. The dinucleoside pentaphosphate compounds AP_5A and GP_5A inhibited PfAK and PfGAK, respectively, with K_i values of appr. $0.2 \mu\text{M}$ which is more than 250-fold lower than the K_M values determined for the nucleotide substrates. The disubstrate inhibitors are useful for studying the enzymatic mechanism of PfAK and PfGAK as well as their function in adenine nucleotide homeostasis; in addition, the chimeric inhibitors represent interesting lead compounds for developing nucleosides to be used as antiparasitic agents. To elucidate the structure which is necessary for the use as a drug target, crystallization studies have been performed and the first crystals could be obtained.

6 Literaturverzeichnis

- Despommier, Gwadz, Hotez, Knirsch (2000). Parasitic Diseases. New York, Apple Trees Productions.
- Abderrazak, S. B., B. Oury, A. A. Lal, M. F. Bosseno, P. Force-Barge, J. P. Dujardin, T. Fandeur, J. F. Molez, F. Kjellberg, F. J. Ayala and M. Tibayrenc (1999). "*Plasmodium falciparum*: population genetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and other molecular markers." *Exp Parasitol* **92**: 232-8.
- Agarwal, K., K. H. Baek, C. J. Jeon, K. Miyamoto, A. Ueno and H. S. Yoon (1991). "Stimulation of transcript elongation requires both the zinc finger and RNA polymerase II binding domains of human TFIIIS." *Biochemistry* **30**: 7842-51.
- Al-Olayan, E. M., A. L. Beetsma, G. A. Butcher, R. E. Sinden and H. Hurd (2002). "Complete development of mosquito phases of the malaria parasite *in vitro*." *Science* **295**: 677-9.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**: 403-10.
- Anderson, R. A., B. G. Knols and J. C. Koella (2000). "*Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l." *Parasitology* **120**: 329-33.
- Arner, E. S. and A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." *Eur J Biochem* **267**: 6102-9.
- Asanuma, M., I. Miyazaki and N. Ogawa (2003). "Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease." *Neurotox Res* **5**: 165-76.
- Baca, A. M. and W. G. Hol (2000). "Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*." *Int J Parasitol* **30**: 113-8.
- Balcz, B., L. Kirchner, N. Cairns, M. Fountoulakis and G. Lubec (2001). "Increased brain protein levels of carbonyl reductase and alcohol dehydrogenase in Down syndrome and Alzheimer's disease." *J Neural Transm Suppl*: 193-201.
- Bandlow, W., G. Strobel, C. Zoglowek, U. Oechsner and V. Magdolen (1988). "Yeast adenylate kinase is active simultaneously in mitochondria and cytoplasm and is required for non-fermentative growth." *Eur J Biochem* **178**: 451-7.
- Bartosz, G., W. Leyko and R. Fried (1979). "Superoxide dismutase and life span of *Drosophila melanogaster*." *Experientia* **35**: 1193.
- Barzu, O. and S. Michelson (1983). "Simple and fast purification of *Escherichia coli* adenylate kinase." *FEBS Lett* **153**: 280-4.
- Bauer, H., S. Gromer, A. Urbani, M. Schnolzer, R. H. Schirmer and H. M. Muller (2003). "Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." *Eur J Biochem* **270**: 4272-81.

- Bauer, H., S. M. Kanzok and R. H. Schirmer (2002). "Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*: isolation and characterization of a second thioredoxin in *D. melanogaster* and evidence for distinct biological functions of Trx-1 and Trx-2." *J Biol Chem* **277**: 17457-63.
- Beadle, C. and S. L. Hoffman (1993). "History of malaria in the United States Naval Forces at war: World War I through the Vietnam conflict." *Clin Infect Dis* **16**: 320-9.
- Becker, K., S. Gromer, R. H. Schirmer and S. Muller (2000). "Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target." *Eur J Biochem* **267**: 6118-25.
- Becker, K., L. Tilley, J. L. Vennerstrom, D. Roberts, S. Rogerson and H. Ginsburg (2004). "Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions." *Int J Parasitol* **34**: 163-89.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." *Physiol Rev* **78**: 547-81.
- Bender, A. (2002). "Prediction of mitochondrial transit peptides from *Plasmodium falciparum*." Diplomarbeit, Universität Frankfurt am Main, <http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/plasmit>.
- Berghäuser, J. (1975). "A reactive arginine in adenylate kinase." *Biochim Biophys Acta* **397**: 370-6.
- Bertini, R., O. M. Howard, H. F. Dong, J. J. Oppenheim, C. Bizzarri, R. Sergi, G. Caselli, S. Pagliei, B. Romines, J. A. Wilshire, M. Mengozzi, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Pekkari, R. Gurunath, A. Holmgren, L. A. Herzenberg and P. Ghezzi (1999). "Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells." *J Exp Med* **189**: 1783-9.
- Best-Belpomme, M. and M. Ropp (1982). "Catalase is induced by ecdysterone and ethanol in *Drosophila* cells." *Eur J Biochem* **121**: 349-55.
- Bozdech, Z., M. Llinas, B. L. Pulliam, E. D. Wong, J. Zhu and J. L. DeRisi (2003). "The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*." *PLoS Biol* **1**: E5.
- Brune, M., R. Schumann and F. Wittinghofer (1985). "Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene (*adk*) of *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **13**: 7139-51.
- Brunel, C. A., S. J. Madigan, J. A. Cassill, P. T. Edeen and M. McKeown (1998). "pcdr, a novel gene with sexually dimorphic expression in the pigment cells of the *Drosophila* eye." *Dev Genes Evol* **208**: 327-35.
- Buchanan, B. B., P. Schurmann and J. P. Jacquot (1994). "Thioredoxin and metabolic regulation." *Semin Cell Biol* **5**: 285-93.
- Buckling, A., L. C. Ranford-Cartwright, A. Miles and A. F. Read (1999). "Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis *in vitro*." *Parasitology* **118**: 339-46.

