

Redoxnetzwerke des Malariaerregers Plasmodium: Validierung von Schlüsselenzymen für neue chemotherapeutische Ansätze

KATHRIN BUCHHOLZ



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des PhD-Grades
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Redoxnetzwerke des Malariaerregers Plasmodium:
Validierung von Schlüsselenzymen für neue
chemotherapeutische Ansätze**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des PhD-Grades
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Kathrin Buchholz

Tierärztin aus Münster

Gießen (2008)

Aus dem Institut für Biochemie der Ernährung des Menschen,

Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Professor Dr. Katja Becker

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Katja Becker

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dominique Soldati-Favre

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Martin Diener

Priv.-Doz. Dr. Hassan Jomaa

Tag der Disputation: 05.12.2008

Ich erkläre:

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

Kathrin Buchholz

Meinen Eltern und Schnuti-bácsi gewidmet.

An jeder Sache etwas zu sehen, suchen, was noch niemand gesehen und woran noch
niemand gedacht hat.

(Georg C. Lichtenberg)

Keine Schuld ist dringender als die, Dank zu sagen (Cicero)

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei **Katja Becker** und **Heiner Schirmer** für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen, dass der ständige Arbeitsplatzwechsel zwischen Gießen und Heidelberg auch wirklich zu brauchbaren Ergebnissen führt. Weiterhin danke ich für die Freundlichkeit der Aufnahme in die jeweiligen Gruppe und die vorbehaltlose Unterstützung, die mein Projekt erfahren hat.

Ein großer Teil dieser Arbeit wäre niemals ohne die enge Zusammenarbeit mit **Kai Matuschewski** möglich gewesen, der mir mit der Beantwortung zahlloser Fragen stets den weiteren Weg zeigte. Bedanken möchte ich mich insgesamt für die grenzenlosen Unterstützung und Betreuung, die diese Arbeit erst zu dem gemacht haben, was sie ist.

Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei **Stephan Gromer** und **Stefan Rahlfs** bedanken, vor allem für die offenen Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei vielen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt in Gießen **Anette, Marina** und **Elisabeth** und in Heidelberg **Caro, Irene** und **Uschi**, die mich immer dann experimentell unterstützt haben, wenn es am dringendsten nötig war.

Vielen Dank weiterhin für die Hilfsbereitschaft aller vergangener und jetziger Mitarbeiter der **Arbeitsgruppen Becker, Matuschewski** und **Schirmer**, von denen jeder zum Gelingen dieser Arbeit auf seine eigene Weise beigetragen hat.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an **Jürgen, Karin** und **Anthrax Thiel** für ihre Unterstützung und für die schöne, gemeinsame Zeit.

Ebenso gehört ein besonderer Dank **meinen Eltern** für die nicht endende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein besonderer Gedanke gebührt **Geri**, weil es so ist, „[...] als steckten sie im gleichen Kopf und blickten durch die gleichen Augen, so dass er ihr nur etwas zu zeigen brauchte, ohne viel zu sagen.“ (*Jo Nesbø in Das Fünfte Zeichen*)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Akoachère, M.; **Buchholz, K.**; Fischer, E.; Burhenne, J.; Haefeli, W.E.; Schirmer, R.H.; Becker, K. (2005) *In vitro* assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and-resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4592-4597.

Buchholz, K.; Schirmer, R.H.; Eubel, J.K.; Akoachere, M.B.; Dandekar, T.; Becker, K.; Gromer, S. (2008) Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 183-191.

Buchholz, K.*; Comini, M.*; Wissenbach, D; Schirmer, R. H.; Krauth-Siegel, L.; Gromer, S. (2008) Cytotoxic interactions of methylene blue with trypanosomatid-specific disulfide reductases and their dithiol products. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160(1): 65-69.

Buchholz, K.; Rahlfs, S.; Schirmer, R.H.; Becker, K.; Matuschewski, K. (2008) Depletion of *Plasmodium berghei* plasmoredoxin reveals a non-essential role for life cycle progression of the malaria parasite. *PLoS ONE*, 3(6):e2474.

Buchholz, K.; Putrianti, E.D.; Rahlfs, S.; Becker, K.; Schirmer, R.H.; Matuschewski, K. A central role for glutathione reductase in the redox network of the malaria parasite – eingereicht

Buchbeitrag:

Buchholz, K.; Mailu, B.M.; Schirmer, R.H.; Becker, K. (2007) Structure-based drug development against malaria. Bentham Science Publishers, *Frontiers in Drug Design and Discovery* 3: 225-255.

Vorträge:

Buchholz, K.* , Becker, K., Matuschewski, K., Schirmer, R.H.

Validation of glutathione-dependent enzymes as drug targets in antimalarial therapy.

- *1st Scientific Days of Nouna Health Research Centre, Burkina Faso, Africa, 2004.*

Buchholz, K.* , Becker, K., Matuschewski, K., Schirmer, R.H.

Glutathione Reductase of *Plasmodium* as Antimalarial Drug Target.

- *Ph.D. Symposium der Fachbereiche Medizin und Veterinärmedizin der JLU, Gießen, 2005.*

Buchholz, K.* , Becker, K., Schirmer, R.H.

Methylene blue as a bonaria drug against malaria.

- *New Trends in Infectious Disease Research, Second Joint PhD Students Meeting, Heidelberg, 2006.*

Poster:

Buchholz, K., Wissenbach, D., Eubel, J., Akoachère, M.B., Becker, K., Davioud-Charvet, E, Krauth-Siegel, L., Schirmer R.H.

Methylene blue is a turncoat inhibitor of disulfide reductases of *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*.

- *Novel agents against infectious diseases - 1st Symposium of SFB 630, Würzburg, 2006.*

Buchholz, K., Schirmer, R.H., Becker, K., Matuschewski, K.

Functional characterization of *Plasmodium* redox-related enzymes.

- *Molecular Approaches to Malaria, Lorne, Australia, 2008.*

Buchholz, K., Schirmer, R.H., Becker, K., Matuschewski, K.

A central role for glutathione reductase in the redox network of the malaria parasite.

- *Fourth Annual BioMalPar Conference, Heidelberg, 2008.*

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	IV
	Tabellenverzeichnis	V
	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Verbreitung und Bedeutung der Malaria	1
1.1.2	Erreger und Vektoren der Malaria	2
1.1.3	Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	5
1.1.4	Malaria-Modellsysteme	8
1.1.5	Klinik und Pathologie der Malaria	9
1.1.6	Medikamente und Resistenzen bei Malaria	11
1.1.7	Rationale Medikamentenentwicklung gegen Malaria	13
1.2	Redoxstoffwechsel und antioxidative Abwehrsysteme bei <i>Plasmodium</i>	15
1.2.1	Evolutionsbiologische Aspekte	15
1.2.2	Redoxstoffwechsel und Malaria	16
1.2.3	Herkunft reaktiver Sauerstoffspezies in <i>Plasmodium</i> -infizierten Erythrozyten	18
1.2.4	Das Thioredoxin-System	20
1.2.5	Das Glutathion-System	21
1.2.6	Plasmoredoxin	23
1.3	Methylenblau	24
1.4	Zielsetzung der Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Materialien	29
2.1.1	Laboraausstattung	29
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.3	Chemikalien	31
2.1.4	Radioaktiv markierte Substanz	34
2.1.5	Nährmedien	34
2.1.5.1	Bakterienkulturnährmedien	34
2.1.5.2	Zellkulturmedien	34
2.1.6	Antibiotika und Zusätze	35
2.1.7	Moskito- Aufzucht	35
2.1.8	Lösungen und Puffer	36
2.1.9	Pufferlösungen für SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting	36
2.1.10	Verwendete Antikörper, Stämme und Vektoren	37
2.1.10.1	Antikörper	37
2.1.10.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	38
2.1.10.3	Vektoren und Plasmide	38
2.1.11	Genomische DNA	39
2.1.12	Zelllinien	39
2.1.13	Maus- und Ratten-Stämme	39
2.1.14	Moskito-Stämme	40
2.1.15	Enzyme	40
2.1.16	Verwendete Kits	40

2.1.17	Oligonukleotide	41
2.2	Methoden	44
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	44
2.2.1.1	Kultur und Transformation prokaryontischer Zellen	44
2.2.1.1.1	Flüssigkulturen von <i>E. coli</i> -Bakterien	44
2.2.1.1.2	Plattenkulturen	44
2.2.1.1.3	Transformation kompetenter Zellen	44
2.2.1.1.4	Selektion/Identifizierung positiver Klone	45
2.2.1.1.5	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	45
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	46
2.2.2.1	Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	46
2.2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	46
2.2.2.1.2	Alkoholfällung von DNA	46
2.2.2.1.3	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA	47
2.2.2.1.4	Gelelektrophorese von DNA	47
2.2.2.1.5	Sequenzierung	47
2.2.2.1.6	Auswertung von Sequenzen	47
2.2.2.2	<i>in vitro</i> -Modifikation und Rekombination von DNA.....	48
2.2.2.2.1	DNA-Restriktion	48
2.2.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.2.2.3	<i>Real Time</i> -PCR	49
2.2.2.2.4	Dephosphorylierung.....	50
2.2.2.2.5	Gelextraktion	50
2.2.2.2.6	Ligationen.....	50
2.2.2.2.7	Konstruktion der Transfektionsvektoren.....	51
2.2.2.2.8	Genotypisierungen	53
2.2.2.2.9	Konstruktion des <i>Pb</i> Plrx-Überexpressionsvektors	54
2.2.2.3	Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA	54
2.2.2.3.1	mRNA-Isolierung.....	54
2.2.2.3.2	RT (Reverse Transkription)-PCR	54
2.2.3	Zellkulturmethoden.....	55
2.2.3.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	55
2.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl.....	55
2.2.3.3	Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen	56
2.2.4	Methodik <i>Plasmodium berghei</i>	56
2.2.4.1	Mikroskopische Darstellung von <i>P. berghei</i> mittels Giemsa-Färbung.....	56
2.2.4.2	Bestimmung der Parasitämie	57
2.2.4.3	Transfektion von <i>Plasmodium berghei</i>	57
2.2.4.3.1	Vorbereitungen der Transfektionsvektoren	59
2.2.4.3.2	Parasiten-Präparation und <i>in vitro</i> -Kultivierung der Erythrozyten-Stadien.....	59
2.2.4.3.3	Isolation der Schizonten und Elektroporation.....	60
2.2.4.3.4	Parasiten-Selektion	61
2.2.4.4	Blutstabilate.....	62
2.2.4.5	Isolierung von Parasiten aus Blut und Aufbereitung der genomischen DNA	62
2.2.4.6	Klonierung von Parasiten	63
2.2.4.7	Untersuchung der Exflagellation von <i>P. berghei</i> Gametozyten.....	64
2.2.5	Tierexperimentelle Methoden.....	64
2.2.5.1	Anästhesie und Blutentnahme von Ratten und Mäusen	64
2.2.5.2	Applikationsmethoden.....	64
2.2.6	Zellbiologische Methoden	65
2.2.6.1	<i>Anopheles</i> -Moskito Methodik	65

2.2.6.1.1	Bestimmung der Sporozoitenzahl	66
2.2.6.1.2	EEF-Entwicklungsassay mit <i>P. berghei</i> Speicheldrüsen-Sporozoiten	67
2.2.6.1.3	[3H] Hypoxanthin-Test	67
2.2.6.1.4	<i>Plasmodium berghei</i> <i>in vivo</i> Wachstumsvergleichs-Test	69
2.2.7	Proteinbiochemische Methoden.....	69
2.2.7.1	Herstellung und Reinigung von Proteinen.....	69
2.2.7.1.1	Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>Plasmodium berghei</i> -Blutstadien	69
2.2.7.1.2	Herstellung von Proteinrohextrakten.....	70
2.2.7.2	Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose	70
2.2.7.3	Kontrolle mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	71
2.2.7.4	Proteinanalysen	72
2.2.7.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	72
2.2.7.4.2	Immunologischer Proteinnachweis (Western Blot)	73
2.2.7.4.3	Enzymkinetik.....	74
2.2.7.4.4	NAD(P)H Autooxidations-Aktivität der Disulfidreduktasen	75
2.2.7.4.5	MB-Reduktionsaktivität der Disulfidreduktasen.....	76
2.2.7.4.6	GR-Assay.....	76
2.2.7.4.7	TrxR-Assay	77
2.2.7.4.8	Inhibitorstudien an <i>P. falciparum</i> und humanen Disulfidreduktasen	78
3	Ergebnisse.....	80
3.1	Herstellung und Charakterisierung von <i>P. berghei</i> <i>Plrx(-)</i> Parasiten	80
3.1.1	Genotypische Untersuchung der <i>Plrx(-)</i> Parasiten.....	82
3.1.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>Plrx(-)</i> Blutstadien <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	84
3.1.3	Phänotypische Untersuchungen der <i>Plrx(-)</i> Parasiten im Moskito-Vektor	87
3.2	Herstellung und Charakterisierung von <i>P. berghei</i> <i>TrxR(-)</i> Parasiten.....	90
3.2.1	Genotypische Untersuchung der <i>TrxR(-)</i> Parasiten	91
3.2.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>TrxR(-)</i> Parasiten	92
3.3	Glutathionreduktase ist essentiell für erythrozytäre Plasmodien Stadien	95
3.3.1	Trans-Spezies-Komplementation der <i>P. berghei</i> Glutathionreduktase	100
3.4	Charakterisierung des Inhibitors Methylenblau	103
3.4.1	Methylenblau ist ein potenter Inhibitor der <i>P. falciparum</i> Disulfidreduktasen...	103
3.4.2	Methylenblau als Substrat für Disulfidreduktasen	103
4	Diskussion.....	108
4.1	Reverse Genetik bei Plasmodien.....	108
4.2	Depletion von Plasmoredoxin offenbarte eine nicht-essentielle Funktion im Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	111
4.3	Die Glutathionreduktase nimmt eine zentrale Rolle im Redoxnetzwerk des Malariaparasiten ein.....	114
4.4	Molekulare Interaktionen von Methylenblau mit humanen und <i>Plasmodium</i> Disulfidreduktasen.....	117
5	Zusammenfassung	121
6	Summary	123
7	Literaturverzeichnis.....	125

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 : Geographische Verbreitung der Malaria	1
Abb. 1.2: <i>P. falciparum</i> in humanen Erythrozyten	3
Abb. 1.3: Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	6
Abb. 1.4: Übersicht der einzelnen Stufen der rationalen Entwicklung von Medikamenten....	13
Abb. 1.5: Die aktivierten Formen des Sauerstoffs	16
Abb. 1.6: Übersicht redox-aktiver Stoffwechselwege in <i>Plasmodium</i>	20
Abb. 1.7: Strukturformeln von Methylenblau (MB) und LeukoMB.....	25
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Strategien zur Gen-Inaktivierung ..	58
Abb. 2.2: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im <i>P. berghei</i> [3H] Assay	68
Abb. 2.3: Aufbau eines <i>semidry</i> -Blots.....	73
Abb. 3.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Strategien zur Gen-Inaktivierung des <i>P. berghei</i> Plasmoredoxin-Gens	81
Abb. 3.2: Schematische Übersicht über die Depletion des <i>P. berghei</i> Plasmoredoxin-Gens	83
Abb. 3.3.: Charakterisierung der Plasmoredoxin-defizienten Blutstadien Parasiten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	85
Abb. 3.4: Weiterführende <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Charakterisierung der <i>Plrx(-)</i> Parasiten- Population.....	86
Abb. 3.5: Typisches Bewegungsmuster (<i>gliding motility</i>) von Wildtyp (links) und <i>Plrx(-)</i> Sporoziten (rechts)	88
Abb. 3.6: Die Leberstadienentwicklung von <i>Plrx(-)</i> Parasiten (A) ist von der Entwicklung der Wildtyp Parasiten (B) nicht zu unterscheiden.....	89
Abb. 3.7: Schematische Übersicht über die Depletion des <i>P. berghei</i> Thioredoxinreduktase-Gens	92
Abb. 3.8: <i>In vivo</i> Wachstumsvergleichs-Kurven von WT und <i>TrxR(-)</i> Parasiten ohne (A) und mit (B) Behandlung der Mäuse mit Methylenblau.....	93
Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Integrations-Strategie zur Gen-Inaktivierung des <i>Plasmodium</i> Glutathionreduktase-Gens	95
Abb. 3.10: Übersicht der für die Gen-Inaktivierung des Glutathionreduktase-Gens eingesetzten Transfektionsvektoren	97
Abb. 3.11: Der endogene GR-Locus ist prinzipiell für eine Insertion zugänglich.....	99
Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Komplementation des <i>P. berghei</i> GR-Gens mit dem <i>P. falciparum</i> Ortholog	101
Abb. 3.13: Replikation der $\Delta GR::PfGR$ Parasiten unterscheidet sich nicht von der Replikation der WT Parasiten.....	102
Abb. 3.14: Methylenblau als H_2O_2 -produzierender Redoxpendler in <i>P. falciparum</i>	106

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Antikörper mit Angabe der eingesetzten Verdünnungen und Bezugsquellen.....	38
Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide mit genauer Bezeichnung und Sequenz.....	44
Tab. 2.3: Rezept für vier 15%ige SDS-Gele einschließlich der Sammelgele (4%).....	71
Tab. 2.4: Pipettierschema des GR-Assays.....	77
Tab. 2.5: Pipettierschema des TrxR-Assays	78
Tab. 3.1: Depletion von Plasmoredoxin beeinträchtigt nicht den Verlauf des <i>Plasmodium</i> Lebenszyklus	87
Tab. 3.2: Depletion von <i>TrxR</i> beeinträchtigt nicht den Verlauf des <i>Plasmodium</i> Lebenszyklus	94
Tab. 3.3: Übersicht der Strategien zur Erreichung des <i>Plasmodium</i> Glutathionreduktase-Gen-Locus	98
Tab. 3.4: Aktivitäten der als Methylenblau-Reduktasen untersuchten Disulfidreduktasen ..	104

Abkürzungsverzeichnis

μFD	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
α	anti, gegen
A, ΔA	Absorption, Absorptionsdifferenz
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin-Base
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	„copy-DNA“ (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CSP-Protein	Circumsporoziten-Oberflächenprotein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Δ	Delta, Deletion
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dd	doppelt destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythimidintriphosphat
ε	Absorptionskoeffizient [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemolumineszenz)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavin- Adenin- Dinukleotid (oxidiert)
FCS	Fetales Kälberserum
for	<i>forward</i> , in <i>sense</i> Richtung des Gens
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP	„ <i>green fluorescent protein</i> “
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion = γ -Glutamylcysteinylglycin (reduziert)
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiert)
h	Stunde(n)
HepG2/Huh7	Humane Leberzelllinien
IFA	Indirekter Immunfluoreszenz- Assay
IFN	Interferon
IL	Interleukin
k, k _{max}	(maximale) Geschwindigkeitskonstante

kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
K _i , K _M	Inhibitions-, Michaeliskonstante
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> (sog. Luria Bertani- Medium)
m	Meter, Milli- (10 ⁻³)
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. yoelii</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , pH-Wert
<i>Pfu</i>	<i>Pirococcus furiosus</i> DNA-Polymerase
rev	<i>revers</i> , in <i>antisense</i> Richtung des Gens
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
s / sec	Sekunde(n)
SDS	Sodiumlauryldodecylsulfate (Natriumsulfat)
sog.	sogenannte
SD	Sprague-Dawley-Ratten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TPx	Thioredoxinperoxidase
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
U	<i>Unit</i> , biochemische Einheit für die Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
US-Puffer	Ultraschall-Puffer
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumenprozent

Abkürzungsverzeichnis

WT	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsvolumenprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Verbreitung und Bedeutung der Malaria

Malaria zählt zu den bedeutsamsten parasitären Infektionskrankheiten der Welt mit besonderer Verbreitung in den Subtropen und Tropen. In über 100 Ländern Asiens, Afrikas und Südamerikas tritt Malaria endemisch auf; etwa 40% der Weltbevölkerung ist infektionsgefährdet [33]. Abb. 1.1 zeigt die in den letzten 10 Jahren relativ stabil gebliebene Verbreitung der Malaria. Mehr als eine Millionen Menschen sterben jährlich an Malaria, etwa 350 bis 500 Million erkranken klinisch [206]. Die Todesfälle sind zu 90% in Afrika südlich der Sahara zu finden, besonders hoch ist die Mortalität bei Kindern unter 5 Jahren.

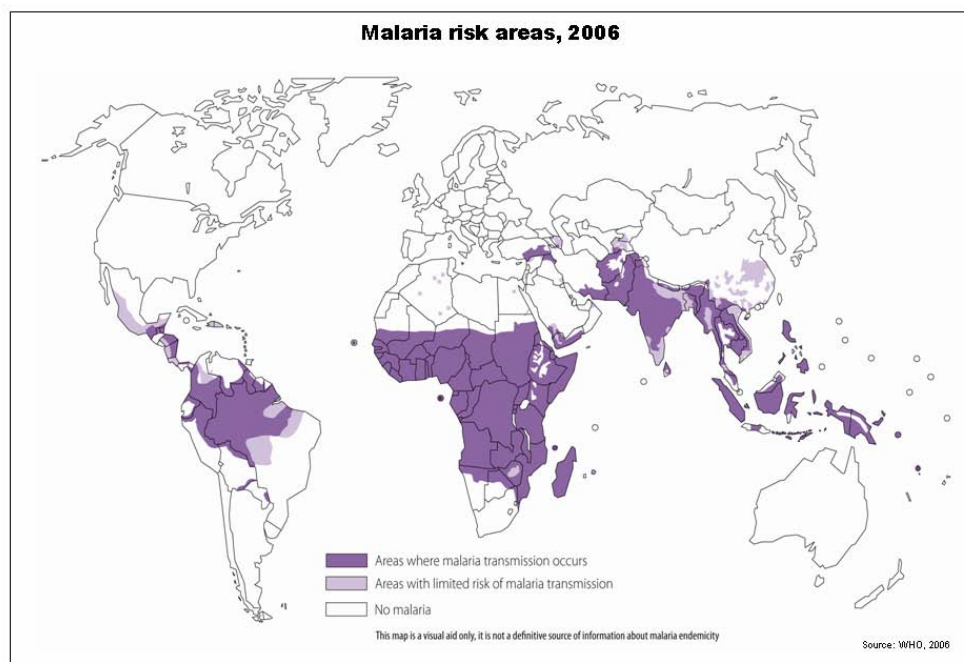


Abb. 1.1 : Geographische Verbreitung der Malaria

Abgesehen von der Gefahr für die Gesundheit der Menschen in den betroffenen Gebieten spielt die Malaria eine wichtige Rolle im wirtschaftlichen, politischen und sozialen Leben. Auf

wirtschaftlicher Ebene fällt auf, dass sich die endemischen Malariagebiete mit den ärmsten Regionen der Welt decken. Malaria behindert die Entwicklung dieser Länder auf unterschiedlichste Weise: Direkt durch eine Veränderung der Arbeitsproduktivität und Kindersterblichkeit, aber auch indirekt durch Beeinflussung von Entscheidungen, z.B. bezogen auf Familienplanung mit Wirkung auf Bevölkerungswachstum, Sparquote und Investitionen [167]. Viele afrikanische Familien geben ein Viertel ihres jährlichen Einkommens für die Behandlung der Malaria aus [65, 206]. Diese wirtschaftlichen Probleme sind messbar; so beträgt in großen Teilen Afrikas der durch Malaria verursachte Verlust auf nationalem Niveau mehr als ein Prozent des Bruttoinlandproduktes [206].

In weiten Teilen der Welt hat in den letzten Jahren eine Zunahme an Malariaerkrankungen stattgefunden [190] trotz globaler Bekämpfungsprogramme wie die WHO-geführte „Roll Back Malaria“-Initiative. Es kann sogar (laut Schätzungen) zu einer Verdopplung der Erkrankungen in den nächsten 20 Jahren kommen [167], falls keine effektiven Gegenmaßnahmen eingeleitet werden.

Die zunehmende Vernetzung der tropischen Länder mit den Industrieländern führt dazu, dass sich die Malaria zu der wichtigsten importierten Tropenkrankheit in Europa entwickelt hat. Nach Angaben der WHO hat sich die Zahl der importierten Malariafälle seit den 70er Jahren verzehnfacht. In drei Viertel der Fälle handelt es sich um die lebensbedrohliche *Malaria tropica*.

1.1.2 Erreger und Vektoren der Malaria

Erreger der Malaria sind einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* (Stamm Apicomplexa, Klasse *Haematozoa*, Ordnung *Coccidida*, Unterordnung *Haemosporididae*, Familie *Plasmodiidae*, Gattung *Plasmodium* [114]). Diese Gattung umfasst über 120 Arten, die Säugetiere, Vögel und Reptilien parasitieren.

Als Mitglieder des Stammes der Apikomplexa sind sie mit einer Vielzahl an parasitischen Protozoen verwandt; Eimerien, Babesien und *Toxoplasma gondii*, der Erreger der Toxoplasmose.

Für den Menschen haben vier, 2-7 µm große, *Plasmodium*-Arten Bedeutung. *Plasmodium falciparum* ist der Verursacher der gefährlichsten humanen Malaria-Form, der *Malaria tropica*. *P. vivax* und *P. ovale* rufen die *Malaria tertiana* hervor mit charakteristischen Fieberschüben alle 48 Stunden. Für die *Malaria quartana* mit einem Fieberrhythmus von 72 Stunden ist *P. malariae* verantwortlich.

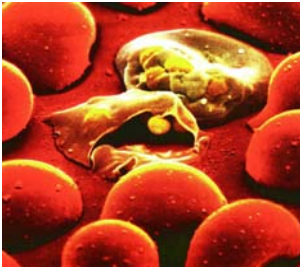


Abb. 1.2: *P. falciparum* in humanen Erythrozyten.

Abb. 1.2 zeigt einen *P. falciparum*-Befall menschlicher Erythrozyten. *P. falciparum* kommt weltweit in den meisten Verbreitungsgebieten der Malaria vor und ist der häufigste Erregertyp in Afrika südlich der Sahara, in Südostasien und im pazifischen Raum.

P. vivax überwiegt in Nordafrika, im vorderen Orient, in Pakistan, Indien, Nepal, Sri Lanka und in Mittelamerika. Jedoch nimmt die Häufigkeit von *P. falciparum* auch in diesen Gebieten zu. Die anderen humanen Malaria-Erreger sind seltener; *P. ovale* tritt vor allem in Westafrika auf und *P. malariae* in West- und Ostafrika sowie in Teilen Indiens.

Erstmals beschrieben wurde der Erreger der Malaria 1880 von dem französischen Militärarzt Charles L.A. Laveran während seines Algerieneinsatzes.

Neben den humanpathogenen Erregern gibt es zahlreiche tierpathogene *Plasmodium*-Arten, wie z.B. *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* und *Plasmodium chabaudi*, die bei Nagetieren Malaria hervorrufen. Bei *Plasmodium gallinaceum* und *Plasmodium relictum* handelt es sich um Erreger der Vogelmalaria. Es existieren mehr als 26 *Plasmodium*-Spezies, die in Primaten parasitieren, darunter *P. simium*, *P. cynomolgi* und *P. knowlesi* welche in der Lage sind, auch beim Menschen zu einer Erkrankung zu führen.

Als übertragende Vektoren dienen den Plasmodien über 60 Mückenarten der Gattung *Anopheles* (Stamm *Arthropoda*, Unterstamm *Tracheata*, Klasse *Insecta*, Unterklasse *Pterygota*, Ordnung *Diptera*, Unterordnung *Nematocera*, Familie *Culicidae*, Gattung *Anopheles*; [185]). Ronald Ross beschrieb 1897 die Übertragung von *Plasmodium* durch *Anopheles*. Von den etwa 350 verschiedenen *Anopheles*-Arten sind nur ca. 45 in der Lage, die Malaria des Menschen zu übertragen, deren effektivste Malaria-Überträger im tropischen Afrika vorkommen. Die Verschiedenheit der *Anopheles*-Spezies hat Auswirkung auf die Verbreitung der Malaria, da aggressivere Mücken zu einer stärkeren Ausbreitung der Krankheit führen [83]. Das Vorkommen dieser Mücken ist nicht auf tropische und subtropische Regionen beschränkt, die weltweite Verbreitung reicht bis in arktische Gebiete. Die Abhängigkeit von der Temperatur bei der Malaria-Übertragung begrenzt sich auf die Geschwindigkeit der Vektorenentwicklung und Reifung der Parasiten in den Mücken [161]. Eine erfolgreiche Ausbreitung ist auch bei Temperaturen unter 16°C möglich; dies zeigte sich

durch belegte Malaria-Fälle zur Zeit der kleinen Eiszeit im englischen Raum [163]. Die epidemiologisch wichtigen Ausbreitungsregionen von *Anopheles*-Mücken decken sich im Wesentlichen mit der Verbreitung der Malaria. *Anopheles*-frei bedeutet in jedem Fall Malaria-frei, umgekehrt ist dies jedoch nicht der Fall. Kehren diese Mücken in potentielle Malariagebiete zurück, kann dies die Erkrankung wieder aufleben lassen. Indien und Sri Lanka sind typische Beispiele. Diese Länder waren durch vorübergehend erfolgreiche *Anopheles*-Bekämpfung für einige Jahre Malaria-frei.