- Bullock, W., J. Fernandez and J. Short (1987). "XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." *Bio Tech* **5**: 376-378.
- Butler, D. (2004). "Global fund changes tack on malaria therapy." *Nature* **429**: 588.
- Butler, D., J. Maurice and C. O'Brien (1997). "Vaccines: a roller-coaster of hopes." *Nature* **386**: 537-8.
- Candas, M., R. S. Sohal, S. N. Radyuk, V. I. Klichko and W. C. Orr (1997). "Molecular organization of the glutathione reductase gene in *Drosophila melanogaster*." *Arch Biochem Biophys* **339**: 323-34.
- Carrasco, A. J., P. P. Dzeja, A. E. Alekseev, D. Pucar, L. V. Zingman, M. R. Abraham, D. Hodgson, M. Bienengraeber, M. Puceat, E. Janssen, B. Wieringa and A. Terzic (2001). "Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7623-8.
- Cederbaum, A. I. (1989). "Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity." *Free Radic Biol Med* **7**: 537-9.
- Chambers, G. K., J. F. McDonald, M. McElfresh and F. J. Ayala (1978). "Alcohol-oxidizing enzymes in 13 *Drosophila* species." *Biochem Genet* **16**: 757-67.
- Chambers, J. A. (2003). "Military aviators, special operations forces, and causal malaria prophylaxis." *Mil Med* **168**: 1001-6.
- Chevion, M., E. Berenshtein and E. R. Stadtman (2000). "Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage." *Free Radic Res* **33** Suppl: S99-108.
- Chiu, C. S., S. Su and P. J. Russell (1967). "Adenylate kinase from baker's yeast. I. Purification and intracellular location." *Biochim Biophys Acta* **132**: 361-9.
- Choi, H. J., S. W. Kim, S. Y. Lee and O. Hwang (2003). "Dopamine-dependent cytotoxicity of tetrahydrobiopterin: a possible mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease." *J Neurochem* **86**: 143-52.
- Cleveland, D. W., S. G. Fischer, M. W. Kirschner and U. K. Laemmli (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis." *J Biol Chem* **252**: 1102-6.
- Creveling, C. R. (2003). "The role of catechol-O-methyltransferase in the inactivation of catecholestrogen." *Cell Mol Neurobiol* **23**: 289-91.
- Declerck, P. J. and M. Muller (1987). "Hydrogenosomal ATP:AMP phosphotransferase of *Trichomonas vaginalis*." *Comp Biochem Physiol B* **88**(2): 575-80.
- Deligiannakis, Y., A. Boussac, H. Bottin, V. Perrier, O. Barzu and A. M. Gilles (1997). "A new non-heme iron environment in *Paracoccus denitrificans* adenylate kinase studied by electron paramagnetic resonance and electron spin echo envelope modulation spectroscopy." *Biochemistry* **36**: 9446-52.

- Dinbergs, I. D. and D. G. Lindmark (1989). "*Trichomonas foetus*: purification and characterization of hydrogenosomal ATP:AMP phosphotransferase (adenylate kinase)." *Exp Parasitol* **69**: 150-6.
- Dreusicke, D. and G. E. Schulz (1988). "The switch between two conformations of adenylate kinase." *J Mol Biol* **203**: 1021-8.
- Dzeja, P., A. Kalvenas, A. Toleikis and A. Praskevicius (1985). "The effect of adenylate kinase activity on the rate and efficiency of energy transport from mitochondria to hexokinase." *Biochem Int* **10**: 259-65.
- Dzeja, P. P., R. J. Zeleznikar and N. D. Goldberg (1998). "Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes." *Mol Cell Biochem* **184**: 169-82.
- Egner, U., A. G. Tomasselli and G. E. Schulz (1987). "Structure of the complex of yeast adenylate kinase with the inhibitor P₁,P₅-di(adenosine-5'-)pentaphosphate at 2.6 Å resolution." *J Mol Biol* **195**: 649-58.
- Etkin, N. L. (2003). "The co-evolution of people, plants, and parasites: biological and cultural adaptations to malaria." *Proc Nutr Soc* **62**: 311-7.
- Fahey, R. C. (1977). "Biologically important thiol-disulfide reactions and the role of cyst(e)ine in proteins: an evolutionary perspective." *Adv Exp Med Biol* **86A**: 1-30.
- Feldhaus, P., T. Frohlich, R. S. Goody, M. Isakov and R. H. Schirmer (1975). "Synthetic inhibitors of adenylate kinases in the assays for ATPases and phosphokinases." *Eur J Biochem* **57**: 197-204.
- Felton, G. W. and C. B. Summers (1995). "Antioxidant systems in insects." *Arch Insect Biochem Physiol* **29**: 187-97.
- Forrest, G. L. and B. Gonzalez (2000). "Carbonyl reductase." *Chem Biol Interact* **129**: 21-40.
- Fowler, R. E., A. M. Smith, J. Whitehorn, I. T. Williams, L. H. Bannister and G. H. Mitchell (2001). "Microtubule associated motor proteins of *Plasmodium falciparum* merozoites." *Mol Biochem Parasitol* **117**: 187-200.
- Gallup, J. L. and J. D. Sachs (2001). "The economic burden of malaria." *Am J Trop Med Hyg* **64**: 85-96.
- Gasdaska, J. R., D. L. Kirkpatrick, W. Montfort, M. Kuperus, S. R. Hill, M. Berggren and G. Powis (1996). "Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys73 → Ser mutation." *Biochem Pharmacol* **52**: 1741-7.
- Gasdaska, P. Y., J. E. Oblong, I. A. Cotgreave and G. Powis (1994). "The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor (ADF): thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors." *Biochim Biophys Acta* **1218**: 292-6.
- Ghosh, D., M. Sawicki, V. Pletnev, M. Erman, S. Ohno, S. Nakajin and W. L. Duax (2001). "Porcine carbonyl reductase. structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases." *J Biol Chem* **276**: 18457-63.