Anopheline Mücken durchlaufen während ihres Lebenszyklus vier Stadien, namentlich Ei-, Larven-, Puppen- und Adultstadium. Nur die weibliche *Anopheles* saugt Blut; damit ist sie wie die meisten anderen Moskitoweibchen eine Stechmücke im eigentlichen Sinne. Die männlichen Mücken ernähren sich von Nektar und anderen Flüssigkeiten. Die Blutmahlzeit der Weibchen ist unerlässlich für die Entwicklung ihrer Eier. Ein Saugakt genügt für die Produktion von ca. 100 Eiern, die nach 2-3 Tagen abgelegt werden. Bei einer durchschnittlichen Lebensdauer von mehreren Wochen kann jede Mücke 1000 und sogar mehr Eier produzieren. Die Eiablage aller Moskitos erfolgt in Wasser, in Sümpfen oder sonstigen stehenden oder leicht fließenden Gewässern, in wasserhaltigen Behältern und Astlöchern. Jede Spezies hat ihre eigene Brutgewohnheit; *Anopheles* legt ihre Eier am liebsten in Dauergewässer mit viel Sonne. Die Eier werden einzeln auf die Wasseroberfläche gelegt und entwickeln sich über das charakteristische Larvenstadium in 10-14 Tagen zur flugfähigen Mücke. Diese Entwicklungszeit vom Ei- bis zum Adultstadium wird vor allem durch die umgebende Temperatur bedingt. Adulte *Anopheles* weisen einen sexuellen Dimorphismus auf, die Weibchen sind deutlich größer als die Männchen und besitzen stechend-saugende Mundwerkzeuge im Vergleich zu den leckend-saugenden der Männchen. Weiterhin fallen bei den Männchen gefederte Antennen auf. Obwohl zu kilometerweiten Flügen fähig, hält sich die anthropophile Mücke bevorzugt in einem relativ kleinen Bereich auf, zumeist in oder nahe menschlichen Behausungen. Wie bei den meisten anderen Spezies stechen die Weibchen der *Anopheles* ausschließlich in der Dämmerung oder nachts und nehmen tagsüber beispielsweise an Zimmerwänden die typische Ruhestellung ein.

Der Versuch, Malaria-Neuinfektionen durch gezielte Bekämpfung der *Anopheles*-Mücke als Überträger zu verhindern, wird als Vektorkontrolle bezeichnet.

In den 50er und 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts schien die Bekämpfung des Vektors mit DDT als wirksamem und bezahlbarem Insektizid – zusammen mit Chloroquin als

Behandlungsstrategie – eine Möglichkeit, der Malaria Einhalt zu gebieten. Zweifel bezüglich ökologischer Folgewirkungen und Nebenwirkungen wurden nicht weiter verfolgt. DDT wurde als wichtiger Bestandteil der Programme zur Ausrottung der Malaria an Innenwänden von Häusern und Wohnungen versprüht. Anfang der 1970er Jahre wurde das Programm trotz anfänglicher Erfolge eingestellt, unter anderem weil sich eine DDT-Resistenz bei den Mücken ausbildete und rasch verbreitete. Nach dem Anwendungsverbot von DDT ermöglichten die übrig gebliebenen Malaria-Gebiete, die Erkrankung erneut weiter zu verbreiten. Heute gilt der Einsatz von DDT in Wohnräumen als vertretbar, da es dem Menschen weniger Schaden zufügt als eine Malaria-Infektion. Eine weitere Strategie zur Verhinderung und Kontrolle der Malaria ist, die Infektionskette zu unterbrechen, also den Kontakt zwischen Mensch und Vektor zu verhindern. Dies geschieht durch Verwendung Insektizid-behandelter Moskitonetze. Somit konnten zwar Infektionen nicht vollständig verhindert werden, sie ließen sich aber reduzieren [78, 141]. Die WHO beziffert den auf die Verwendung Insektizid-behandelter Bettnetze zurückzuführenden Rückgang der Kindersterblichkeit auf 20% und einen Rückgang an Malariaerkrankungen um 50% [206]. Die Verminderung der Zahl an Brutstätten für die Mücken, die gezielte Bekämpfung der Larvenstadien mit chemischen und biologischen Mitteln sowie die Aussetzung steriler oder genetisch modifizierter *Anopheles*-Mücken (*Sterile Insect Technology*) sind weitere Strategien zur Kontrolle von Malaria-Infektionen.

1.1.3 Lebenszyklus von *Plasmodium*

Der Lebenszyklus der Plasmodien verläuft als sexueller Zyklus (Gamogonie) in dem Endwirt, der Überträgermücke *Anopheles*, und als asexueller Zyklus (Schizogonie) im Zwischenwirt Mensch. Abb. 1.3 zeigt die verschiedenen Phasen des komplexen Lebenszyklus von *Plasmodium*.

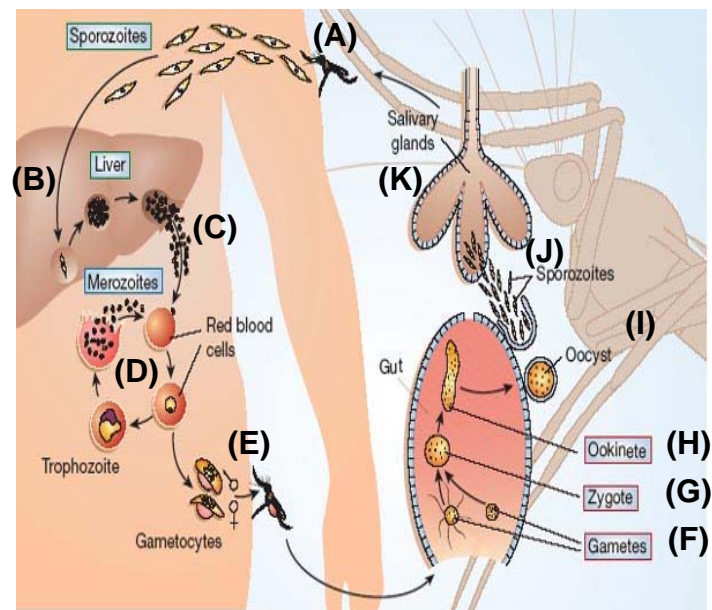


Abb. 1.3: Lebenszyklus von *Plasmodium*

Erklärung der einzelnen Abschnitte im Text. Abb. von Dyann Wirth [164].

Durch den Stich einer infizierten Mücke gelangen die infektiösen Stadien, die Speicheldrüsen-Sporozoiten, in den menschlichen Blutkreislauf (Abb. 1.3 A). Mit dem Blutstrom gelangen die Sporozoiten zur Leber und invadieren die Hepatozyten über das Endothel [62] (Abb. 1.3 B). In der entstehenden parasitophoren Vakuole innerhalb der Hepatozyten findet die erste ungeschlechtliche Teilung (über ein Trophozoitenstadium) der Parasiten durch exoerythrozytäre Schizogonie statt, an dessen Ende Leberschizonten gebildet werden. Die Dauer dieser Phase des Lebenszyklus variiert und reicht von 47-52 Stunden bei *P. berghei* bis zu 6-15 Tagen bei humanpathogenen Plasmodien-Arten. Bei *P. vivax* und *P. ovale* reift nur ein Teil der Leberstadien zu Merozoiten enthaltenden Schizonten, ein weiterer Teil verbleibt als Hypnozoiten ungeteilt im Lebergewebe. Durch noch weitestgehend unbekannte Stimulation reifen diese Ruhestadien zu merozoitenhaltigen Schizonten und verursachen die für Malaria tertiana charakteristischen Rückfälle.

Die reifen Leberschizonten enthalten Tausende von Merozoiten; diese gelangen bei ihrer Freisetzung (Abb. 1.3 C) in die periphere Blutbahn und befallen dort die Erythrozyten (Abb. 1.3 D). In den roten Blutkörperchen entwickeln sich die haploiden Merozoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole [112] über das Ring- und Trophozoiten-Stadium zu reifen Schizonten (erythrozytäre Schizogonie). Das Wachstum der Schizonten führt zur Ruptur der Erythrozyten mit Freisetzung von 8-12 (bei *P. falciparum* bis zu 32) Merozoiten, die wiederum neue rote Blutkörperchen befallen. Das Hämoglobin der Erythrozyten dient den

Plasmodien als Quelle für Aminosäuren, wobei sie das dabei anfallende Nebenprodukt Häm nicht verwerten können. Freiliegend ist dieses Häm toxisch für die Parasiten; aus diesem Grund wird es zu unlöslichem Hämozoin (Malaria-Pigment) polymerisiert und in der Nahrungsvakuole der Parasiten akkumuliert [71]. Die Dauer der erythrozytären Schizogonie variiert bei den unterschiedlichen Plasmodien-Spezies und dauert bei *P. berghei* 22-24 und bei *P. falciparum* ungefähr 48 Stunden. Außerdem ist die Entwicklung der Blutstadien bei *P. berghei* relativ asynchron, so dass alle Stadien zeitgleich im Blut zu finden sind.

In jedem Blutstadien-Zyklus entwickelt sich eine geringe Zahl an Merozoiten zu den sexuellen Geschlechtsformen, den Gametozyten (Abb. 1.3 E). Die Makrogametozyten (weiblich) und Mikrogametozyten (männlich) sind Vorstufen der weiblichen und männlichen Gameten.

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei jedem Blutstadien-Zyklus 5-25% der Parasiten bei *P. berghei* zu sexuellen Stadien differenzieren [133], jedoch ist wenig über den molekularen Mechanismus, den sogenannten Schalter zwischen ungeschlechtlicher Vermehrung und sexueller Differenzierung, bekannt [50]. Dieser relativ fixe Prozentsatz an Zellen, welche sich in sexuelle Stadien differenzieren, ist im Gegensatz zu *P. falciparum* zu sehen, wo sich Perioden reiner asexueller Proliferation mit Phasen erhöhter Gametozyten-Produktion abwechseln. Die Zeitdauer der Entwicklung eines Merozoiten in einen reifen Gametozyt dauert 26-30 Stunden bei *P. berghei* [132, 133] und ist somit kurz, verglichen mit den 8-11 Tagen, den derselbe Vorgang in *P. falciparum* benötigt.

Die reifen Gametozyten werden bei der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles*-Mücke aufgenommen und können sich im Darm der Mücke zu Gameten (Abb. 1.3 F) entwickeln (Gametogenese). Der weibliche Gametozyt differenziert sich zur kugelförmigen Makrogamete, während der männliche Gametozyt durch den Prozess der Exflagellation 4-8 begeißelte Mikrogameten bildet. Die Exflagellation wird durch den Wirtswechsel und die damit verbundenen Veränderungen der Milieubedingungen induziert. Von Bedeutung für die Exflagellation scheinen der Temperaturabfall (von über 5°C), der pH-Anstieg (von 7,3 auf 7,8-8,0) und die Anwesenheit des Gametozyten-Aktivierungs-Faktors Xanthurensäure [21, 181] zu sein. Es handelt sich um einen schnellen Vorgang, der innerhalb von 10-20 Minuten nach Aufnahme der Geschlechtsformen in den Darm der *Anopheles* abgeschlossen ist.

Befruchten die männlichen Gameten die weiblichen, so entwickeln sich die unbeweglichen, diploiden Zygoten (Abb. 1.3 G), die sich zu beweglichen Ookineten (Abb. 1.3 H) weiter differenzieren. Die Entwicklung der Zygote bis zum Ookineten ist in 18-24 Stunden abgeschlossen. Nach Durchdringen der Mitteldarm-Epithelzellen und Festsetzung im

extrazellulären Raum zwischen Epithelium und Basallamina differenzieren sich die Ookineten zu Oozysten (Abb. 1.3 I). Reife, massenhaft Sporozoiten-enthaltende, Oozysten bilden sich durch asexuelle mitotische Teilung. Nach Freisetzung der Mitteldarm-Sporozoiten in das Hämozoel der Mücke gelangen diese zur Speicheldrüse (Abb. 1.3 J), in deren extrazellulärem sekretorischem Raum sie mehrere Wochen persistieren können (Abb. 1.3 K). Mit dem Speichel können sie beim nächsten Stich der *Anopheles*-Mücke in das menschliche Blut gelangen.

1.1.4 Malaria-Modellsysteme

Es gibt viele Spezies von Malariaparasiten, die Säugetiere befallen, und vier beschriebene Arten, die in Westafrika mausartige Nagetiere infizieren. Diese Nagetier-Parasiten haben keine direkte praktische Bedeutung für Menschen oder domestizierte Tiere. Wohl aber dienen Nagetier-pathogene *Plasmodium*-Arten als geeignete Modelle für experimentelle Studien zur Säugetier-Malaria.

Diese *Plasmodium*-Spezies erwiesen sich in den essentiellen Aspekten von Morphologie, der Physiologie und des Lebenszyklus als analog zu den menschen- und primatenpathogenen Malaria-Erregern [35].

Die Einführung der *in vitro*-Kultivierung von Blutstadien des wichtigsten humanen Malaria-Erregers *P. falciparum* 1976 [192, 193] verbesserte entscheidend die Zugänglichkeit der humanen Parasiten für Studien der Malaria-Biologie. Diese Entwicklung war Ausgangspunkt vieler bedeutender, wissenschaftlicher Erkenntnisse mit direkter Relevanz für die Malaria beim Menschen, wie z.B. die Aufklärung molekularer Grundlagen der Resistenzentwicklung gegen Antimalariamittel, antigenetischen Variation und Sequestrierung und Mechanismen der Erythrozyten-Invasion und Proteintransport.

Ungeachtet der Vorteile, die die Untersuchungen humanpathogener *Plasmodium*-Spezies bieten, sind Nagetier-Plasmodien anerkannt als wertvolle Modell-Parasiten für die Erforschung entwicklungsbiologischer Aspekte von Malariaparasiten wie Parasiten-Wirt-Beziehungen, aber auch für Impfstoff- und Medikamentenentwicklung. Vor allem die Pathologie und Biologie von Plasmodien lassen sich mit *in vivo*-Experimenten besser untersuchen.

Als Nachteil der Verwendung von Nagetier-Malariaspezies als Modell für die Erforschung der humanen Erkrankung wird häufig angeführt, dass sich das menschliche Immunsystem von dem der Nager unterscheidet. Auch die Pharmakokinetik von Arzneimitteln verhalte sich unterschiedlich bei Menschen und Mäusen. Auf der anderen Seite besitzen alle Säugetier-

Plasmodien vergleichbare Lebenszyklen, sind sensitiv gegen die gleichen Arzneimittel und ihre Diversität ist analog zu der der vier humanen *Plasmodium*-Spezies. Weitere Vorteile der Nagetier-Plasmodien sind die routinemäßige und ungefährliche Kultivierung des kompletten Lebenszyklus im Labor, die Möglichkeit, *in vivo*-Untersuchungen von Parasiten-Wirt-Beziehungen und Arzneimittel-Tests durchzuführen und alle drei beteiligten Organismen (Mücke, Nager, Parasiten) genetisch zu modifizieren.

Dennoch sind Nagetier-Parasiten und ihre Wirte divergent von humanen Plasmodien und deren Wirt, weshalb Ergebnisse von Nagetier-Malariamodellen sorgfältigen Vergleichen und Bewertungen unterzogen werden müssen, um ihre Relevanz für die menschliche Erkrankung einschätzen zu können.

Häufig wird der Modellorganismus *P. berghei* in der Forschung eingesetzt, der 1948 von Vincke und Lips entdeckt wurde. Der natürliche Wirt dieser Art ist die Nördliche Busch-Klettermaus *Grammomys surdaster* sowie *Praomys jacksoni* und *Leggada bella*, die in Zentralafrika vorkommen. Als natürlicher Vektor dient *Anopheles durenii millecampsii*, im Labor wird jedoch *Anopheles stephensi* verwendet. Neben *P. berghei* gibt es als weitere Erreger der Nagetier-Malaria *P. yoelii*, *P. chabaudi* und *P. vinckei*.

1.1.5 Klinik und Pathologie der Malaria

Der asexuelle, in den Erythrozyten des Menschen ablaufende Zyklus der Plasmodien verursacht alle mit Malaria assoziierten klinischen Symptome und schweren Krankheitsverläufe. Die Sporozoiten-, Leber- und Gametozytenstadien sind asymptomatisch. Die Inkubationszeit der Malaria beträgt je nach Spezies zwischen 7 und 30 Tagen. Die akute Krankheitsphase zeichnet sich durch Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Erbrechen, Muskelschmerzen, Abgeschlagenheit, Schweißausbrüche und Schwindel aus. Besonders das periodisch auftretende, oft hohe Fieber ist bei allen Malariaformen als Hauptsymptom schon seit alters her beschrieben worden („Wechselfieber“). Diese Fieberanfälle treten in Schüben auf, die einem speziesspezifischen Rhythmus folgen und auf der synchronen Vermehrung der Parasiten, einhergehend mit einem synchronen Zugrundegehen der Erythrozyten, basieren. Bei der Malaria tertiana (Zyklusdauer *P. vivax* und *P. ovale* 48 Stunden) stellt sich eine Dreitages-Rhythmik ein, wobei zwischen zwei Fiebertagen ein fieberfreier Tag liegt, während die Malaria quartana einen Viertages-Rhythmus besitzt, der sich mit der Zyklusdauer von 72 Stunden bei *P. malariae* begründet. Die *P. falciparum*-assoziierten Fieberschübe sind aufgrund der asynchronen Vermehrung der Parasiten nicht

regelmäßig (Malaria tropica) [114]. Bei Mischinfektionen treten ebenfalls unregelmäßige Fieberverläufe auf.

Die Pathogenese des Fiebers beruht darauf, dass die mit *Plasmodium* infizierten Erythrozyten bei der Freisetzung der Merozoiten auch Toxine (z. B. Phospholipidglykane, Glycosylphosphatidylinositol (GPI) und akkumuliertes Hämzoin) und Fremdproteine entlassen. Dadurch kommt es zu einer Ausschüttung von Zytokinen, darunter TNF- α , INF- γ und Interleukin 1 (IL-1) aus Makrophagen [107, 123], die hauptsächlich für den Fieberanstieg verantwortlich sind.

Typische Komplikationen bzw. schwere Krankheitsverläufe der *P. falciparum*-Malaria sind Bewusstseinsstörungen, die bis zum Koma reichen können (zerebrale Malaria), Anämien und Hämoglobinurie. Die Lyse der Erythrozyten im *Plasmodium*-Lebenszyklus, ein Abbau infizierter Blutkörperchen in der Milz und eine Herabsetzung der Erythropoese im Knochenmark durch Zytokinfreisetzung (besonders TNF- α) sind die Gründe für die Anämie. Eine *P. falciparum*-Infektion kann einige Tage nach Beginn der Blutschizogonie ohne rechtzeitige Therapie bei 15-20% der nichtimmunen Erkrankten zum Tode führen [102].

Das Grundphänomen der *P. falciparum* Malaria-Pathologie ist eine hämostasiologische Erscheinung; die infizierten Erythrozyten können an das Endothel kleiner Gefäße binden. Die Parasiten produzieren im Trophozoitenstadium Proteine, wie zum Beispiel PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1), welches die Adhäsion bewirkt [12, 182, 186]; dies geschieht durch Interaktion von PfEMP1 mit Rezeptoren der Blutgefäß-Endothelzellen – wie z.B. CD36, Chondroitin-4-Sulfat (CSA) und ICAM-1 – in unterschiedlichen Organen [43, 130]. Diese Sequestrierung kann in Blutgefäßen von Gehirn, Lunge, Herz, Leber, subkutanem Gewebe und Plazenta [130] erfolgen und verhindert die Eliminierung infizierter Erythrozyten aus dem zirkulierenden Blut durch die Milz. Weiterhin können infizierte Erythrozyten an nichtinfizierte Blutkörperchen binden (*rosetting*) [201].

Zytoadhäsion und Rosettenbildung führen zu gestörter Mikrozirkulation durch Verlegung von Kapillaren, damit zu lokalem Sauerstoff- und Nährstoffmangel und nachfolgender Zellschädigung.

Das Ausmaß der Sequestrierung in den einzelnen Organen wird durch unterschiedliche klinische Symptome reflektiert, so erfolgt bei der zerebralen Malaria vorwiegend eine Sequestrierung im Gehirn [20], bei maternaler Malaria hingegen besonders in der Plazenta bei der ersten durch Malaria komplizierten Schwangerschaft [6].

Die anderen *Plasmodium*-Arten sind nicht in der Lage, am Endothel zu haften, somit erklärt sich die geringere Zahl an Durchblutungsstörungen und somit die geringere Gefährlichkeit.

1.1.6 Medikamente und Resistenzen bei Malaria

Chinin war der erste effektive Wirkstoff gegen *P. falciparum*-Malaria und wurde seit dem 17. Jahrhundert in der Therapie dieser Erkrankung genutzt. Es war das Antimalariamittel der Wahl, bis in den 40er Jahren andere Mittel vermehrt eingesetzt wurden. Zwar wurden bereits 1910 Resistenzen gegen Chinin dokumentiert [143], die jedoch nicht hochgradig waren und den Gebrauch nicht einschränkten. Von den 50er Jahren an wurden die 4-Aminochinoline Chloroquin und in deutlich geringeren Ausmaß Amodiaquin die weltweiten Behandlungswirkstoffe der Wahl für jede Form der Malariaerkrankung. Pyrimethamin (entdeckt 1952) wurde zur Behandlung, Chloroquin, Pyrimethamin und Proguanil wurden zur Prophylaxe eingesetzt. Primaquin wurde zur Verhütung von *P. vivax*- und *P. ovale*-Rückfällen angewendet. Dies war der Höhepunkt der Malaria-Ausrottungs-Ära [153], und mit dem gewaltigen Erfolg in Europa und vielen städtischen Regionen der Tropen nahm das Interesse an der Entwicklung neuer Antimalariamittel rasch ab.

Die Ausrottung der Malaria in den Tropen wurde jedoch verfehlt und in den 60er Jahren tauchten Resistenzen gegen Antimalariamittel als Hauptbedrohung auf. Kurz nach der Einsetzung des Chloroquins kam es nahezu zeitgleich zu Resistenzen in endemischen Malaria-Regionen entlang der thailändischen Grenze, in Kolumbien und Venezuela [205, 215]. Die resistenten Parasiten griffen zwischen 1960 und 1970 auf Südamerika, Südostasien und Indien über und erreichten Ende der 70er Jahre Ostafrika. Heute sind nur einige wenige Länder der Tropen davon frei, der Anteil resistenter Parasiten-Stämme liegt in den betroffenen Ländern oft bei 90%. Chloroquin-Resistenzen bei *P. vivax* wurden Ende der 80er Jahre ebenfalls entdeckt.

Über Resistenzen gegen Pyrimethamin, das im Kombinationspräparat Sulfadoxin/Pyrimethamin enthalten ist, wurden seit Ende der 70er Jahre berichtet.

Südost-Asien, besonders Kambodscha und Thailand, hatten von jeher die meisten Arzneimittel-resistenten Malaria-Parasiten und das Geschehen dort diente als Vorbote der Resistenzentwicklung in anderen Teilen der Welt. 1984 ersetzte Mefloquin als Behandlungswirkstoff der Wahl gegen *P. falciparum*-Malaria in Thailand das Chinin. Es war das erste Land, welches Mefloquin weitverbreitet einsetzte. Der Einsatz in Kombination mit Sulfadoxin und Pyrimethamin sollte die Entwicklung von Resistenzen verzögern. Trotzdem wurden bereits seit 1988 Resistenzen in Thailand [59, 147] und im angrenzenden Kambodscha,

Westburma und später Vietnam berichtet. 1994 erreichte die Mefloquin-Resistenz Höchststände und an der Westgrenze von Thailand wurde die Kombination von Artesunat mit hohen Dosen Mefloquin eingeführt. Trotz der hohen *P. falciparum*-Resistenz gegen Mefloquin erwies sich diese Kombination als sehr effektiv. In den nachfolgenden sieben Jahren lag die Heilungsrate bei über 95% und die Inzidenz von *P. falciparum*-Malaria ging deutlich zurück. Diese Erfolge und der dramatische Rückgang der Malaria-assoziierten Mortalität zusammen mit der Artemisinin-Entwicklung in Vietnam führten zur globalen Initiative, Antimalaria-Kombinationen auf der Basis von Artemisinin-Derivaten, einzusetzen. Diese Kombinationen haben sich als sicher und effektiv bewährt; heute gilt es als allgemein anerkannt, dass solche Kombinationen die existierenden Monotherapien in der Behandlung der Malaria ersetzen sollen, um nachhaltige Effektivität zu sichern und aufkommenden Resistenzen vorzubeugen. Dies ist ein zentraler Punkt bei der „Roll Back Malaria“-Initiative. Artemisinin-basierte Kombinationstherapien (*Artemisinin-based combination therapies*, ACTs) sind als akzeptierte, momentan beste Behandlung unkomplizierter *P. falciparum*-Malaria in den WHO Richtlinien enthalten [207]. Seit Ende 2004 empfehlen 42 Länder ACTs als Therapeutika der ersten Wahl [206]. Aber auch gegen diese zurzeit effektivsten Antimalariamittel wurde bereits Resistenzentwicklung beobachtet. Genetisch stabile und übertragbare Artemisinin- und Artesunat-resistente Parasiten ließen sich im Labor erzeugen [1]; *in vitro*-Resistenz von *P. falciparum*-Feldisolaten gegen Artemether konnte ebenfalls nachgewiesen werden [88].

Die hier umrissene Problematik der Behandlung von Malariaerkrankungen wird durch die fehlende Möglichkeit einer vollständig schützenden Immunisierung verschlimmert. Ansätze zur Herstellung einer Malaria-Impfung basieren entweder auf einer Immunisierung mit stadienspezifischen Antigenen oder auf der Verwendung attenuierter Parasiten. Für das erst genannte befinden sich einige Substanzen in klinischen Studien in endemischen Regionen. Darunter ist RTS,S, ein Impfstoff, der auf einem prä-erythrozytären Antigen basiert und in der Lage ist, bei Kindern einen partiellen Schutz vor *P. falciparum*-Infektion zu erreichen [4, 5]. Im Hinblick auf attenuierte Parasiten ermöglichen genetisch modifizierte Plasmodien im Mausmodell [135] neue Ansatzpunkte für die Entwicklung eines Impfstoffs gegen Malaria [203].

1.1.7 Rationale Medikamentenentwicklung gegen Malaria

Die meisten der heute gebräuchlichen Antimalariamittel sind Abkömmlinge traditioneller Heilmittel. Die Wirkgruppe der Chinoline (z.B. Chloroquin) hat ihren Ursprung in Chinin, einer Substanz der aus Südamerika stammenden Chinona-Rinde. Artemisinin entstammt der chinesischen Beifußart Qinghaosu (*Artemisia annua*). Extrakte dieser Pflanzen wurden in der medizinischen Praxis in China seit über zwei Jahrtausenden eingesetzt. Diese traditionellen Ansätze basierten auf sorgfältigen ärztlichen und tierärztlichen Beobachtungen. Bis heute werden natürlich vorkommende Wirkstoffe gegen Malaria gefunden, wie beispielsweise das Gewürz Curcumin [162].

Heute zieht man allerdings die rationale Medikamentenentwicklung vor, die ein gezielteres Vorgehen zur Bekämpfung spezifischer Erkrankungen ermöglicht. Der allgemeine Ablauf dieses Prozesses ist in Abb. 1.4 schematisch dargestellt.

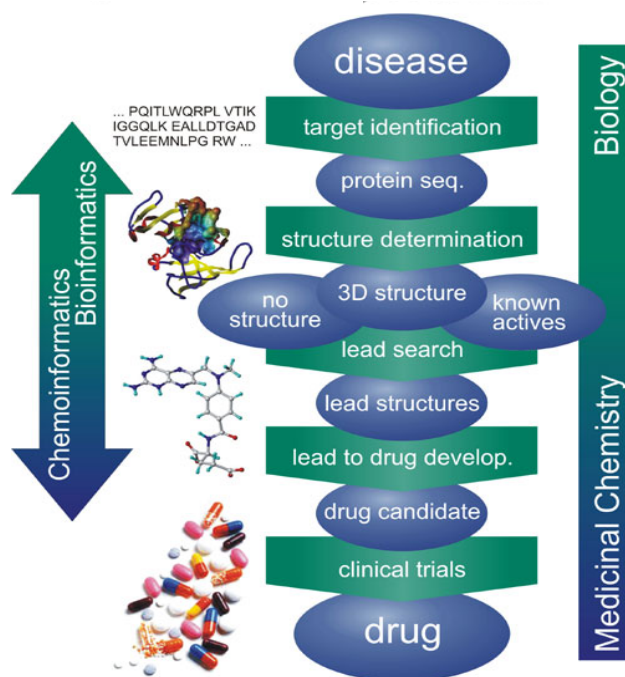


Abb. 1.4: Übersicht der einzelnen Stufen der rationalen Entwicklung von Medikamenten
Erklärungen im Text, Quelle der Abbildung: <http://www.biosolveit.de/science>.

Am Beginn der Entwicklung neuer Medikamente steht die Identifizierung der Strukturen, welche als *drug target* dienen sollen (*target identification*). Hierbei kann es sich um bestimmte Proteine, wie z.B. Enzyme bestimmter Stoffwechselwege, handeln. Sobald ein Protein als möglicher Angriffspunkt von Wirkstoffen identifiziert ist, werden zusätzliche Informationen zur Verifizierung dieses *targets* benötigt. Es sollte während der relevanten

Lebensstadien der Parasiten exprimiert sein und seine Aktivität in diesen Stadien muss essentiell für das Überleben oder die Replikation der Parasiten sein [214]. Dieser Schritt der Bestätigung eines viel versprechenden *drug targets* ist einer der wichtigsten Schritte bei der rationalen Medikamentenentwicklung, da er erlaubt, sich auf für den Parasiten essentielle Moleküle zu beschränken; somit lassen sich die nachfolgenden, sehr kosten- und zeitintensiven Prozesse auf viel versprechende *targets* fokussieren. Diese Targetvalidierung kann z.B. mit den Techniken reverser Genetik unter Anwendung stabiler Gen-Inaktivierung (*knock out*) erfolgen.

Solche identifizierten und bestätigten Moleküle werden nachfolgend auf molekularer Ebene charakterisiert. Aus der chemischen und räumlichen Struktur beteiligter Moleküle lässt sich erkennen, wie eine wirksame Substanz aussehen könnte. Durch Synthese neuartiger Verbindungen oder Testung bereits erhältlicher Verbindungen können sogenannte Leit-Verbindungen (*lead structures*) an den definierten Angriffspunkten getestet werden. Optimierung dieser Verbindungen kann zu Wirkstoffen führen, welche in tierexperimentellen und schließlich klinischen Studien ihre Wirksamkeit bei Patienten beweisen müssen. Am Ende dieses langwierigen und kostspieligen Prozesses steht ein neuentwickeltes Medikament. Nur eine von 10.000 geprüften Substanzen erreicht am Ende den Patienten, bis zu diesem Punkt vergehen 10-15 Jahre; im Durchschnitt kostet ein auf den Markt gebrachtes Medikament Millionen bis Milliarden Dollar (aus einem Vortrag von Dr. Humer, Firma Hoffman-La Roche AG, 2006).

Besonders gut eignen sich Moleküle als *drug targets*, die spezifisch im Parasiten vorkommen; allerdings können auch Angriffspunkte mit Wirtszell-Homologie als Zielmoleküle dienen, sofern sie spezifische Unterschiede bei Wirt und Parasit aufweisen [72, 80]. Solche Vertreter sind im Fall von *Plasmodium* Parasiten für zahlreiche Stoffwechselwege beschrieben [17].

Selbst bei vergleichbarer Wirkung eines Inhibitors auf Plasmodien- und Wirtsenzyme ist eine Nutzung nicht ausgeschlossen: Eine Verbindung kann zusätzlich parasitenspezifisch wirken durch unterschiedliche Aufnahme in humane oder Parasiten-Zellen, durch spezifische intrazelluläre Bindung oder durch verschieden schnellen Ersatz der gehemmten Enzyme, so dass nur das parasitäre System einen Versorgungsengpass erfährt [72].

Viel versprechende *drug targets* in der Entwicklung neuer Antimalaria-Wirkstoffe sind neben Enzymen des Energiemetabolismus, der Synthese von Cofaktoren und prosthetische Gruppen, der Proteinmodifikation, der GPI-Biosynthese, des Lipidmetabolismus, der

Replikation und Transkription sowie des Hämoglobin-Abbaus auch die Enzyme der parasitenspezifischen antioxidativen Abwehr (Übersichtsartikel: [31, 160, 214]).

1.2 Redoxstoffwechsel und antioxidative Abwehrsysteme bei *Plasmodium*

Den Redoxstoffwechsel als potentiell *target* in der Entwicklung neuer Arzneimittel einzusetzen, ist nicht nur bei Plasmodien ein viel versprechender Ansatz. Redox-assoziierte Stoffwechselwege stellen potentielle Ansatzpunkte sowohl bei der Krebstherapie als auch bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten dar. Unter diesem Aspekt untersuchte Parasiten umfassen, zusätzlich zu *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii* [47] (Gruppe der Apikomplexa) sowie die zur Ordnung der Kinetoplastida zählenden Leishmanien und Trypanosomen [100, 138, 158], auch parasitische Würmer wie Cestoden, Schistosomen, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis* und *Dirofilaria immitis* [158, 168, 177].

Allgemein sind Redoxreaktionen chemische Reaktionen, wobei einer der Reaktionspartner (Elektronendonator) Elektronen auf den anderen überträgt (Elektronenakzeptor). In biochemischen Systemen werden diese Reaktionen häufig enzymatisch von Oxidoreduktasen katalysiert, die in vielen Bereichen des Metabolismus involviert sind.

1.2.1 Evolutionsbiologische Aspekte

Bei der Entstehung des Lebens vor 3,5-4 Milliarden Jahren herrschte eine reduzierende, sulfidreiche und sauerstofffreie Atmosphäre. Die Entwicklung der Photosynthese mit Wasser als Elektronen- und Protonendonator vor ungefähr 2,3 Milliarden Jahren führte zur Freisetzung von Sauerstoff, wobei die Weltmeere bis vor 0,6 Milliarden Jahren weiterhin sulfidreich und sauerstoffarm blieben, so dass dieser Zeitabschnitt der Eukaryonten-Evolution unter reduzierenden Bedingungen stattgefunden hat [120]. Somit war genügend Zeit, für Mechanismen und Strategien, um Sauerstoff zur Energiegewinnung unter Erhaltung des reduzierenden intrazellulären Milieus auch unter aeroben Bedingungen nutzbar zu machen. Zahlreiche Mechanismen zur Konservierung des reduzierenden Zustandes innerhalb der Zelle sind bekannt und umfassen neben nichtenzymatischen niedermolekularen Antioxidantien auch Enzyme [85, 179].

Solche Abwehrsysteme werden benötigt, da der positive Effekt der aeroben Lebensweise, die zelluläre Energiegewinnung, mit potentiell schädigenden Nebenwirkungen einhergeht. Verschiedene, höchst instabile und reaktive Sauerstoff-assoziierte freie Radikale und andere Sauerstoffverbindungen (Reaktive Sauerstoffspezies, ROS) entwickeln sich während des

Sauerstoff-Metabolismus und des Ablaufens oxidativer Prozesse in lebenden Zellen; diese beinhalten neben Singulett-Sauerstoff die bei der Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser auftretenden Zwischenprodukte: Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}) (Abb. 1.5).

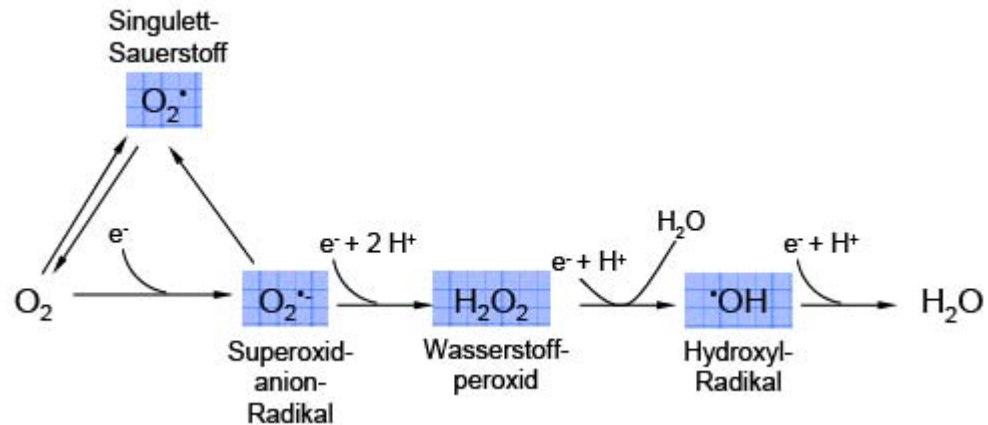


Abb. 1.5: Die aktivierten Formen des Sauerstoffs

Dargestellt sind die Formen, die nach Aufnahme eines Elektrons durch Anlagerung von Protonen entstehen.

Durch ROS verursachte Schäden innerhalb der Zelle können Enzyminaktivierung [183], Veränderungen der Nukleinsäuren [118] und Lipidmembranen durch Lipidperoxidation [169, 199] sein. Diese Schäden können in der Regel durch zelleigene Reparatursysteme behoben werden. Ist das Fließgleichgewicht der Entstehung und Entgiftung der ROS gestört, kommt es zu einem vermehrten Auftreten von ROS-assoziierten Schäden, ein Zustand, der als oxidativer Stress bezeichnet wird [178]. Dieser kann durch eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und/oder eine verminderte Detoxifizierung derselben entstehen [179].

Reaktive Sauerstoff- und auch Stickstoffspezies besitzen allerdings auch physiologische Wirkungen als Mediatoren und in der Immunabwehr [108]. Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) wird durch eine eigene Synthese in vielen Zellen als auto- oder parakriner Mediator gebildet und löst Signaltransduktionsprozesse aus [27]. Bei Entzündungsprozessen oder durch Kontakt von Phagozyten mit Pathogenen werden vermehrt ROS gebildet (*respiratory burst*), die einer Bekämpfung der Pathogene dienen.

1.2.2 Redoxstoffwechsel und Malaria

Die Enzyme des *Plasmodium*-Redoxstoffwechsels als *drug targets* für die rationale Entwicklung neuer Medikamente gegen Malaria zu verwenden, basiert auf der Überlegung, die parasitären Abwehrmechanismen gegen den oxidativen Angriff durch das

wirtsspezifische angeborene Immunsystem zu schwächen. Dies kann durch Entwicklung spezifischer Enzym-Inhibitoren erreicht werden, welche die antioxidative Abwehr der Parasiten lähmen [32, 101] wobei die optimale Effizienz bei Inhibitoren gegen zentrale, in der Redox-Kaskade stromaufwärts fungierende Komponenten erwartet wird [87]. Dieser Ansatz wird gestützt durch die Beobachtung, dass eine limitierte Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH – vorkommend bei Glukose-6-phosphat-dehydrogenase-Mangel des Menschen –, Schutz vor Malaria verleiht. Diese Beobachtung weist daraufhin, dass Malaria-Parasiten in hohem Maße empfindlich für oxidativen Stress sind.

Beim Glukose-6-phosphat-dehydrogenase-Mangel des Menschen (G6PD-Mangel) handelt es sich um einen angeborenen Mangel des Enzyms durch Mutation des G6PD-Gens auf dem X-Chromosom. Die normale Funktion dieses Enzyms liegt im Zuckerstoffwechsel (Pentosephosphat-Zyklus oder Hexosemonophosphat-Weg) in der Umwandlung von Glucose-6-phosphat zu D-glucono-1,5-lakton-6-phosphat unter Umsetzung von NADP^+ zu NADPH. Das so entstandene NADPH wird durch das Enzym Glutathionreduktase als Cofaktor weiter verwendet, ein Enzym, welches für die ständige Bereitstellung des wichtigsten intrazellulären Antioxidants, des Glutathions, sorgt. G6PD wird somit für ein Recycling von NADP^+ zu NADPH benötigt, wodurch Glutathion in seinen reduzierten, antioxidativ wirksamen Zustand gebracht wird. Somit ist G6PD für die Aufrechterhaltung der antioxidativen Kapazitäten im Menschen, aber auch in *Plasmodium* mit verantwortlich, da die Parasiten NADPH der Wirtszelle für die eigene antioxidative Abwehr nutzen [52]. Im Erythrozyten bietet der Pentosephosphat-Zyklus die einzige Quelle der NADPH-Bildung.

Bei G6PD-Mangel reichen die Auswirkungen beim Menschen von Beschwerdefreiheit bis zur lebensbedrohlichen, hämolytischen Krise. Alle Varianten zusammenfassend, kommt diese Erkrankung weltweit bei etwa 200 Millionen Menschen vor, vorwiegend in geographischen Regionen, in denen Malaria endemisch ist oder war, so dass auf eine Coevolution beider Erkrankungen geschlossen werden kann. Diese Verteilung stellt einen balancierten Polymorphismus dar; dies bedeutet, dass die relative Resistenz betroffener Frauen gegenüber Malaria-Infektionen unter Gesichtspunkten der Evolution den Nachteil der Empfindlichkeit der Männer aufwiegt (schwere Verlaufsformen fast ausschließlich bei Jungen und Männern). J.B.S. Haldane stellte zuerst die Hypothese auf, dass Malaria einen Selektionsdruck darstellt, der das Überleben bestimmter genetischer Modifikationen sichert, die sonst für den Menschen unvorteilhaft sind [79]. Dieses Konzept wurde von vielen Autoren aufgegriffen und diskutiert [10, 18, 84].

1.2.3 Herkunft reaktiver Sauerstoffspezies in *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten

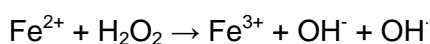
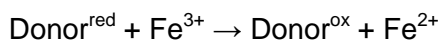
Plasmodien sind besonders anfällig für oxidativen Stress während der erythrozytären Phase des Lebenszyklus [18, 84, 138]. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass in Erythrozyten ein pro-oxidatives Umfeld mit hohen Konzentrationen an Sauerstoff und Eisen vorliegt. Die hohe Konzentration an freiem O₂ in Erythrozyten beruht nicht auf der Anwesenheit von Hämoglobin, sondern der Abwesenheit von Mitochondrien.

Der oxidative Stress in *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten entsteht vor allem durch den Abbau von Hämoglobin durch die Parasiten [9]. Hämoglobin besteht aus vier Globin-Untereinheiten, wobei jede ein eisenhaltiges (Fe²⁺) Protoporphyrin, das Häm, als prosthetische Gruppe trägt. Während ihrer intraerythrozytären Lebensphase verdauen die Plasmodien 60-80% des erythrozytären Hämoglobins [18, 54, 60]. Der Hämoglobin-Abbau repräsentiert eine essentielle Bezugsquelle von Aminosäuren für den Parasiten (durch Hydrolyse des Globin-Anteils), er erzeugt genügend Raum für das Wachstum der Parasiten und unterstützt die osmotische Integrität der infizierten Zelle [110].

Der Hämoglobin-Abbau beginnt mit dem Import erythrozytären Hämoglobin-enthaltenden Zytosols in ein spezielles parasitäres Kompartiment, die Nahrungsvakuole. Dort herrscht ein saures Milieu mit pH-Werten zwischen 5,0 und 5,4 [105]. Die dabei stattfindende Ansäuerung des Erythrozyten-Lysats führt zu einer drastischen Erhöhung der spontanen Umwandlung von Hämoglobin (Fe²⁺) zu Methämoglobin (Fe³⁺) [9]. Die spontane Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin geht mit der Erzeugung von Superoxid-Anionen einher [131]; dies folgt der Gleichung:



Die meisten dieser Anionen können spontan zu H₂O₂ reagieren (2 O₂^{·-} → H₂O₂ + O₂) [9]; eine Reaktion, welche zusätzlich Enzym-katalysiert durch die Superoxid-Dismutase (SOD) vorkommen kann (2 O₂^{·-} + 2 H⁺ → H₂O₂ + O₂). H₂O₂ reagiert nach der Fenton-Gleichung in Anwesenheit katalytischer Mengen von nicht-proteingebundenem Fe²⁺ (ebenfalls freigesetzt durch angesäuertes Hämoglobin) zum sehr reaktiven Hydroxyl-Radikal OH[·]. Die Reaktionsgleichungen der Fenton-Reaktion *in vivo* unter Einbeziehung von Zellmembran- oder Enzym-Schäden – diese zellulären Komponenten erleiden infolge des Fehlens von DNA in humanen Erythrozyten die Hauptschädigungen – lauten:



OH^\cdot + Zellmembran, Enzyme \rightarrow H_2O + Zellmembran-, Enzym-Schädigung.

Der Hämoglobin-Abbau beginnt bereits im frühen Ringstadium und setzt sich bis zum Schizontenstadium fort. Die höchste Aktivität zeigt sich jedoch im Trophozoitenstadium (6-12 Stunden, bei *P. falciparum*) [213].

Das beim Hämoglobin-Abbau freiwerdende Häm lysiert die Parasiten [150] und kann nicht weiter abgebaut werden [51], sondern wird durch Inkorporation in eine inerte, kristalline Substanz, das sogenannte Hämozoin, detoxifiziert. Hämozoin besteht aus polymerisiertem Häm in Form von β -Häm. Dies ist ein nicht kovalenter Komplex, in dem der Fe-Rest jeder Häm-Untereinheit an die Carboxyl-Seitenkette des angrenzenden Häm-Moleküls gebunden ist [152]. Studien mit *P. berghei* legen den Schluss nahe, dass die Parasiten zusätzlich freies Häm exportieren können, da der totale Häm-Gehalt (Hämoglobin, Hämozoin und freies Häm) in *P. berghei*-infizierten Erythrozyten nur die Hälfte des Gehalts nichtinfizierter Erythrozyten beträgt [210].

Geringe Mengen an freien Eisen-Ionen werden vom Häm in den sauren Vakuolen-Inhalt abgegeben [64]; dieses freie Eisen wird von *Plasmodium* für den eigenen Stoffwechsel genutzt. Das Vorhandensein von freiem Eisen und Sauerstoff kann über die oben genannte Fenton-Reaktion zur Entwicklung von OH-Radikalen führen.

Eine gesteigerte ROS-Produktion in parasitierten Erythrozyten ist weiterhin auf andere Stoffwechselwege zurückzuführen: Das schnelle Wachstum und die hohe Proliferationsrate der Plasmodien bedingen eine hohe Generierung von ROS als unvermeidbaren Zwischenprodukten des Sauerstoff-Metabolismus (siehe Abb. 1.5 und dazugehöriger Text). Selbst der Stoffwechsel der erythrozytären Wirtszelle ist davon betroffen; so ist der Glucoseverbrauch – und damit die Methylglyoxal-Produktion – in parasitierten im Vergleich zu nichtparasitierten roten Blutkörperchen bis zu 78fach erhöht [10]. Zudem gibt es die Hypothese, dass durch das Immunsystem gebildete ROS die Malaria-Parasiten zusätzlich schädigen können [18, 74].

Die Einleitung konzentriert sich im weiteren Verlauf auf Stoffwechselwege bei Plasmodien, die den zellulären NADPH-Stoffwechsel mit dem Thiolstoffwechsel verbinden und somit an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind. Das Wissen über das enzymatische Netzwerk, welches in der antioxidativen Abwehr und Redox-Regulation involviert ist, wurde in den letzten Jahren durch zahlreiche Untersuchungen erweitert [16, 18, 19, 139]. Die zentralen Stützen dieses Netzwerks bilden das Thioredoxin- und das

Glutathion-System (Abb. 1.6); diese Systeme werden nachfolgend detailliert beschrieben und ihre Eignung als potentielle *drug targets* dargelegt.

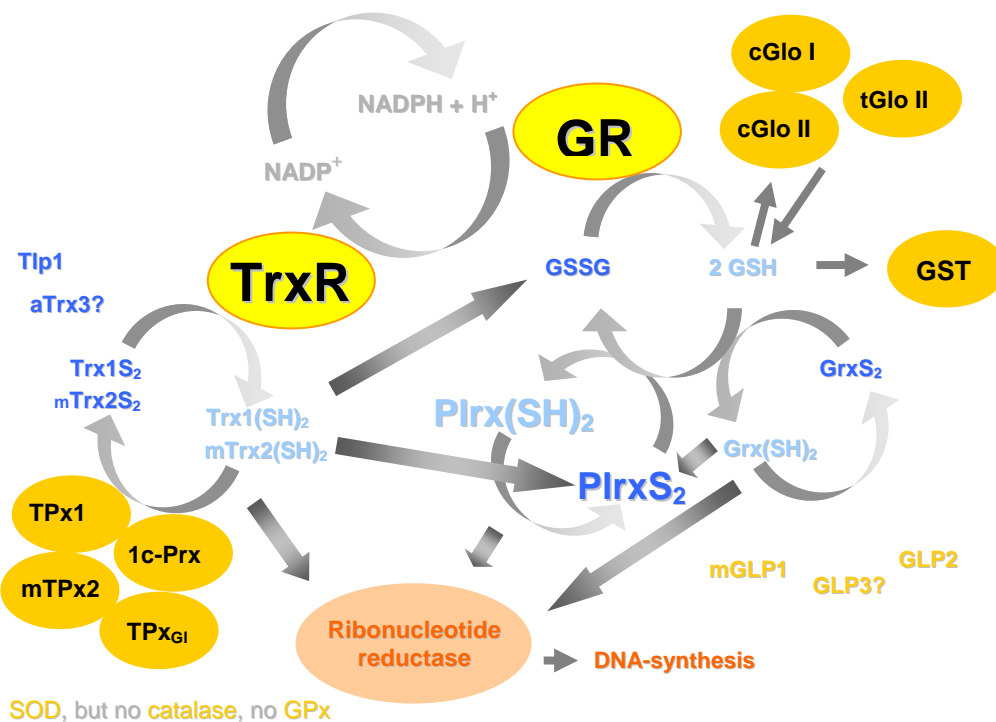


Abb. 1.6: Übersicht redox-aktiver Stoffwechselwege in Plasmodium

Modifiziert nach [160]. Erklärungen und Abkürzungen im Text; gelbe/orange Kreise zeigen enzymatische Komponenten an, blaue Schriftzüge sind nichtenzymatische Komponenten, wobei hellblau reduzierte Protein-Form und dunkelblau oxidierte Form bedeuten. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine Thioredoxinreduktase (TrxR), Glutathionreduktase (GR) und Plasmoredoxin (Plrx) sind vergrößert hervorgehoben.

1.2.4 Das Thioredoxin-System

Dieses System ist eines der zwei zentralen Systeme des Redoxstoffwechsels [18, 76, 139, 158]. Es besteht aus dem Elektronendonator NADPH, dem Flavoprotein Thioredoxinreduktase (TrxR) [76, 209], seinem Substrat Thioredoxin (Trx, 12 kDa) [159, 200] sowie weiteren Redoxpartnern, die mit reduziertem Trx reagieren können. Zu diesen Partnern zählen die Ribonucleotidreduktase und verschiedene Peroxiredoxine (Prx) [58, 76, 158, 211]. Die TrxR zählt zur Gruppe der FAD-abhängigen Cystein-Oxidoreduktasen, die bei Redox-Reaktionen den Elektronentransfer zwischen Pyridinnucleotiden (in diesem Fall von NADPH) und Disulfidsubstraten (in diesem Fall Trx) katalysieren. Thioredoxin trägt in seinem aktiven Zentrum die Sequenz C-X-X-C, die für die Elektronenübertragung verantwortlich ist. Die beiden Cystein-Gruppen können zwei verschiedene Redox-Zustände annehmen: beim oxidierten Trx sind die Cystein-Reste zu einer Disulfidbrücke verknüpft, reduziert liegen im

Protein zwei Thiol-Gruppen (SH-) vor. Thioredoxin überträgt die Elektronen auf die Ribonukleotidreduktase [81, 82] oder Thioredoxin-abhängige Peroxidasen [37, 94] und ist somit sowohl in der DNA-Synthese als auch in die Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies involviert. Weitere Funktionen des Trx-Systems sind die Regulation der Genexpression durch Reduktion von Transkriptions-Faktoren und die Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen [76, 137, 158].

Die *PfTrxR* wurde im Detail charakterisiert, einschließlich der verschiedenen Schritte des Elektronentransfers und der Funktionen der Aminosäurereste innerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms [122, 139, 209]. Die Tatsache, dass *PfTrxR* nicht Selen-abhängig ist und sich im Motiv des C-terminalen aktiven Zentrums (CGGGKC) von der humanen TrxR (Cys-Sec) unterscheidet, stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Nutzung dieses Enzyms zur Entwicklung *Plasmodium*-spezifischer Inhibitoren dar [209].

Bei Plasmodien fehlen zwei zentrale antioxidative Enzyme: (i) Katalase, welche typischerweise eine Disproportionierung von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff katalysiert, und (ii) eine klassische Glutathionperoxidase (GPx) welche Hydroperoxide Glutathion-abhängig reduziert [16, 18, 100]. Das Fehlen dieser effizienten redox-aktiven Enzyme betont die zentrale Bedeutung des Thioredoxin-Systems für den Parasiten. In guter Übereinstimmung damit scheint die Thioredoxinreduktase eine essentielle Funktion für die asexuelle Entwicklung von *P. falciparum* Blutstadien *in vitro* auszuüben [104].

Zur Hemmung der *PfTrxR* werden verschiedene Ansätze verfolgt; eine Strategie bietet die Mechanismus-basierte Inaktivierung des Enzyms durch Mannich-Basen oder gekoppelte Inhibitoren [22]. Eine andere Möglichkeit ist die Identifizierung einer Reihe spezifischer Inhibitoren auf der Basis von Hochdurchsatz-*screening*-Verfahren und anschließende Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen [7].

1.2.5 Das Glutathion-System

Das zweite zentrale System des Redoxstoffwechsels ist das Glutathion-System. Es ist analog zu dem Trx-System aufgebaut, allerdings mit dem Unterschied, dass das Tripeptid Glutathion (GSH = γ -Glutamylcysteinylglycin) Elektronen zwischen dem Flavoprotein Glutathionreduktase (GR) und dem kleinen, redox-aktiven Protein Glutaredoxin (Grx) überträgt. Grx überträgt wie Trx diese Elektronen auf die Ribonukleotidreduktase sowie einige Peroxiredoxine (Prx) [58, 211]. GSH ist weiterhin das Thiolsubstrat der Glutathionperoxidasen (GPx) [58, 211] und liegt in der Zelle in Konzentrationen von 1-9 mM

[16, 68] vor, während die Konzentration des oxidierten Glutathiondisulfids (GSSG) deutlich unter 0,1 mM liegt. Das Glutathion-System trägt somit entscheidend zur Aufrechterhaltung des intrazellulären reduzierenden Milieus bei [16, 68]. Darüber hinaus dient GSH als Substrat der Glutathion S-Transferase (GST) und ist dadurch direkt an der Entgiftung elektrophiler Verbindungen beteiligt [16, 18, 139]. Weiterhin arbeiten auch Glyoxalasen GSH-abhängig und entfernen so α -Ketoaldehyde. Eine weitere Funktion von GSH ist die Bildung gemischter Proteindisulfide. Die Glutathionylierung erfolgt besonders an redox-aktiven Proteinen, deren katalytische Zentren somit blockiert, aber vor einer irreversiblen Oxidation z.B. durch ROS geschützt werden [67].

Die meisten pro- und eukaryotischen Organismen besitzen eine GR, Ausnahmen bilden die Dipteren *Anopheles gambiae* und *Drosophila melanogaster*, welche GSSG durch das Thioredoxin-System reduzieren [13, 96]. Die nichtenzymatische Reaktion von Thioredoxin und GSSG stellt eine wichtige Verknüpfung des Glutathion- und des Thioredoxin-Systems dar und könnte insbesondere für *P. falciparum*-Stadien – wie z.B. Merozoiten –, welche GSH, aber praktisch keine GR enthalten [98], von Bedeutung sein. In Leishmanien und Trypanosomen wurden das Glutathion- und Thioredoxin-System durch das Trypanothionsystem (Trypanothion = $[N^1, N^8$ -Bis(glutathionyl)spermidin]) ersetzt. An Stelle von GR/GSH/Grx haben Leishmanien und Trypanosomen Trypanothioreduktase/Trypanothion/Tryparedoxin [100, 138, 158] [100, 138].

Über *P. falciparum* GR existieren zahlreiche biochemische und enzymkinetische Studien [19, 93, 101], die als Basis für die Entwicklung von Inhibitoren dienen. Die Kristallstruktur der *P. falciparum* GR wurde gelöst und mit der Struktur des humanen Orthologs verglichen [171]. Obwohl sich die aktiven Zentren der beiden Enzyme nur geringfügig unterscheiden, konnten spezifische Merkmale charakterisiert werden, die als Ausgangspunkt für die Entwicklung *Plasmodium*-spezifischer Hemmstoffe genutzt werden. Hierzu zählen, dass sich die Aminosäuresequenz einer langen α -Helix sowie die Ladung und chemische Beschaffenheit der Wände einer Höhle bisher unbekannter Funktion von dem humanen Enzym unterscheiden. Beide Bereiche befinden sich an der Kontaktfläche der zwei Untereinheiten [171]. Diese strukturellen Unterschiede können für die Bindung von Inhibitoren genutzt werden [18, 101, 171].

Heiner Schirmer und Kollegen gehen außerdem davon aus, dass eine gleichzeitige Hemmung der PfGR und der humanen GR sinnvoll sein könnte. Die Argumente für diese Annahme umfassen klinische und epidemiologische Beobachtungen sowie

pharmakologische Studien, welche besagen, dass ein erniedrigter Spiegel an humaner GR-Aktivität – dieser niedrige Enzym-Level ist gewöhnlich begrenzt auf Erythrozyten – nicht signifikant mit der Erythrozyten-Funktion interferiert, aber Schutz vor Malaria bietet [70, 195]. Ein weiteres Argument, ein Wirtszell-Enzym als *drug target* zu wählen, ist die Vermeidung der Entwicklung von Hemmstoffresistenzen [164, 208].

Einige Inhibitoren wurden bereits an der GR getestet; diese dienen als Leitverbindungen für die rationale Entwicklung von Antimalariamitteln. Sie umfassen Dimerisierungs-Inhibitoren [146], Methylenblau [57] (siehe Kapitel 1.3), Isoalloxazin-Derivate [86], Stickstoffmonoxid-Donatoren [14, 172] und gekoppelte Inhibitoren, sogenannte „doppelköpfige Prodrugs“, sie bestehen aus einem GR-Inhibitor, die mit einem 4-Aminochinolin gekoppelt sind [45].