- Ginsburg, H. (2002). "Abundant proton pumping in *Plasmodium falciparum*, but why?" *Trends Parasitol* **18**: 483-6.
- Gromer, S., S. Urig and K. Becker (2004). "The thioredoxin system - from science to clinic." *Med Res Rev* **24**: 40-89.
- Gromer, S., R. H. Schirmer and K. Becker (1999). "News and views on thioredoxin reductases." *Redox Rep* **4**: 221-8.
- Gromer, S., L. D. Arscott, C. H. Williams, Jr., R. H. Schirmer and K. Becker (1998). "Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds." *J Biol Chem* **273**: 20096-101.
- Gutierrez, J. A. and L. N. Csonka (1995). "Isolation and characterization of adenylate kinase (adk) mutations in *Salmonella typhimurium* which block the ability of glycine betaine to function as an osmoprotectant." *J Bacteriol* **177**: 390-400.
- Hardie, D. G. (2003). "Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status." *Endocrinology* **144**: 5179-83. Epub 2003 Sep 4.
- Hardie, D. G. and S. A. Hawley (2001). "AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited." *Bioessays* **23**: 1112-9.
- Harlow, E. and D. Lane (1988). Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harman, D. (1956). "Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry." *J. Gerontol.* **11**: 289-300.
- Harper, R., K. Wu, M. M. Chang, K. Yoneda, R. Pan, S. P. Reddy and R. Wu (2001). "Activation of nuclear factor-kappa b transcriptional activity in airway epithelial cells by thioredoxin but not by N-acetyl-cysteine and glutathione." *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**: 178-85.
- Hart, D. T. and F. R. Opperdoes (1984). "The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania species*." *Mol Biochem Parasitol* **13**(2): 159-72.
- Hartl, D. L. (2004). "The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity." *Nat Rev Microbiol* **2**: 15-22.
- Hashimoto, S., K. Matsumoto, Y. Gon, S. Furuichi, S. Maruoka, I. Takeshita, K. Hirota, J. Yodoi and T. Horie (1999). "Thioredoxin negatively regulates p38 MAP kinase activation and IL-6 production by tumor necrosis factor-alpha." *Biochem Biophys Res Commun* **258**: 443-7.
- Hastings, I. M. and U. D'Alessandro (2000). "Modelling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistant malaria." *Parasitol Today* **16**: 340-7.
- Hayton, K. and X. Z. Su (2004). "Genetic and biochemical aspects of drug resistance in malaria parasites." *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**: 1-10.
- Higuchi, Y. (2003). "Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress." *Biochem Pharmacol* **66**: 1527-35.

- Hilgarth, C., N. Sauer and W. Tanner (1991). "Glucose increases the expression of the ATP/ADP translocator and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Chlorella*." *J Biol Chem* **266**: 24044-7.
- Hirota, K., M. Matsui, S. Iwata, A. Nishiyama, K. Mori and J. Yodoi (1997). "AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3633-8.
- Holmes, D. S. and M. Quigley (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." *Anal Biochem* **114**: 193-7.
- Holmgren, A. (1979). "Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydroliipoamide." *J Biol Chem* **254**: 9627-32.
- Holmgren, A. (1985). "Thioredoxin." *Annu Rev Biochem* **54**: 237-71.
- Hume, J. C., E. J. Lyons and K. P. Day (2003). "Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*." *Trends Parasitol* **19**: 144-9.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1996). "PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins." *Protein Sci* **5**: 212-20.
- Hyams, J. S. and G. G. Borisy (1978). "Isolated flagellar apparatus of *Chlamydomonas*: characterization of forward swimming and alteration of waveform and reversal of motion by calcium ions *in vitro*." *J Cell Sci* **33**: 235-53.
- Ifediba, T. and J. P. Vanderberg (1981). "Complete *in vitro* maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes." *Nature* **294**: 364-6.
- Jacobasch, G., D. Buckwitz, C. Gerth and R. Thamm (1990). "Regulation of the energy metabolism of *Plasmodium berghei*." *Biomed Biochim Acta* **49**: S289-94.
- Jornvall, H., B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, J. Jeffery and D. Ghosh (1995). "Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)." *Biochemistry* **34**: 6003-13.
- Kanaani, J. and H. Ginsburg (1989). "Metabolic interconnection between the human malarial parasite *Plasmodium falciparum* and its host erythrocyte. Regulation of ATP levels by means of an adenylate translocator and adenylate kinase." *J Biol Chem* **264**: 3194-9.
- Kanzok, S., S. Rahlfs, K. Becker and S. RH. (2002). "Thioredoxin, thioredoxin reductase, and thioredoxin peroxidase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Meth Enzymol* **347**: 370-381.
- Kanzok, S. M. (2001). Die Thioredoxinsysteme von *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae* und dem Insektenmodellorganismus *Drosophila melanogaster*. Medizinische Fakultät. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Kawai, M. and H. Uchimiya (1995). "Biochemical properties of rice adenylate kinase and subcellular location in plant cells." *Plant Mol Biol* **27**: 943-51.
- Kim, H. J., S. Nishikawa, T. Tanaka, S. Uesugi, H. Takenaka, M. Hamada and S. A. Kuby (1989). "Synthetic genes for human muscle-type adenylate kinase in *Escherichia coli*." *Protein Eng* **2**: 379-86.

- Krook, M., V. Prozorovski, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte and H. Jornvall (1992). "Short-chain dehydrogenases. Proteolysis and chemical modification of prokaryotic 3 alpha/20 beta-hydroxysteroid, insect alcohol and human 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenases." *Eur J Biochem* **209**: 233-9.
- Kwiatkowski, D. (1989). "Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro." *J Exp Med* **169**: 357-61.
- Lange, S., C. Rozario and M. Muller (1994). "Primary structure of the hydrogenosomal adenylate kinase of *Trichomonas vaginalis* and its phylogenetic relationships." *Mol Biochem Parasitol* **66**: 297-308.
- Lasonder, E., Y. Ishihama, J. S. Andersen, A. M. Vermunt, A. Pain, R. W. Sauerwein, W. M. Eling, N. Hall, A. P. Waters, H. G. Stunnenberg and M. Mann (2002). "Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry." *Nature* **419**: 537-42.
- Le Roch, K. G., Y. Zhou, P. L. Blair, M. Grainger, J. K. Moch, J. D. Haynes, P. De La Vega, A. A. Holder, S. Batalov, D. J. Carucci and E. A. Winzeler (2003). "Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle." *Science* **301**: 1503-8.
- Lee, Y. M., F. J. Ayala and H. P. Misra (1981). "Purification and properties of superoxide dismutase from *Drosophila melanogaster*." *J Biol Chem* **256**: 8506-9.
- Lipman, J. M., A. Turturro and R. W. Hart (1989). "The influence of dietary restriction on DNA repair in rodents: a preliminary study." *Mech Ageing Dev* **48**: 135-43.
- Lipmann, F. (1981). "The ATP-phosphate cycle." *Curr Top Cell Regul* **18**: 301-11.
- Lobedanz, S. and L. Sogaard-Andersen (2003). "Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*." *Genes Dev* **17**: 2151-61. Epub 2003 Aug 15.
- Luke, T. C. and S. L. Hoffman (2003). "Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine." *J Exp Biol* **206**: 3803-8.
- Luz, C. M., I. Konig, R. H. Schirmer and R. Frank (1990). "Human cytosolic adenylate kinase allelozymes; purification and characterization." *Biochim Biophys Acta* **1038**: 80-4.
- Maser, E., E. Mobus and G. Xiong (2000). "Functional expression, purification, and characterization of 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*." *Biochem Biophys Res Commun* **272**: 622-8.
- Maser, E. and U. C. Oppermann (1997). "Role of type-1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes." *Eur J Biochem* **249**: 365-9.
- Maser, E., G. Xiong, C. Grimm, R. Ficner and K. Reuter (2001). "3alpha-Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation." *Chem Biol Interact* **130-132**: 707-22.