Unter Zusammenfassung vieler Kriterien, die für die Eignung eines Proteins als *drug target* unerlässlich sind (wie z.B. das Vorhandensein einer dreidimensionalen Struktur, eines Assays, getestete Inhibitoren), wurden alle etwa 5500 *Plasmodium*-Gene in einer Rangliste geordnet. Hierbei steht die Glutathionreduktase an erster Stelle als aussichtsreichstes *drug target* für die Entwicklung neuer Antimalaria-Medikamente (www.tdrtargets.org).

1.2.6 Plasmoredoxin

P. falciparum weist ein großes Repertoire an kleinen Redox-Proteinen mit Sequenzähnlichkeit zu Trx auf [139], welche in der Gruppe der sogenannten Thioredoxin-Superfamilie zusammengefasst werden. Außer einem klassischen Glutaredoxin (Grx), mindestens einem Trx sowie drei Glutaredoxin-ähnlichen Proteinen wurde ein redox-aktives 22 kDa-Protein mit der Bezeichnung Plasmoredoxin (Plrx) identifiziert [15]. Basierend auf derzeit erhältlichen Datenbank-Informationen, scheint Plrx einzig bei *Plasmodium*-Spezies vorzukommen. Dies ist ein viel versprechender Ansatzpunkt für die Entwicklung von Antimalaria-Medikamenten, da die Hemmung eines *Plasmodium*-spezifischen Stoffwechselweges oder eines *Plasmodium*-spezifischen Proteins das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen am menschlichen Wirt reduziert.

Im Gegensatz zu dem WCGPC-Motiv des aktiven Zentrums, welches sich in der Gruppe der Thioredoxin-Superfamilie findet, besitzt Plrx ein abweichendes WCKYC-Motiv im katalytischen Zentrum. Thioredoxine sind eine Gruppe kleiner (12 kDa) redox-aktiver Proteine, welche sowohl in zellulären redox-regulatorischen Prozessen als auch in Deoxyribonukleotid-Synthese und antioxidativer Abwehr involviert sind [158]. Thioredoxin und Glutaredoxin teilen innerhalb der Gruppe der Thioredoxin-Familie viele strukturelle und

funktionelle Eigenschaften, während die Identität von Plrx mit Mitgliedern dieser Familie vergleichsweise gering ausfällt (31,4% Identität mit PfTrx, 27,5% mit PfGrx) [15]. Eine Homologie-Modellbildung resultierte in einer partiellen dreidimensionalen Struktur des *P. falciparum* Plrx-Proteins, welche die für die Gruppe typische Thioredoxin-Faltung offenbart. Es existiert bereits ein NMR-Datensatz, der der Strukturaufklärung von Plrx dienen kann [140].

Analog zu Trx und Grx ist Plrx in der Lage, Ribonukleotidreduktase *in vitro* zu reduzieren [18, 139, 159]. Plasmoredoxin selbst kann sowohl von Trx als auch von GSH und Grx reduziert werden [15], wodurch sich eine weitere Verbindung (zusätzlich zu den unter Kapitel 1.2.5 genannten) zwischen den Glutathion- und Thioredoxin-Systemen ergibt. Interessanterweise kann Plrx jedoch nicht durch Thioredoxin- und Glutathionreduktase direkt reduziert werden. Weitere Interaktions-Partner der verschiedenen Redoxine in *Plasmodium* werden zurzeit in der AG Becker mit *pull-down*-Analysen untersucht (Sturm *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

1.3 Methylenblau

Methylenblau (MB) ist das erste synthetische Chemotherapeutikum der Geschichte. Es handelt sich um ein Phenothiazin-Derivat, welches 1876 von Heinrich Caro bei der heutigen BASF synthetisiert wurde. Die Strukturformel von MB ist im unteren Feld der Abb. 1.7 zu sehen.

Paul Ehrlich und Paul Guttman setzten MB schon 1891 als Antimalaria-Medikament ein [77], wenn kein Chinin zur Verfügung stand.

MB geriet seit den 60er Jahren in Vergessenheit, als neue Malariamittel wie die MB-Derivate Mepacrine und Chloroquin zur Verfügung standen. In einigen Bereichen der Medizin wird MB bis heute eingesetzt; die Hauptindikation liegt in der Behandlung von akuten oder chronischen Methämoglobinämien (z.B. bei Vergiftungen mit Anilinen oder Nitriten) wegen der Fähigkeit von MB – nach Reduktion durch NADPH *in vivo* zu LeukoMB –, Methämoglobin zu reduzieren [39] (Abb. 1.7). Weiterhin wird MB beim septischen und anaphylaktischen Schock oder zur Prävention neurotoxischer Nebenwirkungen von Ifosfamid in der Krebsbehandlung [155] eingesetzt. Zwar gibt es in der Literatur Fälle von Unverträglichkeiten [156], die jedoch auf Personen mit bestimmten Formen der Glukose-6-phosphat-dehydrogenase-Defizienz (G6PD-Mangel, siehe Kapitel 1.2.2) beschränkt zu sein scheinen.

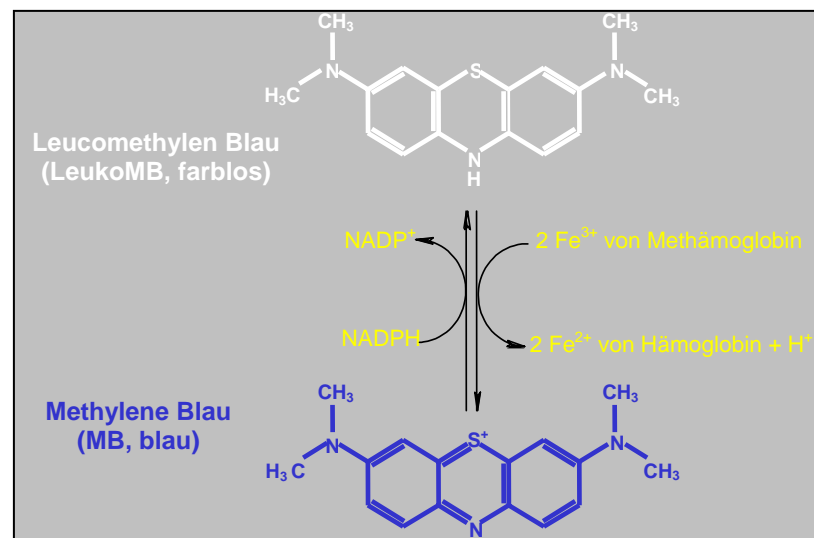


Abb. 1.7: Strukturformeln von Methylenblau (MB) und LeukoMB

Methämoglobin (Fe³⁺) entsteht durch Oxidation aus Hämoglobin (Fe²⁺). Dieses Methämoglobin kann durch Wirkung von LeukoMB wieder zu Hämoglobin reduziert werden, allerdings läuft dieser Vorgang in beide Richtungen ab.

In Anbetracht der Ausbreitung von *P. falciparum*-Resistenzen gegen die wichtigsten Antimalariamittel wie Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin wird MB heute wieder verstärkt als Wirkstoff gegen Malaria untersucht [11, 117, 175, 198, 217].

Einige der wichtigsten Eigenschaften von MB in diesem Zusammenhang sind in dem Akronym BONARIA zusammengefasst. Dies besagt, dass MB

- sicher, effektiv und kombinierbar eingesetzt werden kann (ausgedrückt in dem Wortteil **BON**),
- für die Ärmsten der Welt zu bezahlen ist (**A** steht für *affordable*),
- in den meisten Ländern bereits als Arzneimittel – für die oben genannte Indikation – registriert ist (**R** steht für *registered*) und
- international in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht (**IA** steht für *internationally available*) [176].

Der Preis der Behandlung eines Malaria-Ausbruchs bei einem Kind mit einer MB-enthaltenden Arzneimittel-Kombination liegt unter 50 Cent [127] (zum Vergleich: Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin sind 10 Cent-Arzneimittel und ATCs >2 Euro-Medikamente).

Basierend auf Zellkultur-Studien bezeichneten Vennerström und Kollegen MB wegen der hohen Wirksamkeit gegen Malaria (IC₅₀ = 4 nM) ohne Kreuzresistenz mit Chloroquin als beachtenswert. Weiterhin besitzt MB im Modell menschlicher monozytärer Leukämie-abgeleiteter Zellen eine nur geringfügige Zytotoxizität [11, 198]. Unter dem Gesichtspunkt

der Selektivität eignet sich MB somit für eine Behandlung der Malariaerkrankung, da es hohe Effektivität gegen Plasmodien mit niedriger Toxizität für menschliche Zellen vereint. Ein weiterer Vorteil von MB ist, dass eine Resistenzentwicklung nur geringfügig stattzufinden scheint; nach vier Monaten MB-Behandlung von *P. berghei* mit subletalen Dosen *in vivo* stieg die minimal effektive Dosis von 15 auf 35 mg/kg KGW [189].

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer Resistenzausbildung ist, dass MB pleiotrope Wirkungen hat. Dies steht im Einklang mit der Beschreibung zweier unabhängig voneinander bestehender Wirkungsweisen von MB. Zum einen interferiert MB mit der Polymerisation von Häm zu Hämozoin in der Nahrungsvakuole des Parasiten [11]. Zell-biochemische Beobachtungen von Akompong *et al.* [3, 175] legen den Schluss nahe, dass MB das Wachstum der Parasiten durch Inhibition des (Met)hämoglobin-Abbaus beeinflusst. Ein Vorteil ist, dass diese zwei MB-Angriffspunkte – Methämoglobin und β -Hämatin – nicht durch das *Plasmodium*-Genom regulierbar sind [11, 175, 198]. Neben diesen Effekten auf Hämoglobin- und Häm-Metabolismus ist MB ein nicht-kompetitiver Inhibitor der Glutathionreduktase von *P. falciparum* [57], dabei kommt es indirekt zu einer Depletion von Glutathion im Zytosol der Parasiten. Niedrige Glutathion-Spiegel begünstigen wiederum die Wirkung von Chloroquin [49, 137].

Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt für einen Einsatz von MB mit dem Ziel, die Parasiten für Chloroquin sensitiver zu machen und somit vorhandene Chloroquin-Resistenzen abzuschwächen. Dieser Ansatz wird zusätzlich durch Hinweise gestützt, die zeigen, dass sich MB in den Parasiten selektiv anreichert [2, 11]; eine wichtige Voraussetzung, damit ausreichend hohe zytosolische MB-Konzentrationen eine Hemmung der *P. falciparum* Glutathionreduktase gewährleisten.

Die Kombination von MB und Chloroquin wurde in klinischen Studien in Nouna, Burkina Faso getestet [117, 127, 217]. In dieser Studie konnten zwar keine toxischen Zwischenfälle oder Unverträglichkeiten beobachtet werden, aber es zeigte sich keine klare Verbesserung gegenüber einer Chloroquin-Monotherapie [127]. Hierfür gibt es verschiedenen Gründe: (i) zu niedrige Dosierung von MB [127], (ii) eine antagonistische Wirkung der beiden Kombinations-Partner und/oder (iii) ein bisher unbekannt hoher Grad an Chloroquin-Resistenz in Burkina Faso [127, 128]. Hierzu führten Akoachere *et al.* weiterführende Untersuchungen durch und konnten zeigen, dass MB und Chloroquin im Zellkultur-Assay *in vitro* tatsächlich antagonistisch wirken [2]. Als synergistischer Partner für MB erwiesen sich in derselben Studie Artemisinin-Derivate. Es wird diskutiert, dass die Antimalaria-Wirkungsweise von Artemisinin auf eine Hemmung der *P. falciparum* Ca^{2+} -ATPase

zurückzuführen ist [53]. Die oben erwähnte pleiotrope Wirkung von MB scheint mit der Wirkung des Artemisinins nicht zu interferieren, somit ist eine Resistenzentwicklung bei dieser Arzneimittel-Kombination unwahrscheinlich.

In Nouna, Bourkina Faso wurden die Kombinationen MB und Amodiaquin sowie MB und Artesunat in klinischen Studien an unkomplizierter *P. falciparum*-Malaria getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide Kombinationen sicher und effektiv wirken, wobei MB und Amodiaquin (MB-AQ) eine signifikant höhere Effizienz als standardmäßige Artemisinin-basierte Kombinationstherapien besitzen [217]. Diese ersten klinischen Untersuchungen stellen MB-AQ als viel versprechende Arzneimittel-Kombination gegen *P. falciparum*-Malaria in Westafrika dar.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur rationalen Entwicklung von Medikamenten gegen Malaria zu leisten. Ein breites Spektrum antioxidativer Proteine ist bei Plasmodien bekannt, viele der beteiligten Komponenten sind enzymkinetisch und biochemisch im Detail charakterisiert und stellen potentiell viel versprechende *drug targets* zur Entwicklung *Plasmodium*-spezifischer Inhibitoren dar.

Im Gegensatz zu Trypanosomen und Leishmanien, welche essentielle und einzigartige Redoxstoffwechselwege besitzen, weisen die Systeme bei *Plasmodium* nur geringe Unterschiede zum Menschen auf (zum Beispiel ist die hTrxR selenabhängig, nicht so die PTrxR; Plrx ist einzigartig). Diese Parasiten verbinden die weitverbreiteten Glutathion- und Thioredoxin-Systeme zu einem vielseitigen Redoxnetzwerk.

Im Sinne einer rationalen Medikamentenentwicklung sind die Analyse der hierarchischen Struktur innerhalb des Redoxnetzwerkes und die Identifizierung essentieller Komponenten von großer Bedeutung. Experimentelle Genetik bei *in vivo* Malaria-Modellen bietet ausgezeichnete Möglichkeiten zur Validierung eines *drug targets* unter physiologischen Bedingungen.

Die Methoden der reversen Genetik – wie gezielte Gen-Inaktivierung und Gen-Komplementation – wurden genutzt, um ausgewählte Gene als *drug target* zu validieren und die *in vivo*-Funktionen der Gen-Produkte aufzuklären. Dies geschah mit zwei zentralen Enzymen der antioxidativen Abwehr von *Plasmodium*, namentlich Glutathion- und Thioredoxinreduktase, sowie mit einem *Plasmodium*-spezifischen Mitglied einer Gruppe kleiner redox-aktiver Proteine, dem Plasmoredoxin. Konnte keine essentielle Funktion der Gene für die Entwicklung und Proliferation der asexuellen Blutstadien detektiert werden, wurde der resultierende Phänotyp im Verlauf des *Plasmodium*-Lebenszyklus untersucht.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein Glutathionreduktase-spezifischer Wirkstoff, Methylenblau, bezüglich seiner Interaktionen mit den Glutathionreduktasen und Thioredoxinreduktasen von Plasmodien und Menschen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborausstattung

Amaxa-Elektroporator	Amaxa, Köln
Analytische Waage	Sartorius GmbH, Göttingen BL510
Autoklav	Systemc GmbH, Wettenberg
Blotapparatur (Mini Tank Transfer Unit)	Hoefler
Brutschränke:	
Hera Cell	Heraeus Instruments, Hanau
für <i>P. berghei</i> Transfektion	Mytron, Heiligenstadt
Drehrad	Stuart, VWR, Darmstadt
Elektroporationsgerät	BioRad, München
Elektrophoreseapparaturen	GibcoBRL, Hoefler, HE33
Expositionskassette	Sigma, Taufkirchen
Filmentwicklungsmaschine Hyperprocessor	Amersham, GE-Healthcare, Freiburg
Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100M Zeiss, Jena
Gießapparatur (SDS-Gele) mighty small	Hoefler
Heizblock	Alpha Laboratories, DB1010
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge	Heraeus sepatech, Hanau
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
Magnetheizrührer	Heidolph, MR 3001
Moskito-Käfige	BioQuip Products Inc, USA
Netzgerät Power Supply	Amersham, GE-Healthcare, Electrophoresis Power Supply, EPS301, Stuart
PCR-Maschinen	Gene Amp, PCR System 9700, Applied Biosystems, USA
pH-Meter	Inolab

Pipetman Gilson P10, P20, P200, P1000	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Quarzküvetten	Amersham, GE-Healthcare, Freiburg
Rotor-Gene 3000 Real-Time PCR	Corbett Research, Sydney, Australia
Schüttler (Orbital Shaker)	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Innova 4300
Spectrophotometer GeneQuant pro	Amersham, GE-Healthcare, Freiburg
Sterile Werkbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
SterilGARD ClassII Type A/B 3	The Baker Company, USA
Stickstofftank	CBS, USA
Szintillationscounter, Matrix 9600	Packard, Minnesota, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R, Eppendorf
UV-Tischlampe	Gibco BRL, Scientific Industries
Ultraschall-Gerät	Bandelin Electronics, Berlin
Ultrazentrifuge Optima™ TLX	Beckman Instruments, Fullerton, USA
Vakuumzentrifuge SpeedVac	Savant
Vortex-Genie	Scientific Industries
Wasserbad Julabo 7A	Julabo
Zählkammer: Neubauer	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Zentrifuge J2-MC	Beckman
Zentrifuge RC5Bplus	Sorvall
Zentrifuge Megafuge	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Centriprep 10k	Amicon Inc., Beverly, USA
Chamberslides	LabTek
Deckgläschen	Knittel
Einmalröhrchen, Polystyren-6,0/38 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalröhrchen, Polypropylen-12/75 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalküvetten	Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Faltenfilter	Schleicher und Schuell, Einbeck
Frischhaltefolie Saran	Roth, Karlsruhe
Glasfaser-Filtermatte	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kanülen	BD Microlance, Becton Dickinson
Kodak BioMax XAR Film	Sigma, Taufkirchen
Kryogefäße	NALGENE®
Nitrocellulosemembran, Hybond	Amersham, GE-Healthcare, Freiburg
8 well Objektträger	Medco
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen, gestopft	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Serologische Pipetten (1,2,5,10 und 25 ml)	Corning Incorporation, Bodenheim
Sterilfilter (0,2 µm, 0,4 µm)	Schleicher und Schuell, Einbeck
Sterilfiltrationseinheiten	NALGENE®
Spritzen	BD Diskardit, Becton Dickinson
Whatman™ 3MM paper	Firma Whatman Paper Company
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² (TPP)	Renner, Dannstadt-Schauernheim

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht näher bezeichnet, wurden Chemikalien von den Firmen Roth, Merck, Sigma, Serva und AppliChem sowie über die Chemikalienausgabe des Theoretikums der medizinischen Fakultät Heidelberg bezogen.

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alsever's Solution	Sigma, Taufkirchen
3-Amino-1,2,4-triazol	Sigma, Taufkirchen
Amodiaquine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
APS	Roth, Karlsruhe
Artemisinin	Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Trypton	BD Diskardit, Becton Dickinson
Bis/Acrylamid-Lösung, Protogel	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen

Material und Methoden

BSA (Bovine Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroquine diphosphate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cystatin	Sigma, St. Louis
Diethylether	Riedel-de Haen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM-Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS, zertifiziert (USA)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Fibrose Cellulose Powder	Whatman, Großbritannien
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
GeneRuler® 100bp bzw. 1kb	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Gentamicin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa (0,4%,w/v)	BDH Laboratory Supplies
Glass beads, 212-300 micron, unwashed	Sigma, Taufkirchen
D-(+) Glucose	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert	Sigma, St. Louis
Glutathiondisulfid	Sigma, St. Louis
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HBSS	GibcoBRL, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Heparin	Braun, Melsungen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Ketamin (10%)	VFW
6 x Ladepuffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Lithiumazetat	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt

Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Meersalz	Alnatura
Mefloquine-HCl	Roche, Mannheim
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NADPH	BioMol, Hamburg
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	JT Baker, Niederlande
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	JT Baker, Niederlande
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nycodenz	Axis Shield, Oslo, Norwegen
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
PBS	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000µg/ml)	GibcoBRL, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, St. Louis
PMSF	Roth, Karlsruhe
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pyrimethamin	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol (PEG 4000)	Sigma, Taufkirchen
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, USA
Rotiphorese™ 30%ige Acrylamidlösung	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Merck, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	GibcoBRL, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt

Xylazinhydrochlorid (2% Xylazin) Rompun[®], Bayer

2.1.4 Radioaktiv markierte Substanz

0.5 µCi of [³H] hypoxanthine Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.5 Nährmedien

2.1.5.1 Bakterienkulturnährmedien

Luria Bertani (LB)-Medium 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5

LB-Platten LB-Medium, 15 g/l Bacto-Agar

Zur Selektion transformierter Bakterien wurden dem LB-Medium bzw. den LB-Platten 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

2.1.5.2 Zellkulturmedien

- Parasiten-Medien

Transfektions-Kulturmedium 40 ml RPMI-Medium, 25 mM HEPES, L-Glutamin (Gibco), 35 ml FCS, 50 µl Gentamycin

Kulturmedium für [³H] Assay 50 mg Hypoxanthin, 5,94 g HEPES, 10,44 g RPMI 1640 mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃, 5 g Albu max, *Aqua dest. ad* 1000 ml, sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren, vor Gebrauch versetzen mit 42 ml NaHCO₃-Lsg. 5%, 10 ml Neomycin-Lsg. 10000 U/ml

screening-Medium Kulturmedium für [³H] Assay ohne Hypoxanthin

freezing-solution Glycerin : Alsever's Solution (1:9)

- Hepatozyten-Medien

DMEM-Medium 450 ml DMEM (high Glucose), 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin; sterilfiltriert

<i>freezing-solution</i> Hepatozyten	10% DMSO, 90% FCS
100 x <i>Round-Up</i> (als Zusatz zum Kulturmedium zur Verhinderung von Kontamination)	60 mg Penicillin, 100 mg Kanamycin, 50 mg Fluocytosin, 10 mg Chloramphenicol, sterilfiltriert

2.1.6 Antibiotika und Zusätze

APS	10% _(w/v) in Wasser gelöst, bei -20°C gelagert
Carbenicillin Stock	50 µg/ml Ampicillin in 50% Ethanol, bei -20°C gelagert
Chloramphenicol Stock	25 µg/ml Chloramphenicol in 100% Ethanol, bei -20°C gelagert
Cystatin	40 µM in US-Puffer, bei -20°C gelagert
DTT	200 mM in H ₂ O, bei -20°C gelagert
GSH	100 mM in H ₂ O, bei -20°C gelagert
GSSG	20 mM in GR-Puffer, bei -20°C gelagert
Heparin für Transfektion	0,25 ml 200 I.U./ml Stammlösung auf 10 ml Transfektions-Kulturmedium
IPTG Stock	1 M in ddH ₂ O, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert
Kanamycin Stock	25 µg/ml Kanamycin in ddH ₂ O, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert
NADH, NADPH	4 mM in GR-Puffer, kurzzeitig bei 4°C gelagert
Pepstatin	1.5 mM in US-Puffer, bei -20°C gelagert
PMSF	100 mM in DMSO, bei Raumtemperatur gelagert
Tetracyclin Stock	5 mg/ml Tetracyclin in 70 % Ethanol
X-Gal	20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid, bei -20°C gelagert

2.1.7 Moskito-Aufzucht

Mücken-Aufzuchtswasser	1 ‰ Meersalz in ddH ₂ O
------------------------	------------------------------------

10% Sucrose-Nährlösung 10 g Sucrose, 20 µg pABA *ad* 100 ml ddH₂O

2.1.8 Lösungen und Puffer

Giemsa-Lösung 10% Giemsa-*solution* in VE-H₂O
GR-Assaypuffer 47 mM Kaliumphosphat, 2mM EDTA, 200 mM KCl; mit KOH_{aq} bei Raumtemperatur auf pH 6,9 eingestellt
Moskito-Präparationslösung 3% BSA in RPMI 1640
3 M NaAc-Lösung 24,06 g *ad* 100 ml ddH₂O; pH 4,8
PBS 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH₂PO₄, 81 mM Na₂HPO₄, pH 7,4
TAE-Puffer (50x) 2 M Tris, 250 mM Natriumacetat, 0,5 mM EDTA, pH 7,8
TE-Puffer 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
TrxR-Assaypuffer 100 mM Natriumphosphat, 2 mM EDTA; mit KOH_{aq} bei RT auf pH 7,4 eingestellt
Ultraschall-Puffer (US-Puffer) 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid; mit HCl_{aq} auf pH 8
4M Harnstoff-Puffer 4 M Urea, 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 10 mM MgSO₄, pH 8, Lagerung bei 4°C

2.1.9 Pufferlösungen für SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting

SDS-Probenpuffer 1x (nach Biorad) 12,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (= Sammelgelpuffer), 25 ml Glycerin, 20 ml 10%_(w/v) SDS *ad* ~2,1%, 2 ml 0,5%_(w/v) Bromphenolblau *ad* 0,01% 35 ml H₂O, Lagerung bei RT; vor Gebrauch + 5%_(w/v) β-ME
SDS-Probenpuffer 4x (Lämmli) 3 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 *ad* 300 mM, 300 mg DTT *ad* 6%_(w/v), 400 mg SDS *ad* 400 mM, 2 ml Glycerin *ad* 40%_(w/v), eine Spatelspitze Bromphenolblau

SDS-Kammerpuffer/Blottingpuffer	192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 0,1% _(w/v) SDS (nur für SDS-Kammerpuffer) mit HCl _{aq} bei RT auf pH 8,3 eingestellt
Coomassie-Färbelösung	0,25% _(w/v) Coomassie-Brilliantblau R250, 9,2% _(v/v) Essigsäure, 5% _(v/v) Methanol
Coomassie-Entfärber	40% _(v/v) Essigsäure, 10% _(v/v) Methanol
Anodenpuffer I	300 mM TRIS
Anodenpuffer II	25 mM TRIS
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure
TBS	10 mM TRIS, 155 mM NaCl, mit HCl _{aq} bei RT auf pH 7,4 eingestellt
TBS-Tween (TBST)	10 mM TRIS, 155 mM NaCl, 0,05% _(v/v) Tween 20, mit HCl _{aq} bei RT auf pH 7,4 eingestellt

2.1.10 Verwendete Antikörper, Stämme und Vektoren

2.1.10.1 Antikörper

Antigen	Verdünnung	Quelle
monoklonaler Maus-anti-CSP (<i>P. berghei</i>)	1:300	Nussenzweig RS, New York
Maus-anti-HSP 70	1:1 /1:500	Tsuji M, New York
Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488	1:300	Molecular Probes, NL
Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 546	1:300	Molecular Probes, NL
Kaninchen-anti-Plrx (<i>P. berghei</i>)	1:1500	Eurogentec, Seraing, Belgien
Kaninchen-anti-TrxR (<i>P. falciparum</i>)	1:1500	AG Becker, Gießen

Kaninchen-anti-IgG HRP	1:10000	Amersham, Freiburg
------------------------	---------	--------------------

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Antikörper mit Angabe der eingesetzten Verdünnungen und Bezugsquellen

2.1.10.2 *Escherichia coli*-Stämme

XL-1 Blue (Stratagene)	<i>supE44, hsdR17, recA, gyrA46 thi, relA1, lac, F' [proAB⁺, lac^f, LacZ M15, Tn10(<i>tet</i>)]</i>
M15 [pREP4] (Qiagen)	<i>nal^S, Str^S, rif^S, Km^R, lac⁻, ara⁻, gal⁻, mtl⁻, F, recA⁻, uvr⁺</i>
K12-Stamm JM 109	Promega, Mannheim

2.1.10.3 Vektoren und Plasmide

Die stabile Transfektion wird angewendet, um die Funktion eines Proteins durch Unterbrechung oder Austausch eines Gens zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Plasmide als Vektoren entwickelt [202]. Der Plasmid-Vektor b3D.DT^ΔH.^ΔD (Andy Waters, LUMC, Leiden, Niederlande) stammt vom pBlueskript-Plasmid ab, das das β-Lactamase Gen als Ampicillin-Resistenzmarker für die Selektion transformierter Bakterien enthält. Für die Anwendung in *P. berghei* wurde ein mutiertes *DHFR/TS*-Gen von *T. gondii* hinzugefügt. Diese Dihydrofolat-Reduktase-Mutante verleiht Resistenz gegen das Anti-Folat Pyrimethamin. Die Expression dieses Selektionsmarkers steht unter der Kontrolle der 5' nicht-translatierten Region (5'UTR) von *P. berghei*, die auch den Promotor des *Plasmodium berghei* *DHFR/TS*-Gens enthält. Die 3'UTR und die Poly-Adenylierungsstelle des *DHFR/TS*-Gens stammen ebenfalls von *Plasmodium berghei* Homolog. Um die Auswahlmöglichkeiten für Restriktionsenzyme bei der Klonierung zu erhöhen, wurden die *KpnI* und *EcoRI* Erkennungsstellen im *Toxoplasma gondii* *DHFR/TS*-Gen mutiert [202].

Die DHFR ist ein Schlüsselenzym der Tetrahydrofolat-Synthese. Tetrahydrofolat wird für die Herstellung von DNA und Proteinen benötigt. Eine Punktmutation im *DHFR/TS*-Gen an Position 110 (Ser → Asn) ist für die Resistenz gegenüber Pyrimethamin verantwortlich. Durch diese wird das aktive Zentrum des Enzyms verändert. Dies führt zu einer reduzierten Affinität des Enzyms für Pyrimethamin und somit zur Resistenz [202].