- Massie, H. R., T. R. Williams and V. R. Aiello (1981). "Superoxide dismutase activity in two different wild-type strains of *Drosophila melanogaster*." *Gerontology* **27**: 205-8.
- Masterson, C., A. Blackburn and C. Wood (2000). "Acyl-CoA dehydrogenase activity in pea cotyledon tissue during germination and initial growth." *Biochem Soc Trans* **28**: 760-2.
- Matsuura, S., M. Igarashi, Y. Tanizawa, M. Yamada, F. Kishi, T. Kajii, H. Fujii, S. Miwa, M. Sakurai and A. Nakazawa (1989). "Human adenylate kinase deficiency associated with hemolytic anemia. A single base substitution affecting solubility and catalytic activity of the cytosolic adenylate kinase." *J Biol Chem* **264**: 10148-55.
- McKinley-McKee, J. S., J. O. Winberg and G. Pettersson (1991). "Mechanism of action of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase." *Biochem Int* **25**: 879-85.
- McLaughlin, J. (1985). "The presence of alpha-glycerophosphate dehydrogenase (NAD⁺-linked) and adenylate kinase as core and integral membrane enzymes respectively in the glycosomes of *Trypanosoma rhodesiense*." *Mol Biochem Parasitol* **14**: 219-30.
- Mehlhorn, H. and G. Piekarski (2002). Grundriss der Parasitenkunde. Heidelberg, Spektrum Verlag.
- Meuwissen, J. H. and T. Ponnudurai (1988). "Biology and biochemistry of sexual and sporogonic stages of *Plasmodium falciparum*: a review." *Biol Cell* **64**: 245-9.
- Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* **260**: 289-98.
- Miura, K., S. Inouye, K. Sakai, H. Takaoka, F. Kishi, M. Tabuchi, T. Tanaka, H. Matsumoto, M. Shirai, T. Nakazawa and A. Nakazawa (2001). "Cloning and characterization of adenylate kinase from *Chlamydia pneumoniae*." *J Biol Chem* **276**: 13490-8.
- Mockett, R. J., A. C. Bayne, L. K. Kwong, W. C. Orr and R. S. Sohal (2003). "Ectopic expression of catalase in *Drosophila* mitochondria increases stress resistance but not longevity." *Free Radic Biol Med* **34**: 207-17.
- Mockett, R. J., R. S. Sohal and W. C. Orr (1999). "Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia." *Faseb J* **13**: 1733-42.
- Moorthy, V. S., M. F. Good and A. V. Hill (2004). "Malaria vaccine developments." *Lancet* **363**: 150-6.
- Morris, G. M., D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, and A. J. Olson (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and anempirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19**, 1632-1662.
- Muller, C. W. and G. E. Schulz (1992). "Structure of the complex between adenylate kinase from *Escherichia coli* and the inhibitor Ap5A refined at 1.9 Å resolution. A model for a catalytic transition state." *J Mol Biol* **224**: 159-77.
- Mustacich, D. and G. Powis (2000). "Thioredoxin reductase." *Biochem J* **346**: 1-8.

- Nakanishi, M., Y. Tamada, Y. Deyashiki and A. Hara (1995). "Over-expression of pig lung carbonyl reductase in *Escherichia coli*." *Biol Pharm Bull* **18**: 1248-50.
- Nakayama, T., A. Hara and H. Sawada (1982). "Purification and characterization of a novel pyrazole-sensitive carbonyl reductase in guinea pig lung." *Arch Biochem Biophys* **217**: 564-73.
- Nakazawa, A., Y. M., T. H., M. Shahjahan and T. Tanabe (1990). Gene structure of three vertebrate adenylate kinase isozymes. Isozymes: Structure, function and use in biology and medicine. New York, Wiley-Lyss: 495-514.
- Nalvarte, I., A. E. Damdimopoulos and G. Spyrou (2004). "Human mitochondrial thioredoxin reductase reduces cytochrome c and confers resistance to complex III inhibition." *Free Radic Biol Med* **36**: 1270-8.
- Noguchi, M., T. Sawada and T. Akazawa (2001). "ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*." *J Exp Biol* **204**: 1063-71.
- Noma, T., S. Song, Y. S. Yoon, S. Tanaka and A. Nakazawa (1998). "cDNA cloning and tissue-specific expression of the gene encoding human adenylate kinase isozyme 2." *Biochim Biophys Acta* **1395**: 34-9.
- Oppermann, U. C., G. Nagel, I. Belai, J. E. Bueld, S. Genti-Raimondi, J. Koolman, K. J. Netter and E. Maser (1998). "Carbonyl reduction of an anti-insect agent imidazole analogue of metyrapone in soil bacteria, invertebrate and vertebrate species." *Chem Biol Interact* **114**: 211-24.
- Orr, E. C., G. C. Bewley and W. C. Orr (1990). "cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* catalase." *Nucleic Acids Res* **18**: 3663.
- Orr, W. C., L. A. Arnold and R. S. Sohal (1992). "Relationship between catalase activity, life span and some parameters associated with antioxidant defenses in *Drosophila melanogaster*." *Mech Ageing Dev* **63**: 287-96.
- Orr, W. C., E. C. Orr, S. K. Legan and R. S. Sohal (1996). "Molecular analysis of the *Drosophila* catalase gene." *Arch Biochem Biophys* **330**: 251-8.
- Pai, E. F., P. A. Karplus and G. E. Schulz (1988). "Crystallographic analysis of the binding of NADPH, NADPH fragments, and NADPH analogues to glutathione reductase." *Biochemistry* **27**: 4465-74.
- Perrier, V., S. Burlacu-Miron, S. Bourgeois, W. K. Surewicz and A. M. Gilles (1998). "Genetically engineered zinc-chelating adenylate kinase from *Escherichia coli* with enhanced thermal stability." *J Biol Chem* **273**: 19097-101.
- Perrier, V., S. Burlacu-Miron, A. Boussac, A. Meier and A. M. Gilles (1998). "Metal chelating properties of adenylate kinase from *Paracoccus denitrificans*." *Protein Eng* **11**: 917-23.

- Perry, G., A. Nunomura, K. Hirai, X. Zhu, M. Perez, J. Avila, R. J. Castellani, C. S. Atwood, G. Aliev, L. M. Sayre, A. Takeda and M. A. Smith (2002). "Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases?" *Free Radic Biol Med* **33**: 1475-9.
- Petmitr, P., G. Pongvilairat and P. Wilairat (1997). "Large scale culture technique for pure *Plasmodium falciparum* gametocytes." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **28**: 18-21.
- Picklo, M. J., T. J. Montine, V. Amarnath and M. D. Neely (2002). "Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease." *Toxicol Appl Pharmacol* **184**: 187-97.
- Pinder, J. C., R. E. Fowler, A. R. Dluzewski, L. H. Bannister, F. M. Lavin, G. H. Mitchell, R. J. Wilson and W. B. Gratzer (1998). "Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion." *J Cell Sci* **111**: 1831-9.
- Rahlfs, S., R. H. Schirmer and K. Becker (2002). "The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites." *Cell Mol Life Sci* **59**: 1024-41.
- Ranson, H., L. Prapanthadara and J. Hemingway (1997). "Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*." *Biochem J* **324**: 97-102.
- Rastogi, M., N. L. Pal and A. B. Sen (1987). "Effect of variation in temperature on development of *Plasmodium berghei* (NK 65 strain) in *Anopheles stephensi*." *Folia Parasitol (Praha)* **34**: 289-97.
- Rawlings, D. J. and D. C. Kaslow (1992). "A novel 40-kDa membrane-associated EF-hand calcium-binding protein in *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* **267**: 3976-82.
- Regierer, B., A. R. Fernie, F. Springer, A. Perez-Melis, A. Leisse, K. Koehl, L. Willmitzer, P. Geigenberger and J. Kossmann (2002). "Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants." *Nat Biotechnol* **20**: 1256-60.
- Reiter, P. (2000). "From Shakespeare to Defoe: malaria in England in the Little Ice Age." *Emerg Infect Dis* **6**: 1-11.
- Rekka, E. A., M. Soldan, I. Belai, K. J. Netter and E. Maser (1996). "Biotransformation and detoxification of insecticidal metyrapone analogues by carbonyl reduction in the human liver." *Xenobiotica* **26**: 1221-9.
- Rivero, A. and H. M. Ferguson (2003). "The energetic budget of *Anopheles stephensi* infected with *Plasmodium chabaudi*: is energy depletion a mechanism for virulence?" *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **270**: 1365-71.
- Roth, E. F., Jr., M. C. Calvin, I. Max-Audit, J. Rosa and R. Rosa (1988). "The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites." *Blood* **72**: 1922-5.

- Rudiger, S., L. Germeroth, J. Schneider-Mergener and B. Bukau (1997). "Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries." *Embo J* **16**: 1501-7.
- Sachs, J. and P. Malaney (2002). "The economic and social burden of malaria." *Nature* **415**: 680-5.
- Saitoh, M., H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono and H. Ichijo (1998). "Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1." *Embo J* **17**: 2596-606.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, Eds. (1990). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarma, G. N., S. N. Savvides, K. Becker, M. Schirmer, R. H. Schirmer and P. A. Karplus (2003). "Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development." *J Mol Biol* **328**: 893-907.
- Sato, N., Y. Koyama and H. Shiokawa (1982). "Antigenic structure of adenylate kinase from porcine skeletal muscle. I. Three immunochemically active peptides obtained by cleavage with cyanogen bromide." *J Biochem (Tokyo)* **91**: 1749-57.
- Sawicki, R., S. P. Singh, A. K. Mondal, H. Benes and P. Zimniak (2003). "Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class." *Biochem J* **370**: 661-9.
- Schirmer, R. H., T. Schollhammer, G. Eisenbrand and R. L. Krauth-Siegel (1987). "Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections." *Free Radic Res Commun* **3**: 3-12.
- Schirmer, R. H., H. Bauer and K. Becker (2002). Glutathione reductase. *Encyclopedia of Molecular Medicine*, New York, Wiley & Sons.
- Schlauderer, G. J., K. Proba and G. E. Schulz (1996). "Structure of a mutant adenylate kinase ligated with an ATP-analogue showing domain closure over ATP." *J Mol Biol* **256**: 223-7.
- Schneider, D. and M. Shahabuddin (2000). "Malaria parasite development in a *Drosophila* model." *Science* **288**: 2376-9.
- Schricker, R., M. Angermayr, G. Strobel, S. Klinke, D. Korber and W. Bandlow (2002). "Redundant mitochondrial targeting signals in yeast adenylate kinase." *J Biol Chem* **277**: 28757-64.
- Schulz, G. E. (1987). "Structural and functional relationships in the adenylate kinase family." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**: 429-39.
- Schulz, G. E. (1991). "Mechanisms of enzyme catalysis from crystal structure analyses." *Ciba Found Symp* **161**: 8-22; discussion 22-7.
- Schulz, G. E. (1992). "Induced-fit movements in adenylate kinases." *Faraday Discuss*: 85-93.

- Schulz, G. E., M. Elzinga, F. Marx and R. H. Schirmer (1974). "Three dimensional structure of adenylyl kinase." *Nature* **250**: 120-3.
- Schulz, G. E., C. W. Muller and K. Diederichs (1990). "Induced-fit movements in adenylylate kinases." *J Mol Biol* **213**: 627-30.
- Schulz, G. E., E. Schiltz, A. G. Tomasselli, R. Frank, M. Brune, A. Wittinghofer and R. H. Schirmer (1986). "Structural relationships in the adenylylate kinase family." *Eur J Biochem* **161**: 127-32.
- Schulz, G. E. and R. H. Schirmer (1974). "Topological comparison of adenylyl kinase with other proteins." *Nature* **250**(462): 142-4.
- Shapiro, H. K. (1998). "Carbonyl-trapping therapeutic strategies." *Am J Ther* **5**: 323-53.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* **82**: 291-5.
- Sies, H. and E. Cadenas (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **311**: 617-31.
- Silins, G. U., R. L. Blakeley and P. W. Riddles (1996). "Characterisation of genes encoding a nucleoside monophosphate kinase and a L35 ribosomal protein from *Babesia bovis*." *Mol Biochem Parasitol* **76**: 231-44.
- Singh, M., E. Silva, S. Schulze, D. A. Sinclair, K. A. Fitzpatrick and B. M. Honda (2000). "Cloning and characterization of a new theta-class glutathione-S-transferase (GST) gene, *gst-3*, from *Drosophila melanogaster*." *Gene* **247**: 167-73.
- Singh, S. P., J. A. Coronella, H. Benes, B. J. Cochrane and P. Zimniak (2001). "Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products." *Eur J Biochem* **268**: 2912-23.
- Sogaard-Andersen, L., M. Overgaard, S. Lobedanz, E. Ellehauge, L. Jelsbak and A. A. Rasmussen (2003). "Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*." *Mol Microbiol* **48**: 1-8.
- Sohal, R. S., L. Arnold and W. C. Orr (1990). "Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*." *Mech Ageing Dev* **56**: 223-35.
- Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." *Science* **273**: 59-63.
- Stadtman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." *Science* **257**: 1220-4.
- Sulzer, D. and L. Zecca (2000). "Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review." *Neurotox Res* **1**: 181-95.
- Sun, Q. A., F. Zappacosta, V. M. Factor, P. J. Wirth, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev (2001). "Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. Evidence for alternative first exon splicing." *J Biol Chem* **276**: 3106-14. Epub 2000 Nov 1.