In dieser Arbeit wurden die Transfektionsvektoren b3D.DT^ΔH.^ΔD (bezogen von A.P. Waters, Universität Leiden, Niederlande) und b3D.DT^ΔH.^ΔD+ (freundlicherweise zur Verfügung

gestellt von Markus Ganter) verwendet. Bei dem b3D.DT^H.^{AD}-Vektor handelt es sich um eine modifizierte Version des Standardvektors b3D.DT^H.^{AD}, welcher eine zweite Kopie der *PbDHFR/TS* 3'UTR enthält; diese wurde mittels *Bam*HI/*Eco*RI-Klonierung in die *multiple cloning site* eingeführt.

b3D.DT ^H . ^{AD} [188]	A.Waters, Universität Leiden, Niederlande
b3D.DT ^H . ^{AD} +	M. Ganter, Universität Heidelberg
pET-28a(+)	Novagene, Bad Soden
pGEM [®] -T easy	Promega, Mannheim

2.1.11 Genomische DNA

genomische <i>P. berghei</i> DNA	NK65
genomische <i>P. berghei</i> DNA	GFP-507cl (ANKA) [90]
genomische <i>P. yoelii</i> DNA	17XNL

2.1.12 Zelllinien

HepG2	Humane Hepatozyten Leber Karzinom Zelllinie
HuH7	Humane Hepatoma Zelllinie

2.1.13 Maus- und Ratten-Stämme

Folgende Nager dienen als Wirte für *P. berghei* und *yoelii*.

Art	Stamm	Lieferant
Mäuse (<i>Mus musculus</i>)	Narval Medical Research Institute (NMRI); Auszucht-Mäuse	Charles River Laboratory, Sulzfeld
Mäuse (<i>Mus musculus</i>)	C57BL/6; Inzucht-Mäuse	Charles River Laboratory, Sulzfeld,
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Wistar (WIST); Auszucht-Ratten	Charles River Laboratory, Sulzfeld
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sprague-Dawley (SD); Auszucht Ratten	Charles River Laboratory, Sulzfeld

Die Haltung der Ratten und Mäuse erfolgte in Makrolon-Käfigen, deren Besatzungsdichte in der Regel bei 5 Mäusen bzw. 2 Ratten pro Käfig liegt. Die Käfige standen in speziellen Tierräumen bei konstanter Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Feuchtigkeit von 50 bis 60%. Der Hell-, Dunkelrhythmus lag unabhängig von der Jahreszeit täglich bei 12 Stunden. Es wurde mit Standard Trockenpellets von SSNIFF gefüttert.

2.1.14 Moskito-Stämme

Anopheles stephensi Moskitos (Nijmegen, Niederlande) dienten als Insektenvektoren für *Plasmodium berghei*.

2.1.15 Enzyme

PfGR (heterolog exprimiert und gereinigt nach [57]), *hGR* (heterolog exprimiert und gereinigt nach [145]), *PfTrxR* (heterolog exprimiert und gereinigt nach [95]) und *hTrxR* wurden entweder selbst nach den genannten Protokollen hergestellt oder freundlicherweise von Prof. R.-H. Schirmer, Biochemiezentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt bzw. waren in der Arbeitsgruppe Becker, Universität Gießen, vorhanden.

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Fermentas, St.Leon-Roth
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Quick T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
REDTaq [®] DNA-Polymerase	Sigma, Steinheim

Alle Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Für sämtliche, kommerziell erworbenen Enzyme wurden, sofern nicht anders beschrieben, die vom Hersteller mitgelieferten, empfohlenen Puffer verwendet.

2.1.16 Verwendete Kits

SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix	Sigma, Steinheim
Dynabeads [®] mRNA Purification Kits	Dynal Biotech, Oslo, Norwegen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Human T Cell Nucleofactor Kit	Amaza, Köln, Cat.no. VPA-10002
QIAamp DNA-Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen A-Addition Kit	Qiagen, Hilden

QIAgen PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Quick Ligation [™] Kit	New England Biolabs, Beverly, USA
NucleoSpin [®] RNA/Protein	Macherey-Nagel, Düren
PGEM [®] -T easy Vector System II	Promega, Mannheim
Verso cDNA Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe

2.1.17 Oligonukleotide

Primer für die PCR, für Sequenzierungen, für Genotypisierungen und für RT-PCR wurden von Metabion, Martinsried bezogen. *Primer*, die für die Herstellung der unterschiedlichen Vektoren verwendet wurden, sind unter **A** aufgelistet. Für die Sequenzanalysen verwendete *primer* sind unter **B** aufgelistet und *primer* der Genotypisierungen sind in Tabelle **C** aufgelistet. Die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind in Klammern und unterstrichen. RT-PCR *primer* sind in Tabelle **D** aufgeführt. Bei Vorhandensein zweier *primer*-Bezeichnungen, steht die erste für die im Artikel verwendete Bezeichnung und die zweite für die Bestellsbezeichnung.

A

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Pol.
OpyGRs (<i>Bam</i> HI)	5` - cg <u>cgggatc</u> ctatgattaatcgttattgg - 3`	+
OpyGRas (<i>Sac</i> II)	5` - tata <u>ccg</u> cggggtttttcttttgacttgg - 3`	-
<i>bGR</i> intfor (<i>Bam</i> HI)	5` - cg <u>cgggatc</u> ctatgattaatcgttattgg - 3`	+
<i>bGR</i> intrev (<i>Sac</i> II)	5` - tata <u>ccg</u> cggggtttttcttttgacttgg - 3`	-
<i>GR</i> rep1for (<i>Kpn</i> I) = KB03afor	5` - ggg <u>gtacc</u> gaagacctatatgaactgtac- 3`	+
<i>GR</i> rep1rev (<i>Hind</i> III) =KB04brev	5` - ccc <u>caagct</u> cattattatgaatatacag - 3`	-
<i>GR</i> rep2for (<i>Not</i> I) = KB05afor	5` - gc <u>g</u> cgccgcgcgcttttagatgcctcatgacatgc - 3`	+
<i>GR</i> rep2rev (<i>Sac</i> II) = KB06arev	5` - t <u>cccgc</u> gggatagatgctgatgtgttttcg - 3`	-
<i>GR</i> rep1for+ (<i>Sac</i> II) = KB03+	5` - t <u>cccgc</u> gggtcaacaattacatttattgacgg - 3`	+
<i>GR</i> rep1rev+ (<i>Xba</i> I) = KB04+	5` - g <u>ctctag</u> aggaataaaaggatacgaaaaaatgc - 3`	-
<i>GR</i> rep2for+ (<i>Hind</i> III) =KB35+	5` - cc <u>caagct</u> tcgcatatttaattccttaaac - 3`	+
<i>GR</i> rep2rev+ (<i>Kpn</i> I) = KB36+	5` - ggg <u>gtacc</u> gctattttgattatgtacacg - 3`	-
<i>GR</i> for (<i>Bam</i> HI)	5` - cg <u>cgggatc</u> catattaataagggtgaaaataaagg - 3`	+
<i>GR</i> revII (<i>Xba</i> I)	5` - t <u>gctctag</u> acgcatactattttttcataaatgcatcc - 3`	-

<i>PfGR</i> start (<i>Xba</i> I)	5` - gctc <u>tag</u> aaaaatggtttacgattaattgtaattgg - 3`	+
<i>PfGR</i> end (<i>Bam</i> HI)	5` - cggg <u>atc</u> ctcatttcacccatggc - 3`	-
<i>TrxR</i> rep1for (<i>Kpn</i> I) = Pb <i>TrxR</i> vf for	5` - gggg <u>tacc</u> gtgtgtgtaatatcataatgag - 3`	+
<i>TrxR</i> rep1rev (<i>Hind</i> III) = Pb <i>TrxR</i> vf rev	5` - ccca <u>agct</u> tcgctgaaaataataaatgacaattac - 3`	-
<i>TrxR</i> rep2for (<i>Spe</i> I) = Pb <i>TrxR</i> hf for2	5` - gg <u>actag</u> tgtgaaacacaattgatttatatgc - 3`	+
<i>TrxR</i> rep2rev (<i>Sac</i> II) = Pb <i>TrxR</i> hf rev	5` - tccc <u>cg</u> cgcgctacagaaaactgtggctttcttcagg- 3`	-
<i>Plx</i> int1for (<i>Bam</i> HI) = KB07for	5` - cggg <u>atc</u> ccattctacccaaaatgaagcacc - 3`	+
<i>Plx</i> int1rev (<i>Spe</i> I) = KB10rev	5` - gg <u>actag</u> tatatataattttcaaaaagg - 3`	-
<i>Plx</i> int2for (<i>Spe</i> I) = KB09for	5` - gg <u>actag</u> ttgatcaaacatatacagattatatcaatt - 3`	+
<i>Plx</i> int2rev (<i>Sac</i> II) = KB08rev	5` - tccc <u>cg</u> cgcgctgattttgattgaaatgtttgggg - 3`	-
<i>Plx</i> rep1for (<i>Kpn</i> I) = KB13for	5` - gggg <u>tacc</u> cagcattgataacagatgaacaacagc-3`	+
<i>Plx</i> rep1rev (<i>Hind</i> III) = KB14rev	5` - ccca <u>agct</u> ttacgaagaacttaacaaagctcatcg - 3`	-
<i>Plx</i> rep2for (<i>Spe</i> I) = KB12for	5` - gg <u>actag</u> tgttatgttgttgcacctaaccctcaaac - 3`	+
<i>Plx</i> rep2rev (<i>Sac</i> II) = KB11rev	5` - tccc <u>cg</u> cgcgctcgttggatcattttgaaattgcc - 3`	-
<i>Plx</i> start (<i>Nde</i> I)	5` - gaatccat <u>atg</u> gcacgtgaaagttgataaagc - 3`	+
<i>Plx</i> end (<i>Xho</i> I)	5` - ccgctc <u>gag</u> ctaattgtagaataaatcgaaaaatcg-3`	-

B

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Pol.
Pfseq1for	5` - gtaacaactcacatgtataaac - 3`	+
Pfseq2rev	5` - gatgagaaaataacagttgg - 3`	-
Pfseq3for	5` - gggccttgaatgaagaaatcc - 3`	+

C

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Pol.
Tgfor	5` - cccgcacggacgaatccagatgg - 3`	+
Tgrev	5` - ccaactcaatttaatagatgtgtatgtg - 3`	-
Tgrev2	5` - cgcattatatgagttcattttacacaatcc - 3`	-
T7rev	5` - gtaatacgcactactataggc - 3`	-
B3D+rev	5` - ccttgctcatttacctgctaatacagattgc - 3`	-
B3D+for	5` - cgcattatatgagttcattttacacaatcc - 3`	+

GR test rev = GR test b1 rev	5` - tatgggacattactactgtgcacagg - 3`	-
GR test for = KB03	5` - gtcaacaaattacatttattgacgg - 3`	+
GR_5`testfor = promoter new for 1	5` - cggaattcagataacatcccagtagctagc - 3`	+
GR_test3`rev = GR rev II	5` - cgcaactattttttcataaatgcatcc - 3`	-
PfGR I rev = Pf GR Ic rev	5` - aggaacacatccaacgttgacacacg - 3`	-
PbGR_Ia for	5` - ataaagtacattttatgcatttcataaa - 3`	+
PbGR_IIb rev	5` - agtcaagatgctcaaactccg - 3`	-
PfGR_Id for	5` - tggatgtgtcctaaaaaaattatgttc - 3`	+
TrxR_5`testfor = Pb TrxR 5`test	5` - cccttctatatattgtgaacatggtgg - 3`	+
TrxR_3`testrev = Pb TrxR 3`test	5` - gctaattcagacgatgcacacacg - 3`	-
TrxR_start	5` - atgtgtaacgataataaaagaaatcc - 3`	+
TrxR_end	5` - ccacatttccctccaccacatccacc - 3`	-
Plrxtestrev = KB 30a rev	5` - ggaacgtttgctactcc - 3`	-
5`testfor = Py Plrx 5`test	5` - gccaatgtaccatgtacacacg - 3`	+
PbGRfor = Pb test I c	5` - ttgcgtaaatgttaggtgtgtacc - 3`	+
PbGRrev = Pb test II b	5` - agtcaagatgctcaaactccg - 3`	-

D

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Pol.
Pb GR s	5` - cttgcgtaaatgtaggatgtg - 3`	+
Pb GR as	5` - ctctccttctactaattgtg - 3`	-
Pb TrxR s	5` - atggattagcaaaattaaaaaat - 3`	+
Pb TrxR as	5` - ctggtatattggtcgcacatcc - 3`	-
Pb TRAP s	5` - gaatgttctactacatgtgacaatgg - 3`	+
Pb TRAP as	5` - gctggttctataggttctacagg - 3`	-
Pb act I s	5` - atattaatgaaaattctca - 3`	+
Pb act I as	5` - tgtatgaattcctgctgctcttt - 3`	-
Pb RiboR s	5` - gctgatagattactagaatgtttaggg - 3`	+
Pb RiboR as	5` - gccataacacctgacttttgataatctgc - 3`	-
Pb stRNA s	5` - tagtgctggacatagaggtt - 3`	+
Pb stRNA as	5` - ctctgcacattctccatta - 3`	-
Pb Grx1 s	5` - gaaaataaaattgctgtattctc - 3`	+
Pb Grx1 as	5` - ttgaaatatgattggatatctgcc - 3`	-

Pb Trx1 s	5`- <u>tg</u> gaccttgcaaaagaatagctcc - 3`	+
Pb Trx1 as	5`- tcaaagctccctcattggctcc - 3`	-
Pb TPx-1 s	5`- tagataaacaaggagttgttc - 3`	+
Pb TPx-1 as	5`- tccgatggttcatggattcc - 3`	-

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide mit genauer Bezeichnung und Sequenz
Die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind in Klammern und unterstrichen.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultur und Transformation prokaryontischer Zellen

2.2.1.1.1 Flüssigkulturen von *E. coli*-Bakterien

Für *E. coli*-Flüssigkulturen wurden 5 ml bzw. 200 ml Nährmedium (LB-Medium) mit Bakterienzellen inokuliert und über Nacht inkubiert. Bei den Bakterien handelte es sich um Zellen einer Vorkultur oder Zellen direkt von einer auf Agarplatten gewachsenen Zellkolonie. Die Nährmedien enthielten zur Selektion ein Antibiotikum.

2.2.1.1.2 Plattenkulturen

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

2.2.1.1.3 Transformation kompetenter Zellen

Die Übertragung von Fremd-DNA in Bakterien nennt man Transformation. Die eingebrachten Plasmide vermitteln eine Antibiotikaresistenz, so dass mit dem Ausplattieren auf Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum auf Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, selektioniert werden kann.

Als Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit zum einen der Stamm *E. coli* XL-1 Blue kompetente Zellen (Stratagene) bzw. im Falle der Klonierungen mit dem pGEM[®]-T easy Kit (Promega) die mitgelieferten JM-109 Zellen verwendet. Zunächst überführte man die Zellen von -80°C auf Eis und ließ sie auftauen. Im nächsten Schritt wurden sie mit 0,68 µl β-Mercaptoethanol 10 min auf Eis permeabilisiert. Nach der Zugabe von 2 µl Ligationsansatz inkubierte man für 30 min auf Eis und unterzog die Zellen dann einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden, bevor die Zellen erneut 2 min auf Eis gekühlt wurden. Es folgte die Zugabe von 900 µl LB-Medium und die Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C für eine Stunde. Nach dieser Inkubation wurden 200 µl auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.1.4 Selektion/Identifizierung positiver Klone

Die Selektion positiver Klone erfolgte in jedem Fall über die auf den verwendeten Plasmiden kodierte Antibiotikaresistenz. Die Vektoren pGEM[®]-T easy, b3D.DT[^]H.[^]D und b3D.DT[^]H.[^]D+ enthalten das Resistenzgen gegen Carbenicillin/Ampicillin, pREP4 in M15-Zellen und pET-28a(+) vermittelt Kanamycin-Resistenz. Für die Selektion wird die *E. coli*-Flüssigkultur nach der Transformation auf den Antibiotika enthaltenden Agar ausplattiert. Darüber hinaus besitzen diese Vektoren das *lacZ*-Gen, dessen Produkt für die Aktivität der β-Galaktosidase nötig ist. Dieses Enzym setzt X-Gal, welches ebenfalls zu dem Agar gegeben wird, zu einem blauen Farbstoff um. Durch eine erfolgreiche Klonierung innerhalb der *multiple cloning site* wird die Expression funktionsfähigen Enzyms verhindert und entsprechende Kolonien bleiben weiß. In dieser Arbeit wurde der Blau-Weiß-Test zur Selektion bei pGEM[®]-T easy-Klonierungen eingesetzt. Bei allen Klonierungen erfolgte die Identifizierung positiver Klone durch abendliches Animpfen einer 3 ml Übernacht-Kultur mit nachfolgender Plasmid-Präparation und Kontrollrestriktion am nächsten Morgen.

2.2.1.1.5 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die standardmäßige Überexpression klonierter Gene erfolgte in M15-Zellen, in denen eine besonders enge Kontrolle der Expression durch das pREP4-Plasmid erreicht wird. Die Produktion des dort kodierten glucosesensitiven Repressors wird durch IPTG beendet und die Expression des eigentlichen Gens induziert. Als erste Vorkultur (VK) wurde eine frisch transformierte Kolonie in 3 ml LB mit Antibiotika-Zusatz (typische Endkonzentration: C *ad* 100 µg/ml, K *ad* 50 µg/ml) inokuliert, diese wurde einige Stunden unter konstantem Schütteln

bei 37°C inkubiert und dann in 250 ml LB mit Antibiotika überführt (2.VK). Dieser Kulturansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 160-180 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur (1 l LB und entsprechende Antibiotika) wurde am nächsten Morgen 1-2,5%ig mit der 2.VK angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert und anschließend die Expression durch IPTG-Zugabe *ad* 1 mM induziert. Nach 4stündiger Expressionsdauer wurden durch Zentrifugation bei 8000 rpm (10500 g, 4°C, 15 min) Zellpellets gewonnen, die in möglichst wenig US-Puffer resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 40 nM Cystatin, 150 nM Pepstatin und 10 µM PMSF schloss sich die Aufreinigung oder Lagerung bei -20°C an.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

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

In dieser Arbeit wurden die Reagenzien des QIAprep Spin Miniprep-Kits und des HiSpeed Plasmid Maxi-Kits von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers bzw. nach Angaben des Protokolls.

2.2.2.1.2 Alkoholfällung von DNA

Die DNA-Fällung mit Alkohol ist eine häufig angewandte Methode zur Konzentration oder Reinigung von DNA, die in wässriger Lösung vorliegt. Präzipitiert wird durch Aussalzen der DNA mit hohen Salzkonzentrationen und Ethanol. Zur Fällung von DNA aus einer wässrigen Lösung wurde die Probe zunächst mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (Endkonzentration 0,3 M) und dann mit 2,5 Volumina kaltem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte bei -80°C für 30 Minuten. Die ausgefällte DNA wurde bei 13000 rpm 4°C 15 min sedimentiert und das DNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach konnte das Pellet in dem benötigten Volumen Puffer aufgenommen werden.

2.2.2.1.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentration von DNA kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Die Absorption der ultravioletten Strahlung ist direkt proportional zum Gehalt an DNA. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm.

Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$(OD_{260nm} \times 50 \times \text{Verdünnung}) / 1000 = \text{Konzentration } \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Um den Reinheitsgrad der Probe zu bestimmen, betrachtet man den Quotienten (OD_{260nm}/OD_{280nm}) . Für eine reine Probe sollte dieser Quotient 1,8-2,0 betragen.

2.2.2.1.4 Gelelektrophorese von DNA

Diese Methode wurde für Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Molekülen verwendet. Hierzu wurden 1%ige Gele benutzt, die aus 50x TAE-Puffer (50x Modified Tris-Acetat-EDTA buffer, Millipore), Agarose und *Aqua bidest* hergestellt wurden. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer für 35 min bei 110 V/400 mA durchgeführt. Die Proben wurden mit Auftragspuffer gemischt (1:5) und in die Taschen des Gels aufgetragen. Um die Molekülgröße abschätzen zu können, wurde ein DNA-Größenmarker parallel auf das Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde das Gel in Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angefärbt. Durch dessen Interkalation in die DNA-Moleküle wurden diese unter UV-Licht (254 nm) durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.2.1.5 Sequenzierung

Um Plasmid-DNA auf Mutationen zu überprüfen, muss sie sequenziert werden. Dafür wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert und die Sequenzierung im Auftrag im Institut für medizinische Mikrobiologie (JLU Giessen) durchgeführt. Die verwendeten *primer* (siehe Tabelle 2.2B) wurden auf 10 pmol/ μl verdünnt.

2.2.2.1.6 Auswertung von Sequenzen

Sequenzvergleiche, Vorhersage der Restriktionsenzymststellen und virtuelle Translation wurden mit dem Programm BioEdit Version 7.0 durchgeführt.

2.2.2.2 *in vitro*-Modifikation und Rekombination von DNA

2.2.2.2.1 DNA-Restriktion

Die Restriktionsendonukleasen wurden einerseits für die Kontrolle erfolgreicher Ligation, andererseits für Konstruktion von DNA-Molekülen verwendet. Durch Mini-Präparation gewonnene Plasmide aus PCR-Klonierungen wurden mit *NotI* oder *EcoRI* verdaut.

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Ansätze mit 10-100 µl Gesamtvolumen verwendet. Dabei wurde pro µg DNA mindestens eine Enzymeinheit eingesetzt und im entsprechenden Reaktionspuffer für 2 Stunden oder über Nacht bei 37°C bzw. der angegebenen Reaktionstemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit Probenpuffer versetzt und über ein Agarosegel analysiert, eventuell schloss sich eine Gelextraktion an (siehe Kapitel 2.2.2.2.5).

2.2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Mit Hilfe der PCR können selektiv bestimmte DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Hierzu werden *primer* verwendet, die zu den Ausgangs-DNA Strängen (*template*) komplementär sind und das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren. Die Oligonukleotide können darüber hinaus überhängende Enden besitzen, so dass das amplifizierte DNA-Fragment anschließend mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einen Vektor kloniert werden kann.

Alle PCR-Reaktionen wurden entweder mit REDTaq[®] DNA-Polymerase (Sigma) oder mit *Pfu* DNA-Polymerase (Promega) durchgeführt.

Zur Amplifizierung von Fragmenten aus genomischer Plasmodien-DNA wurde folgender Ansatz gewählt:

0,5-2 µl *template*-DNA

0,5 µl *Primer* 1 (50 µM)

0,5 µl *Primer* 2 (50 µM)

5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer

5 µl dNTPs

0,5-2 µl *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerase (5 U/ml)

H₂O *ad* 50 µl

Die verwendeten Oligonukleotide sind im Materialien-Abschnitt zusammengefasst (siehe Tab. 2.2). Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu erwartenden DNA-Fragments, wobei man bei der Taq-Polymerase 1 min für 1 kb berechnet.

Ein standardmäßiges PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

- Schritt 1: Denaturierung der DNA Doppelstränge: 94°C, 5 Minuten
- Schritt 2: Denaturierung der DNA Doppelstränge: 94°C, 30 Sekunden
- Schritt 3: Anlagerung der Oligonukleotide (*Annealing*): 55°C, 30 Sekunden
- Schritt 4: Neusynthese der DNA Stränge (*Extension*): 60°C, 2-5 Minuten
- Schritt 5: Elongation: 60°C, 10 min
- Schritt 6: Lagerung: 4°C, ∞.

Die Schritte 2-4 wurden in 30-35 Zyklen wiederholt.

Die Modifikation der PCR-Extensionsphase (60°C statt wie üblich 72°C) wurde aufgrund des hohen AT-Gehalts der Plasmodien-Gene gewählt [187]. Das Ergebnis der PCR wurde in einem analytischen Agarosegel untersucht. Die Entfernung von nichteingebauten Nukleotiden, Enzymen, Salzen und Primern aus den PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2.2.3 Real Time-PCR

Als weitere molekularbiologische Methode kam die *Real Time*-PCR zum Einsatz. Bei dieser Methode kann die Nukleinsäure-Produktbildungskurve in Echtzeit verfolgt und innerhalb der exponentiellen Phase deren Ausgangsmenge quantifiziert werden. Die Produktzunahme wird durch Messung der produktabhängigen Fluoreszenz erfasst. Als Fluoreszenzfarbstoff für dsDNA wurde SYBR Green I innerhalb des SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix Kits verwendet. Die in den PCR-Versuchen eingesetzte *Plasmodium*-Blutstadien cDNA wurde mittels reverser Transkription wie in Kapitel 2.2.2.3.2 beschrieben nach DNase I Behandlung hergestellt, wobei jeweils Aliquots von 800 ng RNA übersetzt wurden. Zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen und Überprüfung der *Annealing*-Eigenschaften der *primer* wurde eine Standard-PCR vor dem jeweiligen *Real Time*-PCR-Lauf durchgeführt und die Produktbildung mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die verwendeten *primer* sind in der Tabelle 2.2D aufgelistet. Die 20 µl-Pipettieransätze der zu untersuchenden verdünnten Proben wurden nach einem selbst erstellten Pipettierplan durchgeführt, der eine probenindividuelle cDNA Verdünnungsreihe sowie eine Vierfachmessung der jeweiligen Probe vorsah. Die *Real Time*-PCR erfolgte in der Rotorgene PCR-Maschine anhand eines den Erfordernissen der jeweiligen Gene entsprechend programmierten Amplifikations- und

Analyseprofils. So konnten am Ende die Schmelzpunkte der PCR-Produkte, die Amplifikationseffizienz und der Fluoreszenzsignal-Schwellenwert der exponentiellen Amplifikation (Ct-Wert) bestimmt werden.

Die *Real Time*-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Werte zwischen den auf ein Referenzgen normalisierten WT Parasiten und Plrx-defizienten Parasiten zu vergleichen. Dies diente der Ermittlung des relativen Expressionsunterschiedes (*Ratio*). Als Referenzgen diente ein *housekeeping* Gen, für *P. berghei*, die Seryl-tRNA Synthetase.

2.2.2.2.4 Dephosphorylierung

Um in Ligationsansätzen die Religation geschnittener Vektoren zu vermeiden, wurden die gespaltenen Plasmid-Moleküle dephosphoryliert. Hierzu wurden nach dem Verdau der DNA 10% (v/v) Dephosphorylierungs-Puffer (Roche) und 1-5 U alkalische Phosphatase (Roche) zugegeben und die Reaktion ca. 10 min bei 37°C inkubiert.

2.2.2.2.5 Gelextraktion

Auf Agarosegele aufgetragene DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück aufgereinigt.

2.2.2.2.6 Ligationen

Zur Klonierung aufgereinigter (siehe Kapitel 2.2.3.2.2) PCR-Produkte wurde das pGEM[®]-T easy Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Gerichtete Klonierungen von nach Restriktionsenzymverdau aufgereinigten DNA-Fragmenten wurden in einem Gesamtansatz von 20 µl, bestehend aus 1 µl Quick T4-DNA-Ligase (NEB), 10 µl 2x Quick T4- Ligase-Puffer, variierenden Mengen der beiden zu ligierenden Partner (im Bereich von je 50 ng - 3 µg DNA) und H₂O, 15 min bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 14°C ligiert. Die gezielte Ligation von aufgereinigten DNA-Fragmenten wurde dabei durch Aneinanderlagerung enzyspezifischer Überhänge erleichtert.

2.2.2.2.7 Konstruktion der Transfektionsvektoren

Zur stabilen Inaktivierung der in dieser Arbeit untersuchten Gene wurden verschiedene Transfektionsvektoren hergestellt: ein Integrations-Vektor und ein *replacement*-Vektor im Fall des *Plrx*-Genes und ein *replacement*-Vektor zur stabilen Inaktivierung des *TrxR*-Genes (Erklärung der verschiedenen Strategien erfolgt unter Kapitel 2.2.4.3). Zur Ausschaltung des *GR*-Genes wurden verschiedenste Strategien unter Nutzung unterschiedlicher Transfektionsvektoren und verschiedener Regionen der Homologie angewandt.

Der generelle Klonierungsablauf der Transfektionskonstrukte war für alle Vektoren derselbe und beinhaltete folgende Schritte: (i) Amplifizierung der entsprechenden flankierenden oder kodierenden Genabschnitte unter Nutzung genomischer *Plasmodium*-DNA (siehe Kapitel 2.2.2.2.2), (ii) T/A-Klonierung dieser Fragmente (siehe Kapitel 2.2.2.2.6), (iii) Umklonierung der Fragmente durch Gelelution (siehe Kapitel 2.2.2.2.5 und 2.2.2.2.6) in den Transfektionsvektor nach Verdau mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (siehe Kapitel 2.2.2.2.1), (iv) Verifizierung der positiven Klone (siehe Kapitel 2.2.1.1.4) und Herstellung einer für die Transfektion ausreichenden Menge Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.2.2.1.1). Im Folgenden werden die hergestellten Transfektionskonstrukte unter Angabe der verwendeten *primer* (siehe Tabelle 2.2A), der Größe der resultierenden Fragmente und der verwendeten Transfektionsvektoren aufgelistet.