- Talisuna, A. O., P. Bloland and U. D'Alessandro (2004). "History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance." *Clin Microbiol Rev* **17**: 235-54.
- Tanabe, T., M. Yamada, T. Noma, T. Kajii and A. Nakazawa (1993). "Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes." *J Biochem (Tokyo)* **113**: 200-7.
- Tanaka, M., S. Ohno, S. Adachi, S. Nakajin, M. Shinoda and Y. Nagahama (1992). "Pig testicular 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase exhibits carbonyl reductase-like structure and activity. cDNA cloning of pig testicular 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *J Biol Chem* **267**: 13451-5.
- Tardieux, I., I. Baines, M. Mossakowska and G. E. Ward (1998). "Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa." *Mol Biochem Parasitol* **93**: 295-308.
- Taubes, G. (2000). "Vaccines. Searching for a parasite's weak spot." *Science* **290**: 434-7.
- Taylor, W. R. and N. J. White (2004). "Antimalarial drug toxicity: a review." *Drug Saf* **27**: 25-61.
- Terada, T., Y. Sugihara, K. Nakamura, R. Sato, N. Inazu and M. Maeda (2000). "Cloning and bacterial expression of monomeric short-chain dehydrogenase/reductase (carbonyl reductase) from CHO-K1 cells." *Eur J Biochem* **267**: 6849-57.
- Thony, B., H. M. Fischer, D. Anthamatten, T. Bruderer and H. Hennecke (1987). "The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (fixRnifA) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, nifA-independent type of activation." *Nucleic Acids Res* **15**: 8479-99.
- Tomasselli, A. and G. Schulz (1987). "Structural and functional studies in the adenylate kinase family: on the way to new enzymes." *CHIMICAoggi*(Jan-Feb): 11-18.
- Tomasselli, A. G. and L. H. Noda (1980). "Mitochondrial ATP:AMP phosphotransferase from beef heart: purification and properties." *Eur J Biochem* **103**: 481-91.
- Touré, Y. T. and A. Odula (2004). "Focus: malaria." *Nat Rev Microbiol* **2**(4): 276-7.
- Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." *Science* **193**: 673-5.
- Traxler, A. (1997). Zur Babesiose des Pferdes - Immunologische und biochemische Untersuchungen an den Adenylatkinasen des Parasiten und der Wirtszelle. Dissertation, Universität Heidelberg.
- Vaidya, A. B. (2004). "Mitochondrial and plastid functions as antimalarial drug targets." *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**: 11-23.
- Van Rompay, A. R., M. Johansson and A. Karlsson (1999). "Identification of a novel human adenylate kinase. cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein." *Eur J Biochem* **261**: 509-17.

- Vetter, I. R., M. Konrad and P. Rosch (1991). "Complexes of yeast adenylate kinase and nucleotides investigated by ^1H NMR." *Biochemistry* **30**: 4137-42.
- Videla, L. A., S. B. Barros and V. B. Junqueira (1990). "Lindane-induced liver oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **9**: 169-79.
- Videla, L. A. and V. Fernandez (1988). "Biochemical aspects of cellular oxidative stress." *Arch Biol Med Exp (Santiago)* **21**: 85-92.
- Villa, H., Y. Perez-Pertejo, C. Garcia-Estrada, R. M. Reguera, J. M. Requena, B. L. Tekwani, R. Balana-Fouce and D. Ordonez (2003). "Molecular and functional characterization of adenylate kinase 2 gene from *Leishmania donovani*." *Eur J Biochem* **270**: 4339-47.
- Villarejo, M. R. and I. Zabin (1974). "Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains." *J Bacteriol* **120**: 466-74.
- Villarroya, A., E. Juan, B. Egestad and H. Jornvall (1989). "The primary structure of alcohol dehydrogenase from *Drosophila lebanonensis*. Extensive variation within insect 'short-chain' alcohol dehydrogenase lacking zinc." *Eur J Biochem* **180**: 191-7.
- Von Zabern, I., B. Wittmann-Liebold, R. Untucht-Grau, R. H. Schirmer and E. F. Pai (1976). "Primary and tertiary structure of the principal human adenylate kinase." *Eur J Biochem* **68**: 281-90.
- Wakasugi, N., Y. Tagaya, H. Wakasugi, A. Mitsui, M. Maeda, J. Yodoi and T. Tursz (1990). "Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8282-6.
- Watanabe, K. and S. Kubo (1982). "Mitochondrial adenylate kinase from chicken liver. Purification characterization and its cell-free synthesis." *Eur J Biochem* **123**: 587-92.
- Watanabe, T. and M. Flavin (1976). "Nucleotide-metabolizing enzymes in *Chlamydomonas flagella*." *J Biol Chem* **251**: 182-92.
- Wei, S. J., A. Botero, K. Hirota, C. M. Bradbury, S. Markovina, A. Laszlo, D. R. Spitz, P. C. Goswami, J. Yodoi and D. Gius (2000). "Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation." *Cancer Res* **60**: 6688-95.
- Wei, Y. H., Y. S. Ma, H. C. Lee, C. F. Lee and C. Y. Lu (2001). "Mitochondrial theory of aging matures--roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* **64**: 259-70.
- Weigel, A. (1993). Adenylatkinasen aus *Plasmodium falciparum*-parasitierten Humanerythrocyten. Dissertation, Universität Heidelberg.
- Wermuth, B. (1981). "Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase." *J Biol Chem* **256**: 1206-13.