Transfektionsvektoren für *Plrx* und *TrxR*

p*TrxR*(-)REP Für den *replacement*-Transfektionsvektor wurden aus genomischer DNA von *Plasmodium berghei* (ANKA-GFP) zwei Sequenzen amplifiziert, die das *TrxR*-Gen links und rechts flankieren. Die Sequenz *TrxRrepI* besteht aus 800 bp und für *TrxRrepII* wurden ebenfalls 800 bp amplifiziert. Dabei wurden die Oligonukleotide *TrxRrep1for* und *TrxRrep1rev*, für das *TrxRrepI*-Fragment und *TrxRrep2for* und *TrxRrep2rev* für das *TrxRrepII*-Fragment verwendet. Diese Fragmente wurden anschließend in den *P. berghei* Transfektionsvektor b3D.DT^H.^{AD} kloniert.

p*Plrx*(-)INT Dieses Plasmid trägt ein Teil des *Plrx*-Genes, welches sich aus den zwei Fragmenten *PlrxintI* (210 bp) und *PlrxintII* (230 bp) zusammensetzt. Diese Fragmente wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden *Plrxint1for* und *Plrxint1rev* für das *PlrxintI*-Fragment und mit den Oligonukleotiden *Plrxint2for* und *Plrxint2rev* für das *PlrxintII*-Fragment aus *P. berghei* genomischer DNA (NK 65) amplifiziert. Im Vergleich zum gesamten *Plrx*-Gen fehlen am 5'-Ende 30 bp und 25 bp am 3'-Ende. Die Fragmente *PlrxintI* und *PlrxintII* wurden anschließend in den *P. berghei* Transfektionsvektor b3D.DT^H.^{AD} kloniert. Die

Zusammensetzung des *Plrx*-Genabschnittes aus zwei Fragmenten wurde benötigt, um eine interne *Spel*-Schnittstelle einzufügen, die der nachfolgenden Linearisierung diene.

pPlrx(-)REP Für den *replacement*-Transfektionsvektor wurden aus *P. berghei* genomischer DNA (NK 65) zwei Sequenzen amplifiziert, die das *Plrx*-Gen links und rechts flankieren. Die Sequenz *Plrxrepl* besteht aus 575 bp und für *PlrxreplII* wurden 590 bp amplifiziert. Dabei wurden die Oligonukleotide *Plrxrep1for* und *Plrxrep1rev*, für das *Plrxrepl*-Fragment und *Plrxrep2for* und *Plrxrep2rev* für das *PlrxreplII*-Fragment verwendet. Diese Fragmente wurden anschließend in den *P. berghei* Transfektionsvektor b3D.DT^H.^{AD} kloniert.

Transfektionsvektoren für GR

Um durch *gene targeting* das *GR*-Gen in *P. berghei* auszuschalten, wurden verschiedenste Transfektionsvektoren hergestellt, die entweder auf der Integrations-Strategie oder der *replacement*-Strategie beruhen.

pPyGR_INT Für den pPyGR_INT-Vektor wurde aus genomischer DNA von *P. yoelii* nahezu das komplette *yGR*-Gen amplifiziert. Dieses 1,54 kb große *PyGRINT*-Fragment wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden *OpyGRs* und *OpyGRas* amplifiziert. Das entstehende Fragment wurde anschließend in den Transfektionsvektor b3D.DT^H.^{AD} kloniert.

pPbGR_INT Dieses Plasmid trägt einen 1,56 kb großen Teil des *P. berghei* *GR*-Gens, welches mit den *primern bGRintfor* und *bGRintrev* aus genomischer *P. berghei* (ANKA-GFP) DNA amplifiziert wurde. Dieses Fragment wurde anschließend in den *P. berghei* Transfektionsvektor b3D.DT^H.^{AD} kloniert. Dieser Sequenz fehlen im Vergleich zum kompletten *P. berghei* *GR*-Gen am 3'-Ende 220 bp.

pPbGR_REP Für den *replacement*-Transfektionsvektor wurden aus *P. berghei* genomischer DNA (ANKA-GFP) zwei Sequenzen amplifiziert, die das *GR*-Gen links und rechts flankieren. Die Sequenz *GRrepl* besteht aus 790 bp und für *GRreplII* wurden 790 bp amplifiziert. Dabei wurden die Oligonukleotide *GRrep1for* und *GRrep1rev*, für das *GRrepl*-Fragment und *GRrep2for* und *GRrep2rev* für das *GRreplII*-Fragment verwendet. Diese Fragmente wurden anschließend in den *P. berghei* Transfektionsvektor b3D.DT^H.^{AD} kloniert.

pPbGR_REP+ Für diesen *replacement*-Transfektionsvektor wurden aus *P. berghei* genomischer DNA (ANKA-GFP) zwei Sequenzen amplifiziert, die das *GR*-Gen links und rechts flankieren. Im Gegensatz zu dem Transfektionsvektor *pPbGR_REP* liegen die flankierenden Regionen unmittelbar oberhalb bzw. unterhalb des *PbGR*-Gens. Die Sequenz *GRrepl+* besteht in diesem Fall aus 780 bp und für *GRreplII+* wurden 560 bp amplifiziert. Dabei wurden die Oligonukleotide *GRrep1for+* und *GRrep1rev+*, für das *GRrepl+*-Fragment

und *GRrep2for+* und *GRrep2rev+* für das *GRrepII+*-Fragment verwendet. Diese flankierenden Sequenzen wurden in den modifizierten Transfektionsvektor *b3D.DT^H.^D* kloniert.

pPbGR_CONTROL Dieses Transfektionsplasmid enthält einen 1,48 kb großen Teilbereich des 1,78 kb großen *PbGR*-Gens, welchem im Vergleich zum kompletten *P. berghei GR*-Gen am 3'-Ende 300 bp fehlen. Zusätzlich umfasst das klonierte Fragment dieses Vektors 640 bp der 3'UTR dieses Genabschnittes. Diese Region wurde unter Nutzung der Oligonukleotide *GRfor* und *GRrevII* aus genomischer DNA von *P. berghei* (ANKA-GFP) amplifiziert und das entstehende 2,12 kb große Produkt in den Transfektionsvektor *b3D.DT^H.^D* kloniert.

pGR::PfGR Bei diesem Transfektionsvektor handelt sich um eine modifizierte Version des Plasmids *pPbGR_REP+*. Unter Nutzung der Oligonukleotide *PfGRstart* und *PfGRend* wurde das gesamte *P. falciparum GR*-Gen unter Nutzung von *Pf* cDNA als *template* amplifiziert. Nach Verifizierung der korrekten Sequenz (siehe Kapitel 2.2.2.1.5) unter Nutzung der in Tabelle 2.2B genannten und *pGEM[®]-T easy*-spezifischen Sequenzprimern wurde das resultierende, 1,5 kb große Fragment in *pPbGR_REP+* kloniert.

2.2.2.2.8 Genotypisierungen

Um zu überprüfen, ob die eingesetzten Transfektionsvektoren in das *Plasmodium* Genom integriert wurden, erfolgten genotypische Untersuchungen der entstehenden rekombinanten Parasiten. Für die Angabe der verwendeten *primer* siehe Tabelle 2.2C.

- Genotypisierung der *Plrx(-)* Parasiten. Zur *replacement*-spezifischen Amplifikation wurden folgende Oligonukleotid-Kombinationen eingesetzt: *Primerkombination* 3`test (*Tgfor/Plrxtestrev*) und *Primerkombination* 5`test (*Tgrev/5`testfor*). Als weitere Oligonukleotid-Kombination diente WT (*Plrxstart/Plrxend*).
- Genotypisierung der *TrxR(-)* Parasiten. Zur *replacement*-spezifischen Amplifikation wurden folgende Oligonukleotid-Kombinationen eingesetzt: *Primerkombination* 3`test (*Tgfor/TrxR_3`testrev*) und *Primerkombination* 5`test (*Tgrev2/TrxR_5`testfor*). Als weitere Oligonukleotid-Kombination diente WT (*TrxR_start/TrxR_end*).
- Genotypisierung der *bGRCONTROL* Parasiten. Zur Integrations-spezifischen Amplifikation wurden folgende Oligonukleotid-Kombinationen eingesetzt: *Primerkombination* 3`test (*Tgfor/GRtestrev*) und *Primerkombination* 5`test (*T7rev/GRtestfor*).
- Genotypisierung der Δ *GR::PfGR* Parasiten. Zur Integrations-spezifischen Amplifikation wurden folgende Oligonukleotid-Kombinationen eingesetzt: *Primerkombination* 3`test (*B3D+for/GR_test3`rev*) und 5`test (*B3D+rev/GR_5`testfor*). Der *P. berghei*-spezifischen

Amplifikation dienten die Oligonukleotide PbGR_lafor und PbGR_IIbrev, der *P. falciparum*-spezifischen Analyse dienten die *primer* PfGR_Idfor/Pf_seq2rev.

2.2.2.2.9 Konstruktion des *Pb* Plrx-Überexpressionsvektors

Um rekombinantes *P. berghei* Plasmoredoxin als Positivkontrolle zur Überprüfung des hergestellten polyklonalen anti-Plrx Antiserums (Herstellung durch Immunisierung von Kaninchen mit den synthetischen Peptiden der N-terminalen Region von *Pb*Plrx : Plrx-1: CYYKNNELKKIDSSYFQDKY and Plrx-2: CKVDKALEHSTQNEAPSK durch Eurogentec, Seraing, Belgien) testen zu können, wurde das *P. berghei* *Plrx*-Gen aus *Pb* Blutstadien cDNA mit den Oligonukleotiden *Plrx*start und *Plrx*end (siehe Tabelle 2.2A) amplifiziert. Das entstehende 528 bp große Fragment wurde mit der T/A-Methode kloniert und zur Überprüfung der korrekten Basenabfolge mit pGEM[®]-T easy-spezifischen Sequenzprimern sequenziert. Nach Verifikation der fehlerfreien Sequenz wurde das *Plrx*-Gen aus dem T/A-Vektor mit *Nde*I/*Xho*I Restriktionsverdau ausgeschnitten, geleluert (siehe Kapitel 2.2.2.2.5) und in den Expressionsvektor pET-28a(+) kloniert (siehe Kapitel 2.2.2.2.6). Dadurch erhielt das Protein nach erfolgter Überexpression einen C-terminal gelegenen Hexahistidyl-Tag, der die Aufreinigung mit Ni-NTA-Agarose ermöglichte (siehe Kapitel 2.2.7.2).

2.2.2.3 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA

2.2.2.3.1 mRNA-Isolierung

Um die Expression bestimmter Gene zu untersuchen, wurde mRNA über eine Silica- oder Oligo(dT)-Säule aus *Plasmodium berghei* Parasiten isoliert. Hierfür wurden die Reagenzien und Protokolle des NucleoSpin[®] RNA/Protein-Kits (Macherey-Nagel) und des Dynabeads[®] mRNA Purification Kits verwendet. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.3.2 RT (Reverse Transkription)-PCR

Bei der RT-PCR wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase die zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Das aus Retroviren stammende Enzym polymerisiert Desoxyribonukleosidtriphosphate zu komplementärer DNA in Gegenwart eines RNA-Moleküls als Matrize. Für die RT-PCR wurde das Verso cDNA Kit (Thermo Scientific) verwendet. Mit Hilfe von Oligo(dT)-Oligonukleotiden wurden aus der Gesamt-RNA alle

mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Um die mRNA auf DNA-Kontaminationen zu überprüfen, wurde zu jeder Reaktion eine Minus-RT-Kontrolle durchgeführt. Die Minus-RT-Kontrolle enthielt alle Reagenzien für die RT-PCR außer der Reversen Transkriptase. Dies gab Aufschluss darüber, dass es sich bei der Matrize für das PCR-Produkt um cDNA und nicht um genomische DNA handelt. Vor der cDNA Synthese wurde die RNA für 5 min auf 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen.

Für die Reaktion wurde 100 ng - 1 µg mRNA mit 4 µl 5 x cDNA Synthesepuffer, 1 µl oligo-dT *primer*, 2 µl dNTP Mix, 1 µl RT-*Enhancer* und 1 µl Verso Enzymmix gemischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl addiert. Dieser Ansatz wurde für 1,5 Stunden bei 42°C inkubiert. Um die Enzymaktivität der Reversen Transkriptase zu inaktivieren und damit die Reaktion abzuschließen, wurde das Gemisch für 2 Minuten auf 95°C erhitzt. Die cDNA konnte anschließend mit Hilfe einer PCR analysiert werden.

2.2.3 Zellkulturmethoden

2.2.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Zellen, die adhärent in Monolayerkulturen in Petrischalen oder Flaschen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßigen Wechsel des Mediums. Sie sollten vor Erreichen der vollständigen Konfluenz subkultiviert werden [111].

Um adhärent wachsende Zellen passagieren zu können, mussten sie durch eine Trypsin-Behandlung vom Boden der Kulturflaschen und von den Nachbarzellen gelöst werden. Um das im Medium enthaltene FCS zu entfernen, wurden die Zellen mit 10-15 ml HBSS (Gibco Invitrogen) gewaschen. Anschließend wurde soviel Trypsin/EDTA (Gibco Invitrogen) auf die Zellen gegeben, dass sie gerade bedeckt waren. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, konnten die freien Zellen in Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt werden. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. In dieser Arbeit wurden zwei Hepatozyten-Zelllinien verwendet, HepG2- und Huh7-Zellen.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Um definierte Zellzahlen ausplattieren zu können, ist die genaue Bestimmung der Zellzahl nötig. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen nur sehr langsam, zu dicht ausgesäte können

ihren Phänotyp verändern. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnten Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung ausgezählt werden [111].

$(\text{Anzahl Zellen in 4 Quadraten}/4) \times 10^4 \times \text{Verdünnung} = \text{Anzahl Zellen/ml}$.

2.2.3.3 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Wenn eine Zelllinie nicht permanent in Kultur gehalten werden soll, so kann man die Zellen einfrieren. Zellen wurden mittels Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Einfriermedium (*freezing-solution*) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und langsam bei -80°C eingefroren. Die Einfrierbox enthielt Isopropanol, das pro Minute um 1°C abkühlt. Eingefrorene Zellen konnten dann in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden zuerst in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und es wurden 15 ml des entsprechenden Mediums hinzugegeben. Anschließend wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in die Zellkulturflaschen überführt. Am darauffolgenden Tag wurde bei allen aufgetauten Zellen das Medium gewechselt.

2.2.4 Methodik *Plasmodium berghei*

2.2.4.1 Mikroskopische Darstellung von *P. berghei* mittels Giemsa-Färbung

Zur Unterscheidung der einzelnen Parasitenstadien und zur Bestimmung der Parasitämie wurde ein Blutausstrich gemacht, der anschließend mit Giemsa gefärbt wurde.

Der Maus bzw. Ratte wurde durch Schwanzpunktion mit einer Kanüle ein Tropfen Blut entnommen, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet, in Methanol fixiert und anschließend in frisch angesetzter Giemsa-Färbelösung (1:10 in VE-Wasser) für 5-20 Minuten gefärbt. Die gefärbten Ausstriche wurden mit VE-Wasser abgespült, getrocknet und bei 100facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsoberktiv am Lichtmikroskop analysiert.

2.2.4.2 Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämie gibt die prozentuale Anzahl *Plasmodium*-infizierter Erythrozyten an. Zur Bestimmung der Parasitämie wurde ein Bereich des Objektträgers mit einlagiger Schicht Erythrozyten ausgewählt. In zehn nebeneinander liegenden Sichtfeldern wurde die Anzahl der Erythrozyten und der Parasiten ausgezählt. Mehrfachinfektionen, wenn vorhanden, wurden einfach gezählt. Die Parasitämie errechnete sich wie folgt:

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

2.2.4.3 Transfektion von *Plasmodium berghei*

Neben der Möglichkeit der stabilen Transfektion für die *Plasmodium*-Arten *P. falciparum*, *P. knowlesi* und *P. cynomolgi* [46] kann diese Technik auch bei den Mäusemalaria-Modellsystemen von *P. berghei* [129, 196, 202] und *P. yoelii* [92, 134] angewendet werden. Mit diesen *Plasmodium* Transfektionssystemen ist es möglich, die endogene Kopie eines Gens durch eine stabile Transfektion auszuschalten und dadurch die Funktion des Gens *in vivo* zu untersuchen. *Plasmodium* ist während der Mehrheit seines Lebenszyklus haploid. Dies erleichtert die Transfektion, denn somit kann die Funktion eines Proteins, das von einem *single-copy* Gen kodiert wird, mit nur einem Selektionsmarker untersucht werden. Der am häufigsten eingesetzte Selektionsmarker ist das *DHFR/TS*-Gen (siehe Kapitel 2.1.10.3). Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten zur stabilen Inaktivierung eines Gens im *Plasmodium* Genom [188] basierend entweder auf der Integrations- oder der *replacement*-Strategie. Für die Integration wurde eine interne Sequenz des zu untersuchenden Gens in den b3D.DT^H.^{AD}-Transfektionsvektor kloniert. Dieser deletierten Sequenz fehlen Teile am 5`- und am 3`-Ende, so dass nach Integration dieses Vektors in das Genom kein funktionelles Protein entstehen kann, da die endogenen Promotorelemente am 5`-Ende fehlen. Die Position der Integrationssequenz im Vektor ist im direkten Anschluss an die 3`UTR des Selektionsmarkers *TgDHFR/TS* zu finden. Das linearisierte Konstrukt führt in *P. berghei* zu einer homologen Rekombination mit dem endogenen Gen, wobei ein einfaches *crossover* Ereignis stattfindet (Abb. 2.1 A). Dadurch wird eine deletierte Version des zu untersuchenden Gens in das Genom des Parasiten eingeführt. Der durch die Integrations-Strategie duplizierte Gen-Locus enthält somit zwei, aufgrund des Fehlens der 3`UTR, die für die Expression und Stabilität der mRNA notwendig ist, bzw. der Promotorregion und des Startkodons, nicht-funktionelle Kopien des zu untersuchenden Gens. Dieser entstandene rekombinante Locus wird auch allelisch diploid genannt, da es nach der Integration zu einer Verdopplung der Sequenzen kommt.

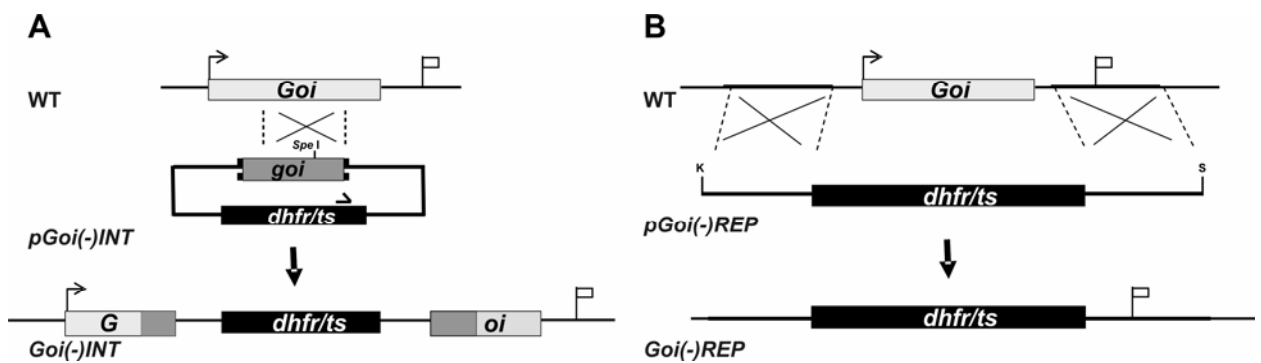


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Strategien zur Gen-Inaktivierung

Hierbei steht *Goi* für jedes Gen von Interesse (*gene of interest*). (A) Integrations-Strategie: Der Wildtyp-Locus eines endogenen Gens ist schematisch im oberen Teil sichtbar (WT), hierbei repräsentiert der Pfeil das Startkodon und die Fahne den Transkriptions-Stopp. Das Integrationskonstrukt *pGoi(-)INT* ist als Plasmid schematisch darunter dargestellt mit *SpeI*-Schnittstelle als Möglichkeit zur Linearisierung. Der rekombinante Integrationslocus, wie er nach der Transfektion erscheint, ist ganz unten dargestellt. Dabei entstehen zwei verkürzte Versionen des *Goi*, wobei einmal das 3'-Ende und einmal das 5'-Ende deletiert ist; das integrierte Plasmid mit dem *DHFR/TS*-Marker ist nur teilweise dargestellt. Der entstandene rekombinante Locus *Goi(-)INT* beinhaltet am 5'-Ende eine 3'-deletierte Gen-Kopie, die keine RNA-Prozessierungs-Sequenz mehr enthält, gefolgt von dem Selektionsmarker und einer 5'-deletierten nicht transkribierten Gen-Kopie. (B) *Replacement*-Strategie: Der WT-Locus (WT) wird mit dem *SacII(S)/KpnI(K)*-linearisierten Plasmid *pGoi(-)REP*, welcher die 5' und 3' UTR eines Gens enthält, transfiziert. Nach der homologen Rekombination durch ein doppeltes *crossover* Ereignis wird das Gen von Interesse durch den Selektionsmarker ersetzt; es resultiert der *Goi(-)REP*-Locus.

Als zweite Variante, einen endogenen Locus zu inaktivieren, wurde die *replacement*-Strategie verwendet (Abb. 2.1 B). Hierbei wurden zwei Gen-Sequenzen in den Vektor b3D.DT^AH.^AD kloniert. Diese Sequenzen kodieren hierbei für die beiden flankierenden Regionen des zu untersuchenden Gens. Die zwei Zielsequenzen wurden im Transfektionsvektor an die 5'- und 3'-Enden des Selektionsmarkers kloniert. Nach erfolgreicher Transfektion in *P. berghei* führt dieses Konstrukt zu einer stabilen Integration durch doppeltes *crossover* zwischen den beiden homologen Sequenzen im Konstrukt und im Genom. Dabei wird das endogene Gen durch den Selektionsmarker ausgetauscht. Der Vorteil der *replacement*-Strategie liegt darin, dass bei einer Integration das Zielgen im Genom komplett ersetzt wird, wodurch eine vollkommene Gen-Inaktivierung (*knock out*) gewährleistet ist. Außerdem ist sie im Gegensatz zur Integrations-Strategie wesentlich stabiler, da durch das doppelte *crossover* keine Reversion des mutierten Locus auftreten kann. Hingegen verdoppeln sich bei der Integrations-Strategie die homologen Regionen, indem zwei unvollständige Kopien entstehen. Diese beiden Kopien können rekombinieren, wodurch das Transfektionsplasmid herausgeschnitten wird und wieder die Wildtyp-Situation vorliegt (*excision repair*). Da aber lediglich ein *crossover* notwendig ist, kann die Integration effizienter generiert werden. Bei der Gen-Inaktivierung durch die *replacement*-Strategie wurde darauf geachtet, dass das Transfektionsplasmid jeweils an den Enden der homologen

Sequenzen geschnitten wurde, sodass der Selektionsmarker, von den homologen Regionen flankiert, von den pBlueskript-Vektor-Sequenzen (Vektor *backbone*) getrennt wurde. Dieser Vorgang ist wichtig, damit bei der Rekombination Concatamer-Bildung von linearen Molekülen ausgeschlossen werden kann [129].

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene *P. berghei* Transfektions-Methoden verwendet, sowohl die auf dem Biorad-Elektroporator basierende Methode [134, 188] als auch die auf dem Amaxa-Elektroporator basierende Methode [90, 92]. Die Elektroporationen der Vektoren zum Erreichen der Plasmoredoxin- und Thioredoxinreduktase-Gene folgte der Amaxa-Methode, während im Falle des Glutathionreduktase-Gens beide Methoden eingesetzt wurden.

2.2.4.3.1 Vorbereitungen der Transfektionsvektoren

Für eine Transfektion nach der Biorad-Methode wurden 30 bis 80 µg der durch Maxi-Präparation gewonnenen Plasmid-DNA eingesetzt. Der Transfektionsvektor wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht linearisiert und das Pellet nach einer Ethanol-Fällung (siehe Kapitel 2.2.2.1.2) am darauffolgenden Tag in 300 µl PBS (Gibco Invitrogen) aufgenommen. Die DNA wurde direkt für die Elektroporation eingesetzt. Für eine Transfektion mit der Amaxa-Methode wurden hingegen nur 5 µg Plasmid benötigt. Zunächst wurden 50 µg des entsprechenden Plasmids, welches aus einer Maxi-Präparation gewonnen wurde, präparativ verdaut und somit linearisiert. Dazu wurde mit den entsprechenden Enzymen 50 µg Plasmid geschnitten und anschließend mit Ethanol präzipitiert. Das DNA Pellet wurde in 100 µl ddH₂O aufgenommen – dieser Ansatz beinhaltete eine Konzentration von 50 µg DNA. Für die Transfektion wurden 10 µl (entspricht 5 µg) aus diesem Ansatz entnommen.

2.2.4.3.2 Parasiten-Präparation und *in vitro*-Kultivierung der Erythrozyten-Stadien

Parasiten der Pyrimethamin-sensitiven *P. berghei*-Stämme NK65 oder ANKA-GFP bzw. *P. yoelii* 17XNL wurden intraperitoneal in 100-150 g schwere Wistar-Ratten bzw. NMRI-Mäuse injiziert. Drei bis vier Tage nach der Injektion lag die Parasitämie zwischen 1 und 3%. Das Blut der Tiere wurde durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen und zu 10 ml Kulturmedium gegeben, welches 0,25 ml Heparinlösung in PBS (200 U/ml) enthält. Die roten Blutkörperchen wurden bei 1000 rpm für 8 Minuten zentrifugiert, wodurch zirka 3 ml Erythrozytenpellet erhalten wurde. Das Pellet wurde anschließend an der Sterilbank mit 50

ml Kulturmedium resuspendiert und in einen Erlenmeyerkolben überführt, in dem bereits 100 ml vorgewärmtes Kulturmedium vorgelegt war, so dass ein Endvolumen von 150 ml erreicht wurde. Die Kultur wurde in einem Inkubator mit einem Gasgemisch von 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂ bei 37°C über Nacht bei 77-80 rpm vorsichtig geschüttelt. Während dieser Zeit reiften die meisten Parasiten zu Schizonten. Am nächsten Tag erhielt man ein hohes Schizonten/Gametozyten-Verhältnis in der Übernachtkultur.

2.2.4.3.3 Isolation der Schizonten und Elektroporation

Die *P. berghei* bzw. *P. yoelii* Transfektion erfolgte durch Elektroporation einer Erythrozytenkultur von Schizonten-Stadien mit der Ethanol-gefällten Plasmid-DNA.

Die Übernachtkultur wurde nach 15-16 (*P. berghei*) bzw. 12 (*P. yoelii*) Stunden gestoppt und die Qualität mithilfe eines Blutausstriches (siehe Kapitel 2.2.4.1) bestimmt. Die Mehrheit der Parasiten sollten reife Schizonten sein, die von den nichtinfizierten roten Blutkörperchen mithilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation getrennt wurden. Je 35 ml der Übernachtkultur wurde auf 4 Falcon-Röhrchen verteilt und mit 10 ml 55% (*P. berghei*) bzw. 60% (*P. yoelii*) Nycodenz/PBS-Lösung vorsichtig unterschichtet. Es folgte ein 25minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm und Raumtemperatur ohne Bremse. Dieser Schritt führte zur Bildung eines Ringes aus Schizonten, welcher sich zwischen dem Nycodenz/PBS-Gradienten und dem Überstand aus Medium befand. Dieser Ring wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen gegeben, wobei Ringe von zwei Falcon-Röhrchen in ein neues Röhrchen überführt und auf 30 ml mit dem Überstand an Medium aufgefüllt wurden. Es folgte ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm und Raumtemperatur ohne Bremse.

Die anschließende Elektroporation unterschied sich zwischen dem Biorad- und dem Amaxa-Protokoll. Im Falle des Biorad-Protokolls wurden 100 µl des Schizonten-Pellets sofort zur Plasmid-DNA gegeben und das Gemisch in einer bereits vorgekühlten Elektroporationsküvette einem elektronischen Impuls von 800 V und 25 µFD ausgesetzt. Die Zeitkonstante lag zwischen 0,8 und 1,4 ms. Jeweils 200 µl elektroporierte Parasiten wurden in die Schwanzvene von jungen Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) bzw. Mäusen injiziert. Im Fall des Amaxa-Protokolls wurde das Schizonten-Pellet in 10 ml Transfektionsmedium resuspendiert und je 1 ml auf Eppendorfgefäße verteilt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 sec bei 13200 rpm. Die Elektroporation fand mit Hilfe des Amaxa-Elektroporators (Nukleofector) und des dazugehörenden Amaxa „Human T-Cell Nucleofactor Kit“ statt. Das Erythrozyten-Pellet wurde in 100 µl „Human T-Cell Solution“ + 10 µl DNA

(Transfektionsvektor, entspricht einer Konzentration von 5 µg) resuspendiert. Die Mischung wurde in eine spezielle Amaxa-Küvette gegeben und unter Nutzung des Programms 33 des „Amaxa Gene Pulsers“ elektroporiert. Nachfolgend wurden 50 µl Transfektionsmedium in die Küvette gegeben. Der Inhalt der Küvette mit den elektroporierten Parasiten wurde in eine Spritze aufgenommen und je 50 µl intravenös in 1-2 SD-Ratten bzw. Mäuse injiziert.

2.2.4.3.4 Parasiten-Selektion

Am Tag 1, dem ersten Tag nach der Elektroporation, hatten die injizierten Parasiten die Zeit einen Blutstadienzyklus komplett und ohne Selektionsdruck zu durchlaufen. Sowohl die Parasiten, die durch die Elektroporation die DNA mit dem *DHFR*-Resistenzmarker aufgenommen haben, als auch die verbliebenen Wildtyp-Parasiten konnten sich vermehren. In einem Giemsa-gefärbten Blutaussstrich (siehe Kapitel 2.2.4.1) sollten einige Parasiten zu sehen sein. Diese Mischpopulation wurde anschließend für die Gewinnung der *knock out*-Population selektioniert. 27 bis 30 Stunden nach der Elektroporation wurde mit der Pyrimethamin-Behandlung begonnen. Diese Behandlung variierte bei den zwei verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Transfektions-Protokollen.

Ablauf beim Biorad-Protokoll: Den Ratten wurde 25 mg/kg Körpergewicht Pyrimethamin intraperitoneal injiziert und dies alle 24 Stunden wiederholt, bis keine Parasiten mehr im Blutaussstrich sichtbar sind. Gewöhnlich dauerte diese Behandlung 3 bis 5 Tage. 8 bis 10 Tage nach der Elektroporation sollte eine Population Pyrimethamin-resistenter Parasiten (parentale resistente Population) im Blutaussstrich sichtbar werden. Diese Ratten wurden für weitere 2 bis 3 Tage mit Pyrimethamin behandelt, während dieser Zeit sollte die Parasitämie trotz Behandlung weiter ansteigen. Sobald die ersten Pyrimethamin-resistenten Parasiten sichtbar wurden, wurde diese Population in eine naive SD-Ratte oder in NMRI-Mäuse transferiert. Dazu wurden dem parentalen Tier 50-100 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen, mit 200 µl PBS/Heparin verdünnt und intraperitoneal in naive Tiere injiziert. Stieg bei diesen Tieren ebenfalls unter Pyrimethamin-Behandlung die Parasitämie an, erhielt man somit noch eine weitere resistente Population aus den Transfer-Tieren. Der Transfer gewährleistete eine weitere Selektion der resistenten Parasiten.

Ablauf beim Amaxa-Protokoll: Die Tiere wurden mit Pyrimethamin (70 ng/ml; pH 3,5-5,0) behandelt, welches mit dem Trinkwasser über eine Periode von 7 bis 10 Tagen verabreicht wurde. In den folgenden Tagen sollte die Wildtyp-Population sehr stark dezimiert sein und somit keine Parasiten mehr auf den täglich angefertigten Blutaussstrichen zu sehen sein. Erst ab Tag 6-8 hatte sich eine parentale, Pyrimethamin-resistente Population so stark vermehrt,

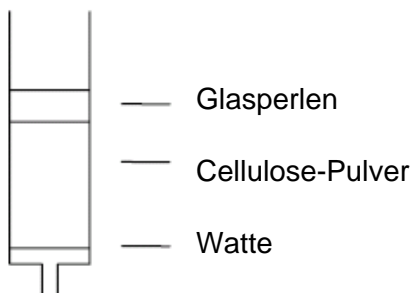
dass sie auf einem Blutausschlag nachweisbar war. In dieser parentalen Population befinden sich trotz Selektion nicht ausschließlich *knock out*-Parasiten, sondern auch immer noch ein gewisser Anteil an Wildtyp, der durch Mutation resistent geworden ist. Bei einer Parasitämie von >1,5% wurde das Blut der Tiere mittels Herzpunktion entnommen. Es wurde mit dem Blut auf dreierlei Wegen verfahren: (i) Es wurden Aliquots als Blutstabilate zur Langzeitaufbewahrung angefertigt (siehe Kapitel 2.2.4.4), (ii) ca. 150-200 µl Blut wurde intraperitoneal in eine naive SD-Ratte bzw. NMRI-Maus transferiert und (iii) aus dem restlichen Blut wurde die genomische DNA der parentalen Population für die anschließende Genotypisierung isoliert (siehe Kapitel 2.2.4.5). Auch von den sog. Transfer-Tieren wurden täglich Blutausschläge gemacht und die Parasitämie dokumentiert. Es wurde weiterhin durch Behandlung mit Pyrimethamin-haltigem Trinkwasser selektioniert. Bei einer Parasitämie von >1,5% wurde auch diesen Tieren das Blut entnommen und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

2.2.4.4 Blutstabilate

Für die langfristige Lagerung von Blutstadien der Parasiten wurden Stabilate angesetzt. Ein Teil Blut wurde mit zwei Teilen *freezing-solution* gemischt und in ein 2 ml Kryo-Röhrchen gegeben, welches sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde.

2.2.4.5 Isolierung von Parasiten aus Blut und Aufbereitung der genomischen DNA

Um die roten Blutkörperchen von den restlichen Blutbestandteilen zu trennen, wurde das Blut über eine Säule aufgearbeitet. Mit Hilfe von Glasperlen (*unwashed*, Sigma) wurden die Thrombozyten von den restlichen Blutbestandteilen abgetrennt, außerdem blieben an einer Celluloseschicht die Leukozyten haften. Durch Waschen der Säule mit PBS wurden somit unter anderem die infizierten Erythrozyten ausgespült.



Die Säule wurde aus einer 5 ml (für Mäuseblut) oder 20 ml (für Rattenblut) Spritze mit jeweils Watte, Cellulose-Pulver und Glasperlen hergestellt (siehe Skizze). Bevor das infizierte Blut über die Säule gereinigt wird, wurde die Säule mehrmals mit 1x PBS durchspült.

Die infizierten Erythrozyten konnten dann auf die äquilibrierte Säule gegeben und mit 1x PBS eluiert werden. Das gereinigte Eluat wurde in 15 ml (Mäuse) bzw. in 50 ml (Ratten) Falcon-Röhrchen gesammelt. Die roten Blutkörperchen wurden bei 1500 rpm für 8 Minuten pelletiert. Um die Zellwände der Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet nach der ersten Zentrifugation mit 0,2%-Saponin/PBS-Lösung behandelt. Die freigesetzten Parasiten wurden anschließend bei 2800 rpm für weitere 8 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Parasitenpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieses Gemisch wurde nachfolgend für 2 Minuten bei 7000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Zur Aufbereitung der genomischen Parasiten-DNA aus den Erythrozyten wurde der QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte genomische DNA wurde in 150-200 µl Elutionspuffer eluiert. Durch anschließende PCR mit spezifischen Oligonukleotid-Kombinationen (siehe Kapitel 2.2.2.2.8) konnten die Parasiten aus der Pyrimethamin-resistenten Population analysiert werden.

2.2.4.6 Klonierung von Parasiten

Für die Isolierung einer klonalen Population aus einer gemischten Parasiten-Population (Wildtyp und genetisch veränderte Parasiten) wurde das Blut mit der entsprechenden Parasiten-Population so weit verdünnt, dass ein Parasit pro Maus injiziert werden konnte. Dazu wurde der infizierten Ratte bzw. Maus das Blut entnommen, wenn die Parasitämie Werte zwischen 0,1 und 1% erreicht hat (Thaty und Menard, 2002). Hierbei ist zu beachten, dass die Parasitämie sehr exakt ausgezählt werden musste, um die Anzahl der infizierten Erythrozyten berechnen zu können.

Nach folgender Formel ließ sich die Anzahl infizierter Erythrozyten bestimmen:

$$7 \times 10^6 (\text{Erythrozyten}/\mu\text{l Blut}) \times \text{Parasitämie} \times 10^{-2} \text{ Parasiten}/\mu\text{l}.$$

Mit RPMI-Medium wurde das Blut entsprechend verdünnt, so dass sich statistisch gesehen nur ein Parasit in 100 µl Medium befand. Diese Verdünnungen wurden in jeweils 15-20 NMRI-Mäuse intravenös injiziert. Nach 8 bis 10 Tagen wurde die Parasitämie der Mäuse mit Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen überprüft. Sobald die positiven Mäuse eine Parasitämie von über 2% erreichten, wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen. 100 µl des Blutes wurden als Kryostabilat in Flüssigstickstoff weggefroren (siehe Kapitel 2.2.4.4) und von den

restlichen 900 µl wurde die genomische DNA der Parasiten isoliert (siehe Kapitel 2.2.4.5). Bei dieser wurde anschließend mittels PCR getestet, ob es sich um eine klonale Population handelte (siehe Kapitel 2.2.2.2.8).

2.2.4.7 Untersuchung der Exflagellation von *P. berghei* Gametozyten

Bevor *Anopheles*-Moskitos ihre Blutmahlzeit an *P. berghei*-infizierten Mäusen vornehmen konnten, musste sichergestellt werden, dass die männlichen Gametozyten ausreichend exflagellieren. Normalerweise findet die Exflagellation, d.h. die Differenzierung des Mikrogamonten in vier bis acht Mikrogameten, im Darm des Moskitos statt. Exflagellation kann unter anderem durch einen Temperaturabfall von 2-5°C induziert werden [181]. Diese Eigenschaft macht man sich *in vitro* zunutze, indem man die Parasiten aus dem Blut der Maus von 37°C auf Raumtemperatur bringt. Dazu wurde der Maus durch Schwanzpunktion ein Tropfen Blut entnommen, dieser auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Parasiten bei 40-facher Vergrößerung auf Exflagellation überprüft. Wenn man pro Gesichtsfeld durchschnittlich 4-6 exflagellierende Mikrogamonten sah, wurde das Tier für eine Blutmahlzeit verwendet.

2.2.5 Tierexperimentelle Methoden

2.2.5.1 Anästhesie und Blutentnahme von Ratten und Mäusen

Für die Isolierung der Parasiten aus dem Blut der Mäuse bzw. Ratten mussten die Tiere zunächst betäubt werden. Dazu setzte man das Tier in einen Glasbehälter, der mit Diethyläther getränkte Tücher enthielt. Nach 1-2 Minuten waren die Tiere betäubt und schmerzfrei und das Blut konnte mittels Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen werden. Das Blut wurde nachfolgend für die Herstellung von Blutstabilaten (siehe Kapitel 2.2.4.4), für die Isolierung genomischer DNA (siehe Kapitel 2.2.4.5) oder für die Injektion (siehe Kapitel 2.2.5.2) naiver Tiere genutzt.

2.2.5.2 Applikationsmethoden

Für die Infektion der Ratten bzw. Mäuse mit den Parasiten stehen verschiedene Applikationsmethoden zur Verfügung. Für die intraperitoneale (i.p.) Injektion wurde das Tier

entsprechend fixiert, während unter die Bauchdecke injiziert wurde. Für eine intravenöse (i.v.) Injektion wurde das Tier in eine Glasröhre gesetzt und der Schwanz in warmes Wasser getaucht, damit die Venen besser sichtbar waren, dann fand die Injektion in eine der Schwanzvenen statt.

2.2.6 Zellbiologische Methoden

2.2.6.1 *Anopheles*-Moskito Methodik

Nach der Aufnahme von Gametozytenstadien aus dem infizierten Blut der Ratten bzw. Mäusen während der Blutmahlzeit entwickeln sich die Parasiten im Mitteldarm der *Anopheles*-Mücke zu Oozysten (Detailbeschreibung des *Plasmodium*-Lebenszyklus, siehe Einleitung).

Um Oozysten untersuchen zu können, wurde den weiblichen *Anopheles*-Moskitos der Mitteldarm herauspräpariert. Die Oozysten konnten dann direkt unter dem Lichtmikroskop angeschaut und ausgewertet werden. Normalerweise haben sich bereits zwischen Tag 9 und 11 nach der Blutmahlzeit die ersten Oozysten in den Mitteldarmepithelien gebildet. Die Anzahl der Oozysten pro Moskito-Mitteldarm geben Auskunft über die Infektivität des einzelnen Moskitos.

Zur Isolation der Mitteldärme wurde die gewünschte Anzahl an Moskitos aus dem Käfig abgesaugt und durch einen Kälteschock von 3 Minuten bei -20°C betäubt. Die betäubten Moskitos wurden nacheinander auf eine Glasplatte mit RPMI/3% BSA gegeben und die Mitteldärme unter dem Binokular durch Beseitigen des Abdomens herauspräpariert. Die isolierten Mitteldärme wurden auf einem Objektträger mit RPMI/3% BSA abgelegt und mit einem Deckglas bedeckt. Somit konnten die Mitteldärme direkt unter dem Lichtmikroskop auf die Anwesenheit von Oozysten untersucht werden.

Zur Gewinnung von Mitteldarm-Sporozoiten wurden zunächst die Mitteldärme, wie oben bereits beschrieben, isoliert. Die Isolierung erfolgte an Tag 14 nach der infektiösen Blutmahlzeit, da zu diesem Zeitpunkt die Heranreifung der Oozysten im Mitteldarm bereits vorangeschritten ist und erste Mitteldarm-Sporozoiten freigesetzt werden. Nach der Präparation der Mitteldärme wurden diese in einem Eppendorfgefäß gesammelt und mithilfe eines Stößels homogenisiert. Dieses Homogenisat aus Mitteldarm, Sporozoiten und RPMI/3% BSA wurde für 3 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Sporozoiten befanden, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die pelletierten Mitteldärme wurden erneut mit ca. 300 µl RPMI/3% BSA versetzt und ein zweites

Mal homogenisiert. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurden beide Überstände vereinigt.

An Tag 14 bis 18 nach der Blutmahlzeit wurden die Speicheldrüsen-Sporozoitien aus den Moskitos isoliert. Dazu wurden den betäubten *Anopheles*-Moskitos die Speicheldrüsen herauspräpariert und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit RPMI/3% BSA gesammelt. Zur Gewinnung der Speicheldrüsen-Sporozoitien wurde auch dieses Gemisch aus Speicheldrüsen und RPMI/3% BSA homogenisiert und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.2.6.1.1 Bestimmung der Sporozoitienzahl

Um die genaue Anzahl der Sporozoitien aus dem Mitteldarm sowie aus den Speicheldrüsen pro Mosquito bestimmen zu können, wurden die Sporozoitien-Suspensionen in geeigneter Verdünnung in der Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel ausgezählt:

$(\text{Anzahl Sporozoitien in 4 Quadraten}/4) \times 10 \times \text{Verdünnung} = \text{Anzahl Zellen}/\mu\text{l}$,

$\text{Anzahl Sporozoitien}/\mu\text{l} \times \text{Volumen der Suspension}/\text{Anzahl Moskitos}/\text{Infektivität} = \text{Anzahl der Sporozoitien pro Mosquito}$.

2.2.6.2 *Plasmodium berghei*-spezifische zellbiologische Experimente

2.2.6.2.1 *Gliding Motility-Assay* der *Plasmodium berghei* Sporozoitien

Mit Hilfe dieser Methode konnte das typische Bewegungsmuster der Sporozoitien untersucht werden. Beim *gliding* über eine BSA-beschichtete Oberfläche hinterlassen Sporozoitien eine Spur von Oberflächenproteinen, welche durch Antikörper angefärbt werden kann.

Hierzu wurde ein 8 *well* Objektträger mit je 30 μl RPMI/3% BSA pro *well* für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Oberfläche mit BSA zu bedecken. Dann wurden für weitere 15 Minuten bei 37°C die isolierten Sporozoitien auf die beschichteten *wells* des Objektträgers zugegeben. Diese wurden anschließend für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Fixierungsschritt erfolgten Waschschrirte mit PBS/1% FCS und ein 15minütiger Blockierungsschritt mit PBS/10% FCS bei 37°C. Als erster Antikörper wurde anti-*PbCSP* für 45 Minuten bei 37°C auf die Sporozoitien gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/1% FCS wurden die Sporozoitien mit dem sekundären Immunfluoreszenz-Antikörper anti-Maus Alexa-Fluor 488 inkubiert. Drei letzte Waschschrirte erfolgten, bevor das Präparat mit 50% Glycerol in PBS eingebettet und mit Nagellack luftdicht verschlossen wurde. Die

Bewegungsspuren der Sporozoiten konnten nachfolgend direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

2.2.6.1.2 EEF-Entwicklungsassay mit *P. berghei* Speicheldrüsen-Sporozoiten

Bevor *Plasmodium* Parasiten die Erythrozyten infizieren, durchlaufen die Sporozoiten in den Hepatozyten ein Stadium der Schizogonie, bei dem sie als Exo-erythrozytäre Form (EEF) vorliegen. *In vitro* können diese Stadien in Hepatozyten-Zellen (HepG2/Huh7) kultiviert und nach Antikörperfärbung analysiert werden [61].

Zur Analyse von EEF-Formen wurden 1 Tag vor dem Experiment die Hepatozyten (Huh7 oder HepG2) in *Chamberslides* (Nunc, Wiesbaden) ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von $3 \times 10^4/\text{well}$ (Gesamtvolumen 400 μl) ausgesät und bei 37°C inkubiert. Für das Experiment wurden in 100 μl Suspension 10000 Sporozoiten pro *well* pipettiert und für die Invasion der Sporozoiten in die Hepatozyten 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Invasion der Sporozoiten wurde die Suspension von den Zellen abgenommen, die Hepatozyten mit vorgewärmtem Kulturmedium bedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Tag 2 wurde das Medium morgens und abends gewechselt und nach 48 Stunden wurden die Zellen mit kaltem Methanol für 10 Minuten fixiert und dreimal mit PBS/1% FCS gewaschen. Nach einem 30minütigen Blockierungsschritt mit PBS/10% FCS bei 37°C wurden die Zellen mit dem primären Antikörper anti-*PbCSP* bzw. anti-*PbHSP70* und dem sekundären Antikörper anti-Maus Alexa-Fluor 488 inkubiert und anschließend wurde das Präparat eingebettet (siehe oben) und luftdicht verschlossen. Die Entwicklung von Speicheldrüsen-Sporozoiten konnte auch zu jedem anderen beliebigen Zeitpunkt nach der Invasion in Hepatozyten gestoppt werden.

2.2.6.1.3 [3H] Hypoxanthin-Test

Der [3H] Hypoxanthin-Test arbeitet mit Hypoxanthin, einem Baustein der Nucleinsäuresynthese der Plasmodien. In diesen Verfahren werden die Parasiten Medikamenten nur für einen kurzen Zeitraum ausgesetzt. Die Plasmodien werden für 16 Stunden in verschiedenen Medium-Medikamenten-Verdünnungen inkubiert. Das normalerweise dem Medium zugesetzte Hypoxanthin fehlt. Anschließend gibt man mit Tritium radioaktiv markiertes Hypoxanthin hinzu, inkubiert weitere 8 h und misst nach Ernten der Plasmodien über einen Glasfilter, in wie weit der normalerweise stattfindende Hypoxanthineinbau durch die Anwesenheit des Medikamentes gehemmt wurde. Die

Ergebnisse werden als IC₅₀-Werte dargestellt (Effektive Dosis, die verglichen mit den Kontrollgruppen, den Einbau zu 50% hemmt).

Für den Testansatz (Protokoll freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sergio Wittlin, Basel, Schweiz) wurden zunächst Ausstriche der mit Plasmodien-infizierten Mäuse hergestellt und die Parasitämie bestimmt. Von einer infizierten Maus mit einer Parasitämie von 1 bis 5% wurde mit Herzpunktion 1 ml Blut entnommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Die Erythrozyten wurden in der Zentrifuge bei 3500 rpm für 5 Minuten pelletiert, der dabei entstehende Plasma- und *buffy coat*-Überstand wurde verworfen. Nach einmaligem Waschen der Erythrozytenpellets in *screening*-Medium wurden 500 µl der roten Blutzellen mit 9,5 ml desselben Mediums gemischt, um einen Hämatokrit von 5% zu erhalten. Nach Vorbereitung der Parasiten wurden die 96 *well* Platten für den Assay vorbereitet. Die Abb. 2.2 zeigt die generelle Platteneinteilung.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Positivkontrolle								Negativkontrolle			
B	Referenz-Substanz 1		Referenz-Substanz 2		Test-Substanz 1		Test-Substanz 2		Test-Substanz 3		Test-Substanz 4	
C												
D	Referenz-Substanz 1		Referenz-Substanz 2		Test-Substanz 1		Test-Substanz 2		Test-Substanz 3		Test-Substanz 4	
E												
F	Referenz-Substanz 1		Referenz-Substanz 2		Test-Substanz 1		Test-Substanz 2		Test-Substanz 3		Test-Substanz 4	
G												
H	Referenz-Substanz 1		Referenz-Substanz 2		Test-Substanz 1		Test-Substanz 2		Test-Substanz 3		Test-Substanz 4	

Abb. 2.2: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im *P. berghei* [3H] Assay

Jede Vertiefung einer 96 *well* Mikrotiterplatte erhielt 100 µl *screening*-Medium. In je zwei nebeneinander liegende Kammern der Reihe B wurden nachfolgend 100 µl der Anfangsverdünnung einer Substanz gegeben. Durch Umpipettieren von 100 µl aus dieser Reihe in die darunter liegende ergab sich eine Serienverdünnung von 1:2. So wurde bis zur Reihe H verfahren und der Überstand verworfen. Reihe A blieb ohne Substanz. Auf diese Weise konnten sechs Substanzen pro Platte in je sieben Konzentrationen untersucht werden. In sämtliche Vertiefungen der Platte bis auf A9-A12 wurden anschließend 100 µl der vorbereiteten Plasmodien gegeben. Die Kammern A9-A12 erhielten 100 µl einer 5%igen Erythrozytensuspension in *screening*-Medium als Negativkontrolle, A1-A9 dienten als Positivkontrolle. Die Ansätze wurden mindestens 16 Stunden inkubiert (3% O₂, 3%CO₂, 94% N₂). Danach wurde jeder Kammer der Platten 50 µl 3H-Hypoxanthin-Lösung hinzugefügt und erneut für 8 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Testplatten in einen Zellharvester gegeben, der die Zellen hämolysierte und auf eine Glasfaser-Filtermatte transferierte. Diese wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Folie eingeschweißt und

in einen Szintillationscounter gegeben. Nach Konvertierung der Daten in Excel-Format erfolgte die Ermittlung der IC₅₀-Werte.

2.2.6.1.4 *Plasmodium berghei* in vivo Wachstumsvergleichs-Test

Um *in vivo* einen Vergleich der Entwicklung verschiedener *P. berghei* Parasiten-Populationen anstellen zu können, wurde ein Wachstumsvergleichs-Test angewandt. Hierfür wurde das Blut mit den entsprechenden Parasiten so weit verdünnt, dass 1000 Parasiten pro Maus injiziert werden konnten. Dazu wurde der infizierten Maus das Blut entnommen, wenn die Parasitämie Werte zwischen 0,1 und 1% erreichte (Berechnung siehe Kapitel 2.2.4.7). Mindestens fünf Mäuse wurden mit jeweils 1000 Blutstadien-Parasiten der entsprechenden Population intravenös infiziert und der Verlauf der Parasitämie durch Giemsa-gefärbte Blutausstriche (siehe Kapitel 2.2.4.1) alle 12 Stunden untersucht. Derselbe Ansatz wurde gewählt, um *in vivo* die Sensitivität verschiedener *Plasmodium*-Populationen gegen Methylenblau (MB) zu untersuchen. Die Behandlung mit 50 mg/kg KGW MB startete direkt nach Injektion der Parasiten.

2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.2.7.1 Herstellung und Reinigung von Proteinen

2.2.7.1.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus *Plasmodium berghei*-Blutstadien

P. berghei-Blutstadien wurden wie bereits oben beschrieben aus den infizierten Ratten bzw. Mäusen isoliert. Das entstehende Parasitenpellet wurde im Verhältnis 1:1 mit 4 M Harnstoffpuffer gemischt, somit erhielt man eine Endkonzentration von 2 M Harnstoff. Danach erfolgte die Zugabe der Proteasinhhibitoren Pefablock (Endkonzentration 1 mg/ml Parasitenpellet) und Complete (40 µl/ml Parasitenpellet). Diese Mischung wurde 3-4x in flüssigen Stickstoff getaucht und zwischendurch aufgetaut, diese Schritte „knacken“ die Parasitenzellwand und ermöglichen die Freisetzung der zytosolischen Proteine. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge an (50000 rpm, 4°C). In dem entstehenden Überstand befanden sich die gelösten *Plasmodium*-Proteine, deren Konzentration nach Bradford bestimmt wurde (siehe Kapitel 2.2.7.4.1) und welche nachfolgend im Western Blot (siehe Kapitel 2.2.7.4.2) eingesetzt wurden.

2.2.7.1.2 Herstellung von Proteinrohextrakten

Die wie im Kapitel 2.2.1.1.5 beschrieben gewonnene Zellsuspension wurde ggf. auf Eis aufgetaut und mit US-Puffer, welcher zusätzlich 0,2 mg/ml Lysozym sowie 1 mg/ml DNase I enthielt, auf 10 ml aufgefüllt. Diese Mischung ließ man im Eisbad 30 min rühren, überführte sie in einen Zentrifugenbecher und zerstört die Zellen zusätzlich durch 3 Pulsfolgen à 35 sec mit jeweils 10 sec Pause bei 70%iger Leistung des Ultraschallgeräts. Im Überstand nach 30minütiger Zentrifugation bei 16000 rpm (31000 g, 4°C) befand sich der Inhalt des *E. coli*-Zytosols einschließlich der überexprimierten Proteine. Dieser Überstand wurde auf eine mit US-Puffer äquilibrierte Säule mit Ni-NTA-Agarose aufgetragen.

2.2.7.2 Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose

Der Plasmidvektor pET-28a(+) enthält N-terminal der eingefügten Sequenz die Kodierung für einen Hexahistidyl-Tag (sowie optional die Möglichkeit eines C-terminalen His-Tags), welcher durch seine Bindung an Ni²⁺ die Aufreinigung aus einem Proteinextrakt durch Metall-Affinitäts-Chromatographie ermöglicht. Das Säulenmaterial besteht aus Nickel-Nitrilotriessigsäure, welches an Sepharose CL-6B gekoppelt ist. Die durchschnittliche Bindungskapazität dieses Materials liegt bei 5-10 mg markiertem Protein pro ml Säulenmaterial.

Das Säulenmaterial wurde in einer Glassäule mit Glasfritte sedimentiert und mit mindestens 3 Säulenvolumen (SV) US-Puffer äquilibriert. Die Aufgabe der Proteinlösung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 8-10 sec pro Tropfen, der anschließende Waschschrift mit 3 SV US-Puffer mit 4-6 sec pro Tropfen. Danach wurde mit Lösungen steigender Imidazolkonzentrationen in US-Puffer gewaschen. Dabei sollten zunächst schwächer gebundene Proteine durch Imidazol von der Bindungsstelle verdrängt werden, um das gewünschte Protein danach möglichst sauber zu eluieren. In Falle der Aufreinigung von Plrx wurde die Säule nach Auftrag der Proteinlösung mit 5 SV US-Puffer und dann mit 5 SV 20 mM Imidazol gewaschen, gefolgt von 5 SV 75 mM Imidazol und letztlich 2 SV 200 mM Imidazol als Elutionsschritte. Nach der Elution des exprimierten Proteins wurde die Säule mit 5 SV 500 mM Imidazol gewaschen, mit US-Puffer nachgespült (mindestens 5 SV) und das Säulenmaterial in 20% Ethanol gelagert. Die Fraktionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert (siehe Kapitel 2.2.7.3) und proteinhaltige Fraktionen mittels Ultrazentrifuge (Centriprep 10k) eingengt.

2.2.7.3 Kontrolle mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophoresemethode nach Lämmli (Polyacrylamid-Gelelektrophorese = PAGE) [38] trennt Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel auf. Neben dem Molekulargewicht gibt es weitere Protein-Eigenschaften, wie beispielsweise die Faltung, welche die Laufeigenschaften beeinflussen. Um diese zu vermeiden, werden die Proteine in der Regel vor dem Auftrag reduziert und denaturiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich denaturierende Gele verwendet und es wurde unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet. Das Gel besteht prinzipiell aus zwei Abschnitten, dem großporigen Sammelgel (3,6% Acrylamid, pH 6,8) und dem engporigen Trenngel (10-15% Acrylamid, pH 8,8). Die Proteine, die durch im Probenpuffer enthaltenes β -Mercaptoethanol reduziert werden und durch das SDS eine negative Ladung erhalten, werden zunächst im Sammelgel konzentriert, um dann im Trenngel nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt zu werden. Im Rahmen dieser Arbeit kamen je nach Größe des zu kontrollierenden Proteins 10-15%ige Trenngele zum Einsatz. Beispielhaft gibt die in diesem Kapitel gezeigte Tab. 2.3 die Rezepte für vier 15%ige Gele, einschließlich 4%igen Sammelgelen, wieder.