- Wiesner, J., R. Ortmann, H. Jomaa and M. Schlitzer (2003). "New antimalarial drugs." *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 5274-93.
- Williams, B. A. and P. J. Keeling (2003). "Cryptic organelles in parasitic protists and fungi." *Adv Parasitol* **54**: 9-68.
- Williams, C. (1992). *Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase – a family of flavoenzyme transhydrogenases. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press Inc. **III**: 121-195.
- Winterer, G. and D. Goldman (2003). "Genetics of human prefrontal function." *Brain Res Brain Res Rev* **43**: 134-63.
- Wood, W. B. (1966) "Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA". *J. Mol. Biol.* **16**: 118-133.
- Yoneda, T., M. Sato, M. Maeda and H. Takagi (1998). "Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: cloning of the fourth adenylate kinase." *Brain Res Mol Brain Res* **62**: 187-95.
- Yoshida, S., T. Katoh, T. Tetsuka, K. Uno, N. Matsui and T. Okamoto (1999). "Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts." *J Immunol* **163**: 351-8.
- Zheng, L. (1999). "Genetic basis of encapsulation response in *Anopheles gambiae*." *Parassitologia* **41**: 181-4.
- Zhu, B. T. (2004). "CNS dopamine oxidation and catechol-O-methyltransferase: importance in the etiology, pharmacotherapy, and dietary prevention of Parkinson's disease." *Int J Mol Med* **13**: 343-53.

7 Anhang

Posttranslationale Modifikation	PfAK		PfGAK	
N-Glycosylierungsstelle N ^[^P] [ST] ^[^P]	7 131	NFST NQTK	135	NVSN
Glycosaminoglycan Anheftungsstelle SG.G	39	SGKG		
Phosphorylierung durch cAMP- cGMP-abhängige Protein-Kinase [RK]{2}.[ST]	198 234	KRLT KKIS	40	KKES
Phosphorylierungsstelle Protein-Kinase c [ST].[RK]	39 153 161	SGK SGR SGR	21	SKK
Phosphorylierungsstelle casein kinase II [ST].{2}[DE]	9 25 58 94 133	STID SKPD STGD SLVD TKLD	15 21 102	TFAE SKKE TNID
Phosphorylierungsstelle Tyrosin-Kinase [RK].{2,3}[DE].{2,3}Y			210	RDFDDFY
N-Myristoylierungsstelle G ^[^EDRKHPFYW] .{2}[STAGCN] ^[^P]	35	GAPGSG	10 56	GVGKGT GNLVSD
Amidations-Stelle .G[RK][RK]			122	LGRR
Signatur der Adenylatkinasen [LIVMFYW]{3}DG[FYI]PR.{3}[NQ]	109	FILDGYPRNVKQ	83	FILDGFPRNMYQ

Tabelle A1. Mögliche posttranslationale Modifikationen der PfAK und PfGAK entsprechend der Vorhersagen von PROSITE (<http://www.expasy.org/tools/>).

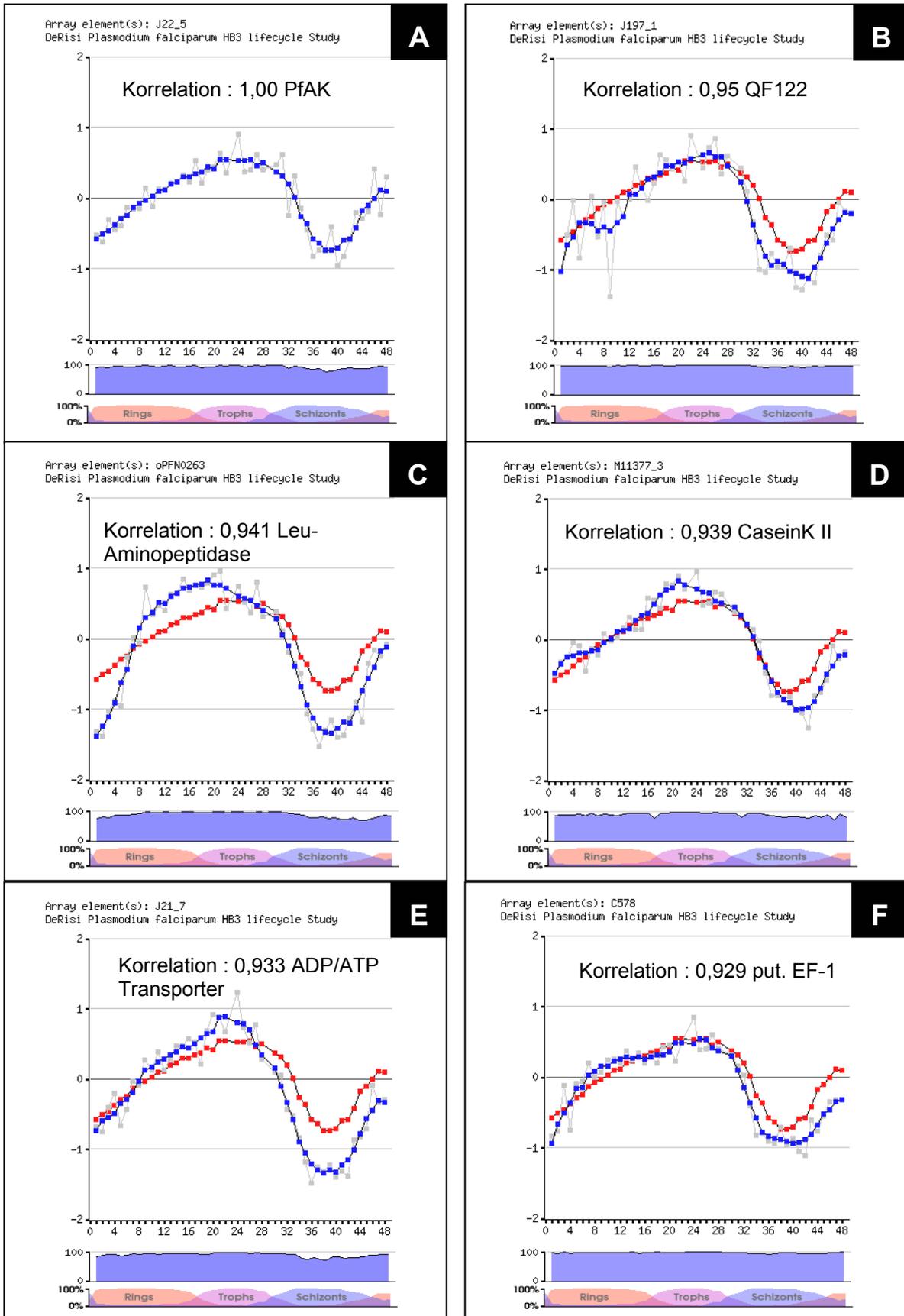


Abbildung A2. Stadienspezifische Synthese von RNA für bestimmte Gene. Auf der X-Achse ist die Zeit in Stunden aufgetragen, auf der y-Achse der Logarithmus (2) der Ratio der Farbstoffe Cy5 / Cy3, wobei Cy5 das spezifische Genfragment färbt. Cy3 ist die Kontrolle. In B-E stellt die rote Linie das Profil der PFAK dar. Angegeben ist die Korrelation mit dem Profil der PFAK.

8 Lebenslauf

Julia Katharina Bolt-Ulschmid

Wildunger Str. 3; 60487 Frankfurt am Main
Tel. 069 - 700 673; E-mail: jkulschmid@gmx.de

Geboren am 10. Juli 1974 in Hamburg
Verheiratet mit Jan Wilhelm Bolt
Eltern Anke Ulschmid-Jürgensen, geb. Jürgensen
Uwe Karsten Ulschmid

Schulische Ausbildung

1981-1985 Grundschule Schule Schulkamp, Hamburg
1985-1991 Gymnasium Othmarschen, Hamburg
1991-1992 Gymnasium Christophorusschule, Braunschweig
1992-1994 Gymnasium Sophie-Barat-Schule, Hamburg
Juni 1994 Abitur

Universitätsausbildung

1994-1999 Universität Hohenheim in Stuttgart
Diplom in Agrarwissenschaften (Dipl. Ing. sc. agr.)
Spezialisierung: Biotechnologie in Tier- und Pflanzenzüchtung
Diplomarbeit am Institut für Tierzüchtung und Biotechnologie,
Universität Hohenheim; Titel: *"Kartierung von Geneffekten auf
Chromosom 1 beim Schwein"*

seit 1999 Doktorarbeit an der Universität Würzburg
Thema: "Charakterisierung von Adenylatkinasen aus
Plasmodium falciparum und Thioredoxinreduktase-assoziierten
Proteinen aus Dipteren", Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Hacker,
Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg; Zweitgutachter und
Betreuer: Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg

10/1999-12/2000 Forschungsarbeiten am Zentrum für Infektionsforschung,
Würzburg, im Labor von Prof. Dr. Becker-Brandenburg

seit 1/2001 Forschungsarbeiten am Interdisziplinären Forschungszentrum
der Universität Gießen im Labor von Prof. Dr. Becker-
Brandenburg

8/2002-11/2002 Gastdotorandin im Labor von Prof. Dr. Leann Tilley, LaTrobe
University, Melbourne, Australien

9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich...

- ... bei *Frau Prof. Katja Becker-Brandenburg* für die Überlassung des Themas, die vielen fachlichen, strategischen und persönlichen Gespräche in einer in jeder Hinsicht spannenden und lehrreichen Zeit.
- ... bei *Herrn Prof. Jörg Hacker* für die Übernahme des Erstgutachtens und seine freundliche Unterstützung trotz sicherlich vieler anderer Aufgaben.
- ... bei *Herrn Prof. Heiner Schirmer* für ein immer offenes Ohr und den Mut der Erfahrung für ungewöhnliche Ansichten und Thesen.
- ... bei *Frau Heilos, Frau Walther* und *Frau Borde* für Beruhigung und Freundlichkeit, wenn ich mir mal wieder Sorgen machte...
- ... bei *Herrn Dr. Stefan Rahlfs* für eine sehr schöne Zeit in steter Diskussion an den Mittelgebirgen unserer Schreibtische und im Labor.
- ... bei *Frau Petra Harwaldt* dafür, daß ich mich immer und in allem auf Dich verlassen konnte.
- ... bei *Sabine, Sascha, Monique, Christine, Marcel, Solange* für viele schöne Tage im "Doktoranden-Rudel" und die nette Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.
- ... bei *Beate, Marina* und *Elisabeth* unter anderem für Gele, Messungen und eine sichere Arbeitsumgebung, sowie besonders *Uli* für die Hilfen bei PC-Problemen.
- ... bei *Frau Dr. Angelika Irmeler, Dr. Stefan Kanzok* und *Dr. Klaus Erb* für die große Motivation durch die richtigen Worte im entscheidenden Augenblick. Vor allem bei Angelika zudem für die hilfreichen Diskussionen zu seltsamen Peaks und ähnlichem mehr.
- ... bei *Dr. Rainer Vick* für seine großen Bemühungen um die Aktualisierung veralteter Computerprogramme zur Berechnung ungewöhnlicher kinetischer Konstanten.
- ... bei *Frau Prof. Leann Tilley* und *Frau Dr. Melanie Rug* für eine wissenschaftlich lehrreich-spannende und traumhaft schöne Zeit "down under".
- ... bei *Frau Dr. Petra Beeckmann*, weil es längst schon fällig war, für inzwischen schon 7 (!) Jahre Hilfe, Ratschläge und natürlich viele glückliche Stunden mit Schokolade und Katzen (und manchmal auch unseren Männern).
- ... vor allem auch bei meinen *Eltern* für die großartige und geduldige Unterstützung all meiner "Flausen" und eine sichere Basis.
- ... in erster Linie bei *Jan*, einem lebenden Beispiel des wahren Wortes "in der Ruhe liegt die Kraft", für seine große Ruhe ohne hinderliche Zweifel, die mich die meisten heiklen Momente angenehm entspannt überstehen läßt. Zudem dafür sich hin und wieder von meinen schrägen Ideen anstecken zu lassen. Danke !

10 Eigene Veröffentlichungen

- I Kanzok S, Fechner A, Bauer H, *Ulschmid JK*, Müller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer RH & Becker K. (2001). Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster* **Science** 291: 643-646
- II Missirlis F, *Ulschmid JK*, Hirosawa-Takamori M, Grönke S, Schäfer U, Becker K, Philips JP & Jäckle H (2002). Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single *Drosophila* gene are both essential for viability **J Biol Chem** 277: 11521-11526
- III Botella JA, *Ulschmid JK*, Gruenewald C, Moehle C, Kretzschmar D, Becker K, & Schneuwly S (2004). The *Drosophila* Carbonyl Reductase Sniffer Prevents Oxidative Stress-induced Neurodegeneration **Curr Biol** 14 (9): 782-786
- IV *Ulschmid JK*, Rahlf S, Schirmer RH & Becker K (2004). Adenylate Kinase and GTP:AMP Phosphotransferase of the Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*. Central Players in Cellular Energy Metabolism **Mol Biochem Parasitol** 136 (2): 211-220, erscheint im August, im Internet verfügbar seit dem 22. Mai 2004
- V Sgraja TA, *Ulschmid JK*, Becker K, Klebe G, Reuter K & Heine A (2004). Structural insights into the neuroprotective carbonyl reductase Sniffer of *Drosophila melanogaster*. Manuskript eingereicht