Chemikalien	Volumina der Chemikalien für das Trenngel (15%)	Volumina der Chemikalien für das Sammelgel (4%)
H ₂ O	3,6 ml	3,05 ml
Puffer pH 8,8	3,75 ml	1,25 ml
Acrylamid/Bis	7,5 ml	0,65 ml
SDS (10% in H ₂ O)	0,5 ml	0,05 ml
10 % APS	75 μ l	25 μ l
TEMED	7,5 μ l	5 μ l

Tab. 2.3: Rezept für vier 15%ige SDS-Gele einschließlich der Sammelgele (4%)

Nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Ethanol überschichtet und polymerisierte in etwa 1 Stunde aus. Anschließend wurde das Ethanol abgegossen und mit einem Papiertuch vollständig abgenommen, daraufhin wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Nach Polymerisieren des Sammelgels (ca. 30 min) wurde das Gel vertikal in eine mit SDS-Kammerpuffer gefüllte Gelkammer gesetzt. Zur Probenvorbereitung wurde die Proteinlösung mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C zur besseren Denaturierung inkubiert. Die Auftragung der Proben erfolgte nach Abkühlung und kurzer Zentrifugation. Die Elektrophorese wurde in geschlossener Kammer bei einer Spannung von 120 V

durchgeführt. Erreichte die Indikator-Front das untere Gelende, so wurde die Spannung abgeschaltet, das Gel entnommen und gefärbt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Färbemethode war die Färbung mit Coomassie-Blau. Hierfür wurde das Gel 20 min in der Coomassie-Färbelösung auf dem Horizontalschüttler bewegt und nach Abspülen mit H₂O zweimal für jeweils 20 min in 40%igem Methanol mit 10%iger Essigsäure entfärbt. Die Proteinbanden blieben gefärbt und die Größe des Proteins konnte anhand des Markers abgeschätzt werden.

2.2.7.4 Proteinanalysen

2.2.7.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der gesammelten Fraktionen im Falle der Aufreinigung von rekombinantem *PbPlrx* bzw. der erstellten Parasitenproteinlösungen für Western Blot erfolgte sowohl nach der Methode von Bradford [29] als auch bei 280 nm im Biophotometer (mit dem jeweiligen Elutionspuffer als Nullabgleich).

- Proteinbestimmung nach Bradford

Der Quick Start BioRad Bradford Assay basiert auf der pH-abhängigen Farbänderung von Brilliant Blue G-250 bei Reaktion mit Proteinen. Dabei bindet der Farbstoff in erster Linie an basische und aromatische Aminosäurereste [41]. Mit einer Albumin Standardlösung (Rinderserumalbumin, 2 mg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe (1-20 µg/ml) sowie von der zu bestimmenden Probe eine ungefähre Verdünnung innerhalb der Messreihe hergestellt. Die Standardproben, eine Leerprobe und die zu bestimmende Proteinprobe wurden mit der fertigen BioRad Farbstofflösung versetzt und nach 15 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Von allen Ansätzen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Nach Abzug der Leerwertabsorption wurde der Probewert in die Geradengleichung der Eichkurve eingesetzt.

- Andere Proteinbestimmungen

Eine einfache Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen ist die Messung der Absorption bei 280 nm, die im Wesentlichen vom Gehalt an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, aber auch von Cystin (je nach Oxidationszustand) bestimmt wird. Bei bekannter Aminosäuresequenz kann der molekulare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ ermittelt werden. Er ergibt sich aus der Summe der Absorption von Tryptophan-, Tyrosin- und Cystinresten bei 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}] = n_{\text{Tyr}} \cdot 5,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} + n_{\text{Tyr}} \cdot 1,49 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} + n_{\text{Cys-S-S-Cys}} \cdot 0,125 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Enthält das Protein FAD, muss dessen Eigenabsorption bei 280 nm

mit berücksichtigt werden. Unter Einbeziehung des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Konzentration berechnet werden. Da die Absorption bei 280 nm relativ stark ist, wird diese Berechnung für verdünnte Proben herangezogen.

Konzentrationen von Flavoproteinen wie der TrxR [75] und der GR können auch allein durch das Absorptionsmaximum ihres Cofaktors FAD bei 463 nm ($\epsilon_{463\text{nm}} = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) photometrisch bestimmt werden. Diese Konzentrationsberechnung gilt in der Regel für unverdünnte Proteinlösungen.

2.2.7.4.2 Immunologischer Proteinnachweis (Western Blot)

Grundsätzlich stehen das *wet blot*-Verfahren mit vertikalem Gel bei 4°C und das *semidry*-Verfahren mit horizontalem Gel bei Raumtemperatur zur Verfügung. Letzteres fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung. Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 2.2.7.3 beschrieben durchgeführt. Vor dem Zusammenbau der Blot-Apparatur wurden die Geltransferpapiere in den verschiedenen Puffern für 15 min vorinkubiert (drei Papiere in Anodenpuffer I, zwei in Anodenpuffer II und 5 in Kathodenpuffer). Die PVDF-Membran (Roth) wurde für 1 min mit Methanol aktiviert und anschließend sofort im Anodenpuffer I äquilibriert. Die Graphitplatten des Blot-Geräts wurden mit Wasser gesättigt und der „Sandwich“ wie folgt geschichtet:

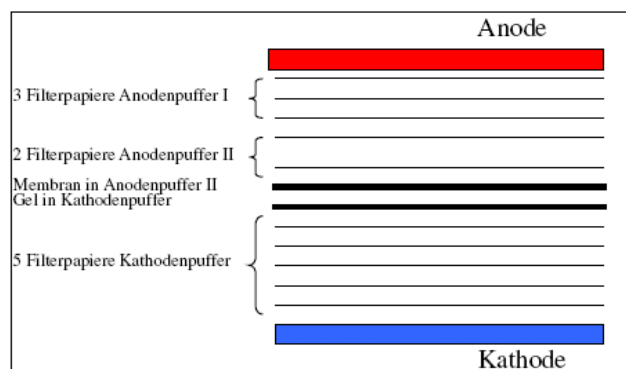


Abb. 2.3: Aufbau eines *semidry*-Blots

Dabei wurden Luftblasen durch Rollen mit einem Glasstab entfernt. Mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ wurde für 55 min geblottet. Die Proteine, durch die SDS-Beladung immer noch negativ geladen, wandern dabei in Richtung Anode und werden auf der PVD-Membran festgehalten. Letztere wurde direkt in TBS überführt. An dieser Stelle erfolgte zur Kontrolle eine reversible Färbung der Membran mit Ponceau-S (5 min). Zum immunologischen Nachweis wurde nach der Kontrollfärbung kurz mit Aqua_{dest.} gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5% Magermilchpulver in TBST-Puffer (w/v) bei 4°C über Nacht geblockt.

Daraufhin wurde zu dieser Blockierungslösung der erste Antikörper (Verdünnung je nach Antikörper 1:500 bis 1:2000, z.B. anti-Kaninchen *PbPlrx*) für 1 h schwenkend inkubiert (Wippe). Es folgten 2 x 10minütige und daraufhin noch 2 x 5minütige Waschschritte in TBST. Nachfolgend wurde die Membran 1 h in dem 1:1000 verdünnten Zweitantikörper, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist (z.B. anti-Kaninchen IgG-HRP, wiederum in 5% Magermilchpulver), inkubiert und gewaschen wie beschrieben.

Zum Sichtbarmachen wurde einerseits die Peroxidaseaktivität des Zweitantikörpers genutzt oder andererseits das deutlich sensitivere ECL-KIT zur Fluoreszenzfärbung (Amersham, Freiburg) verwendet. Die erste Methode erforderte das Inkubieren des Blots für 2-10 min in Entwicklerlösung, die Silber enthielt. War die gewünschte Intensität erreicht, wurde die Reaktion durch Waschen in Wasser gestoppt. Die zweite Methode unter Verwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurde je 1 ml der beiden Lösungen gemischt und auf die noch feuchte Membran pipettiert. Nach 1 min ließ man das Gel abtropfen, legte Frischhaltefolie glatt darüber, daraufhin in der Dunkelkammer einen Film der entsprechenden Größe, und belichtete in einer lichtdichten Box für 1 min bis über Nacht. Schloss sich an die ECL-Prozedur eine weitere Nachweisreaktion an, wurden die Blots gründlich in Aqua_{dest.} gewaschen und anschließend nach Angaben des Herstellers mit dem RestoreTM Plus Western Blot Stripping Buffer (Pierce) inkubiert. Anschließend wurde die Abschwemmung der Primär- und Sekundärantikörper durch einen ECL-Test überprüft, bevor sich die zweite Nachweisreaktion anschloss. In der vorliegenden Arbeit diente die zweite Nachweisreaktion der Ladungskontrolle des Western Blots; diese wurde mit einem anti-*Dictyostelium discoideum* actin Antiserum durchgeführt. Dieses Antiserum kreuzreagiert mit den Aktinen der Apikomplexa-Parasiten und wurde freundlicherweise von Dr. Markus Meissner (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.2.7.4.3 Enzymkinetik

Alle im Folgenden geschilderten Messungen wurden in einem temperierten Spektral-Photometer bei 25°C durchgeführt. Üblicherweise wurden die Messungen in einem Volumen von 1 ml über einen effektiven Lichtweg von 1 cm durchgeführt. Abweichungen von diesen Parametern sind gesondert im Ergebnisteil vermerkt.

Berechnung kinetischer Parameter

Grundsätzlich erfolgte die Berechnung kinetischer Parameter auf der Basis der Gleichungen von Michaelis-Menten. Voraussetzung ist, dass sich die Aktivität eines Enzyms bei steigender Substratkonzentration einem Maximum annähert und es dann zu keinem weiteren

Geschwindigkeitsanstieg sondern einer Abflachung der Kurve kommt. Die Geschwindigkeit berechnet sich dann als:

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

Als Enzymeinheit wurde hier statt der gültigen SI-Einheit *katal* [$\text{mol} \times \text{s}^{-1}$] die gebräuchlichere Einheit *Unit* [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$] verwendet. Dabei entspricht 1 *Unit* 1.67×10^{-8} *katal*. Die Michaelis-Konstante K_M entspricht dabei der Substratkonzentration, bei der $v = \frac{1}{2} V_{\max}$ entspricht. Unter der Voraussetzung, dass der Zerfall des Enzym-Substratkomplexes zum Produkt wesentlich langsamer abläuft als der Zerfall in die Ausgangskomponenten, entspricht K_M ferner der Assoziationskonstante des Komplexes [ES] und ist somit ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Nach Lineweaver und Burk lässt sich der in der obigen Formel wiedergegebene 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 Geraden zugrunde liegenden Formel gemäß Lineweaver-Burk berechnen.

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

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

Aus der Maximalgeschwindigkeit und der verwendeten Enzymkonzentration lässt sich ferner die Wechselzahl k_{cat} , d. h. der Substratumsatz pro Enzymmolekül und Zeiteinheit berechnen.

2.2.7.4.4 NAD(P)H Autooxidations-Aktivität der Disulfidreduktasen

Bei 25°C in Anwesenheit von 100 μM NAD(P)H und atmosphärischen Sauerstoff wurde der NAD(P)H-Umsatz bei 340 nm verzeichnet; dies geschah zuerst in Abwesenheit und nachfolgend in Anwesenheit der untersuchten Enzyme. Die dieser Reaktion innewohnende NAD(P)H Autooxidations-Aktivität wurde – nach Korrektur auf spontane NAD(P)H Oxidationsrate – kalkuliert [25]. Bei pH 5 war die erscheinende NAD(P)H Autooxidations-

Aktivität der *P. falciparum* GR 40-fach erhöht im Vergleich zur Autooxidations-Aktivität bei pH 7.

2.2.7.4.5 MB-Reduktionsaktivität der Disulfidreduktasen

Im Standardexperiment wurde 25 µl 4 mM NADPH zu 940 µl Assaypuffer hinzugefügt; dies führte zu einer Absorption von 0,62 bei 340 nm. Als nächstes wurden 3-30 µl 1 mM MB in Wasser zugegeben. Nach 5 min wurde die spontane Reaktion von NADPH und MB gemessen, repräsentiert durch $\Delta A_{\text{spont/min}}$. Nachfolgend wurde 5 µl 0,2 mM (11 mg/ml) GR beigefügt. Dies führte zu der Absorptionsabnahme $\Delta A_{\text{total/min}}$. Da MB durch Autooxidation von LeucoMB regeneriert wird, kann die NADPH-Oxidation bis zum vollständigen Verbrauch des NADPH ablaufen. In einem weiteren Experiment wurden 970 µl Puffer, 25 µl 4 mM NADPH und 5 µl konzentriertes Enzym gemischt. Die Absorptionsabnahme $\Delta A_{\text{NOX/min}}$ repräsentierte die der Reaktion innewohnende NADPH Autooxidations-Aktivität.

Die NADPH-Oxidation infolge der MB-Reduktion ist der folgenden Gleichung proportional:

$$\Delta A_{\text{MBR}} = \Delta A_{\text{total/min}} - \Delta A_{\text{spont/min}} - \Delta A_{\text{NOX/min}}$$

2.2.7.4.6 GR-Assay

Die Bestimmung der Glutathionreduktase-Aktivität erfolgt gewöhnlich unter Verwendung des physiologischen Substrates Glutathion. Die Reduktion von Glutathiondisulfid durch Glutathionreduktase erfolgt NADPH-abhängig und ist somit bei 340 nm messbar [106]. Die Reaktionsgleichung lautet:



Gemessen wurde die NADPH-Oxidation als Absorptionsabnahme bei 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) während der linearen Phase. Die Volumenaktivität der Enzymlösung errechnete sich nach folgender Formel:

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

Die Assay-Vorbereitungen folgten gewöhnlich dem Pipettierschema der Tab. 2.4.

Komponente	Konzentration
GR-Puffer	(ad 1 ml Gesamtvolumen)*
NADPH	ad 0.1 mM
GR	x µl
GSSG	ad 1 mM → Start

Tab. 2.4: Pipettierschema des GR-Assays

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenste Parameter mit dem GR-Assay gemessen. Zum einen wurde der K_M -Wert des physiologischen GR-Substrates, GSSG, gemessen; aber darüber hinaus auch der K_M -Wert für ein artifizielles Substrat, Methylenblau (MB). Dementsprechend variierten die Assay-Bedingungen:

Physiologisches Substrat (GSSG): In einem Endvolumen von 1 ml wurden in GR-Puffer zunächst NADPH und verdünnte GR gemischt. Die Enzymkonzentration lag meist um 2 U/ml. Nach Kontrolle der NADPH-Oxidaseaktivität zur späteren Berücksichtigung wurde mit GSSG gestartet.

Artifizielles Substrat (MB): In einem Endvolumen von 1 ml wurden in GR-Puffer zunächst NADPH und unverdünnte GR gemischt. Die Enzymkonzentration lag meist zwischen 100 und 300 U/ml. Diese erhöhte Enzymkonzentration war nötig, da MB kein physiologisches GR-Substrat ist. Nach Kontrolle der NADPH-Oxidaseaktivität zur späteren Berücksichtigung wurde mit MB gestartet.

2.2.7.4.7 TrxR-Assay

P. falciparum Thioredoxin 1, welches als Substrat sowohl der *Plasmodium* als auch der humanen Thioredoxinreduktasen dient, wurde wie beschrieben hergestellt [95] und im TrxR-Assay eingesetzt. Die Umsetzung des Thioredoxins folgt der Reaktionsgleichung $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{TrxS}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{Trx(SH)}_2$. Gemessen wurde die NADPH-Oxidation als Absorptionsabnahme bei 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) während der linearen Phase. Die Assay-Vorbereitungen folgten gewöhnlich dem Pipettierschema der Tab. 2.5.

Komponente	Konzentration
TrxR-Puffer	(ad 1 ml Gesamtvolumen)*
Thioredoxin	ad 20 μ M
TrxR	x μ l
NADPH	ad 100 μ M → Start

Tab. 2.5: Pipettierschema des TrxR-Assays

Die Variation der Assay-Bedingungen folgte analog den im Kapitel 2.2.7.4.6 genannten Bedingungen für das in diesem Fall physiologische Substrat Trx und das artifizielle Substrat MB.

2.2.7.4.8 Inhibitorstudien an *P. falciparum* und humanen Disulfidreduktasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss eines Inhibitors, Metylenblau, auf die Aktivität der *Plasmodium* Disulfidreduktasen Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase bzw. der humanen Enzyme untersucht.

Die Hemmung der *P. falciparum* GR (PfGR), TrxR (PfTrxR) bzw. der humanen GR (hGR) und TrxR (hTrxR) wurden im jeweiligen Assay-System üblicherweise mit den Standardsubstratkonzentrationen *in vitro* getestet. Alle angegebenen Werte repräsentieren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. In einem Endvolumen von 1 ml wurden im jeweiligen Puffer zunächst NADPH und verdünnte *Plasmodium* bzw. humane Disulfidreduktase gemischt. Die Enzymkonzentration lag meist um 2 U/ml. Nach Kontrolle der NADPH-Oxidaseaktivität (siehe Kapitel 2.2.7.4.4) zur späteren Berücksichtigung wurde mit GSSG bzw. Trx gestartet. Der somit ermittelte Wert repräsentiert die Enzymaktivität ohne Inhibitor (entspricht 100% Enzymaktivität des jeweiligen Enzyms).

Im Weiteren wurden in einem Endvolumen von 1 ml im jeweiligen Puffer zunächst NADPH, verdünnte *Plasmodium* bzw. humane Disulfidreduktase mit steigenden Konzentrationen von MB (3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 μ M MB) gemischt. Die Enzymkonzentration lag meist um 2 U/ml. Nach Kontrolle der NADPH-Oxidaseaktivität (siehe Kapitel 2.2.7.4.4) zur späteren Berücksichtigung wurde mit GSSG bzw. Trx gestartet. Weitere Berücksichtigung fand die im Kapitel 2.2.7.4.5 genannte MB-Reduktionsaktivität der Disulfidreduktasen. Die Auftragung der Enzymaktivitätswerte ohne Inhibitor (100%) und der abfallenden Enzymaktivitäten durch

steigende Inhibitorkonzentrationen ergab den Wert, an dem das jeweilige Enzym zu 50% in seiner Aktivität gehemmt wurde (IC_{50} -Wert des jeweiligen Enzyms).

3 Ergebnisse

Um zu klären, welche der in dieser Arbeit untersuchten redox-aktiven Proteine potentiell viel versprechende *drug targets* für Antimalariamittel sind, wurde die Essentialität der zugrundeliegenden Gene auf genetischer Ebene untersucht. Dies geschah mittels reverser Genetik in den Mäusemalaria-Modellsystemen von *Plasmodium berghei* und *P. yoelii*. Konnten rekombinante Parasiten mit definierter Gen-Inaktivierung erzeugt werden, wurde der resultierende Phänotyp im Verlauf des *Plasmodium*-Lebenszyklus untersucht; dies war der Fall für die Redox-Proteine Plasmoredoxin (Plrx) und Thioredoxinreduktase (TrxR). Konnten selbst mit einem systematischen Ansatz keine rekombinanten Parasiten mit Gendeletion erzeugt werden, wurde versucht, das entsprechende Protein auf genetischer Ebene als *drug target* zu validieren; dies war der Fall für das Gen der *Plasmodium* Glutathionreduktase (GR).

3.1 Herstellung und Charakterisierung von *P. berghei* Plrx(-) Parasiten

Plasmoredoxin (*Plrx*) wurde als *Plasmodium*-spezifisches Gen identifiziert und das entsprechende Protein aus *P. falciparum* charakterisiert [15]. Generell eignen sich parasitenspezifische Proteine als viel versprechende *drug targets*, da sie eine auf den Parasiten begrenzte Inhibition ermöglichen, ohne verwandte Wirts-Proteine zusätzlich zu inhibieren. Um zu untersuchen, inwieweit das *Plrx*-Gen eine essentielle Funktion für *Plasmodium berghei* ausübt, wurde der endogene Locus in den Blutstadien mit Hilfe des *P. berghei* Transfektionssystems ausgeschaltet. Zur stabilen Inaktivierung des endogenen *Plrx*-Gens (PlasmoDB-Datenbanknummer: PB001241.02.0) wurden zwei verschiedene Strategien gewählt. Für die Integration wurde ein internes DNA-Fragment des *Plrx*-Gens in den b3D.DT^H.^{AD}-Transfektionsvektor kloniert; so entstand das Konstrukt *pPlrx(-)INT*. Dieser Sequenz fehlen Teile am 5`- und am 3`-Ende, so dass es sich um ein verkürztes Gen handelt und nach Integration dieses Vektors in das Genom kein funktionelles Protein entstehen kann (Abb. 3.1 A).

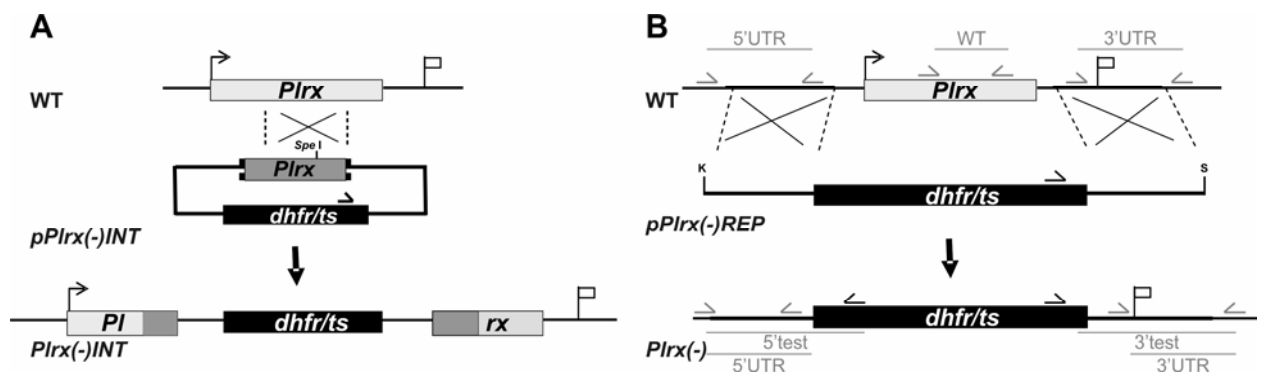


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Strategien zur Gen-Inaktivierung des *P. berghei* Plasmoredoxin-Gens

(A) Integrations-Strategie: Der Wildtyp-Locus des endogenen *Plrx*-Gens ist schematisch im oberen Teil sichtbar (WT), hierbei repräsentiert der Pfeil das Startkodon und die Fahne den Transkriptions-Stopp. Das Integrationskonstrukt *pPlrx(-)INT* ist als Plasmid schematisch darunter dargestellt mit eingebauter *SpeI*-Schnittstelle zur Linearisierung. Der rekombinante Integrationslocus, wie er nach der Transfektion erscheint, ist ganz unten dargestellt. Dabei entstehen zwei verkürzte Versionen des *Plrx*-Gens, wobei einmal das 3'-Ende und einmal das 5'-Ende deletiert ist; das integrierte Plasmid mit dem *DHFR/TS*-Marker ist nur teilweise dargestellt. Der entstandene rekombinante Locus *Plrx(-)INT* beinhaltet am 5'-Ende eine 3'-deletierte *Plrx*-Kopie, die keine RNA-Prozessierungs-Sequenz mehr enthält, gefolgt von dem Selektionsmarker und einer 5'-deletierten nicht transkribierten *Plrx*-Kopie. (B) *Replacement*-Strategie: Der WT-*Plrx*-Locus (WT) wurde mit dem *SacI(S)/KpnI(K)*-linearisierten Plasmid *pPlrx(-)REP*, welches die 5' und 3' UTR des *PbPlrx* enthält, transfiziert. Nach der homologen Rekombination durch ein doppeltes *crossover* Ereignis wurde das *Plrx*-Gen durch den Selektionsmarker ersetzt; es resultierte der *Plrx(-)*-Locus.

Als zweite Variante, um den endogenen *Plrx*-Locus zu inaktivieren, wurde die *replacement*-Strategie verwendet (Abb. 3.1 B). Hierbei wurden zwei DNA-Fragmente in den Vektor b3D.DT^H.^{AD} kloniert. Deren Sequenzen kodieren hierbei für die beiden flankierenden Regionen des *Plrx*-Gens. Die zwei Zielfragmente wurden im Transfektionsvektor an die 5'- und 3'-Enden des Selektionsmarkers kloniert; es resultierte das Konstrukt *pPlrx(-)REP*. Nach erfolgreicher Transfektion in *P. berghei* führt dieses Konstrukt zu einer stabilen Integration durch doppeltes *crossover* (Abb. 3.1 B). Für die Transfektion wurde 5-10 µg DNA der Konstrukte *pPlrx(-)INT* bzw. *pPlrx(-)REP* eingesetzt welche, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert, nachfolgend präzipitiert und in sterilem PBS aufgenommen wurden. Mittels Elektroporation wurden Schizonten-Stadien des *P. berghei*-Stammes NK 65 transfiziert und das linearisierte Zielkonstrukt durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Nach Injektion in Mäuse, wurden die rekombinanten Parasiten mit dem gewünschten Konstrukt vom ersten Tag nach der Elektroporation an durch Pyrimethamin im Trinkwasser selektioniert. Die erste resistente Parasiten-Population wurde zumeist zwischen Tag 7 und Tag 10 sichtbar. Nach dem Auftreten der ersten resistenten Parasiten wurde diese Population in naive Mäuse übertragen und unter Selektionsdruck durch Pyrimethamin vermehrt. Um zu verifizieren, dass es sich bei den selektierten Parasiten um rekombinante

Parasiten mit dem integrierten *replacement*- bzw. Integrations-Konstrukt handelt, wurde die genomische DNA der resistenten Parasiten gewonnen und mithilfe von PCR untersucht. Dabei wurden die Oligonukleotide möglichst so gewählt, dass nur bei dem integrierten Konstrukt eine Sequenz amplifiziert werden konnte, nicht jedoch bei Wildtyp Parasiten (Daten nicht gezeigt). Nach der Bestätigung, dass beide Parasiten-Populationen die gewünschte Gen-Inaktivierung besitzen, wurde nur mit der Population, die aus der *replacement*-Strategie stammte, weitergearbeitet.

Um sicherzustellen, dass eine Population wirklich nur aus rekombinanten Parasiten besteht, wurde die parentale Blutstadien-Population von der erfolgreichen Transfektion zur Selektion klonaler Parasiten-Stämme genutzt, welche ausschließlich die Gen-Deletion enthielten. Um klonale Parasiten-Populationen zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, bei der statistisch gesehen nur ein Parasit pro Verdünnung vorliegt. Die parentale Blutstadien-Population aus der Transfektion wurde intraperitoneal in eine naive Maus injiziert und sobald diese eine Parasitämie zwischen 0,1 und 1% erreichte, wurde das Blut entnommen und so verdünnt, dass sich pro 100 μ l Ansatz statistisch nur ein Parasit befindet, und in 15 NMRI-Mäuse intravenös injiziert. Nach 7 und 10 Tagen konnten die ersten Parasiten in den Tieren detektiert werden.

3.1.1 Genotypische Untersuchung der *Plrx*(-) Parasiten

Um nachzuweisen, dass es sich bei den klonierten Parasiten ausschließlich um *Plrx*-defiziente Parasiten handelt, wurde genomische DNA präpariert und mittels PCR und spezifischer Testprimer untersucht. Die Lage der Oligonukleotide ist aus Abb. 3.2 A ersichtlich. Zur *replacement*-spezifischen Amplifikation wurden folgende Oligonukleotid-Kombinationen eingesetzt: Primerkombination 3`test und Primerkombination 5`test, welche nur bei erfolgreich integriertem Konstrukt eine Sequenz amplifizieren können, nicht jedoch bei Wildtyp Parasiten. Als weitere Oligonukleotid-Kombination diente WT, mit der der Wildtyp *Plrx*-Locus amplifiziert werden konnte (Abb. 3.2 A). Dass mit dieser Kombination kein Amplifikat in den *Plrx*(-) Parasiten detektiert werden konnte, zeigte, dass diese klonalen Populationen keine WT Parasiten mehr enthielten. Es entstanden vier klonale *Plrx*(-) Parasiten-Populationen, die genotypisch identisch waren. In Abb. 3.2 B ist die *replacement*-spezifische PCR Analyse von jeweils einer klonalen Population der *Plrx*(-) Parasiten dargestellt. Die nachfolgenden phänotypischen Untersuchungen im Moskito wurden mit Klon #1, #2, #5 und #7 durchgeführt; die Bestimmung der IC_{50} -Werte und die RT-PCR Versuche wurden hingegen mit einem repräsentativen Klon durchgeführt.

Weiterhin wurde das Fehlen von *Plrx*-Transkript untersucht. Hierzu wurden aus *Plrx*(-) Blutstadien mRNA isoliert und davon ausgehend cDNA synthetisiert. Mit dieser hergestellten cDNA konnte das Vorhandensein von *Plrx*-Transkript mit PCR und *Plrx*-spezifischen Oligonukleotiden untersucht werden. Im Gegensatz zu Wildtyp (WT) Parasiten mit vollständigem *Plrx*-Locus konnte in den *Plrx*-defizienten Parasiten kein Transkript detektiert werden (Abb. 3.2 C), zur Überprüfung der mRNA-Präparation diente eine Kontrollamplifikation eines Teils des Glutathionreduktase-Gens. In guter Übereinstimmung mit dem Transkriptionsprofil von *P. falciparum* *Plrx* [15] konnte *PbPlrx*-Transkript in asexuellen Blutstadien von WT Parasiten detektiert werden. Weiterhin wurde eine Western Blot Analyse mit Proteinextrakten von WT und *Plrx*(-) Parasiten durchgeführt, um nachzuweisen, dass in den *Plrx*(-) Parasiten kein *Plrx*-Protein exprimiert wird (Abb. 3.2 D), hierbei diente Aktin als Ladungskontrolle. Rekombinantes *PbPlrx* wurde überexprimiert, nachfolgend aufgereinigt und diente als Positivkontrolle für das kommerziell hergestellte Antiserum (Details siehe Kapitel 2.2.2.9).

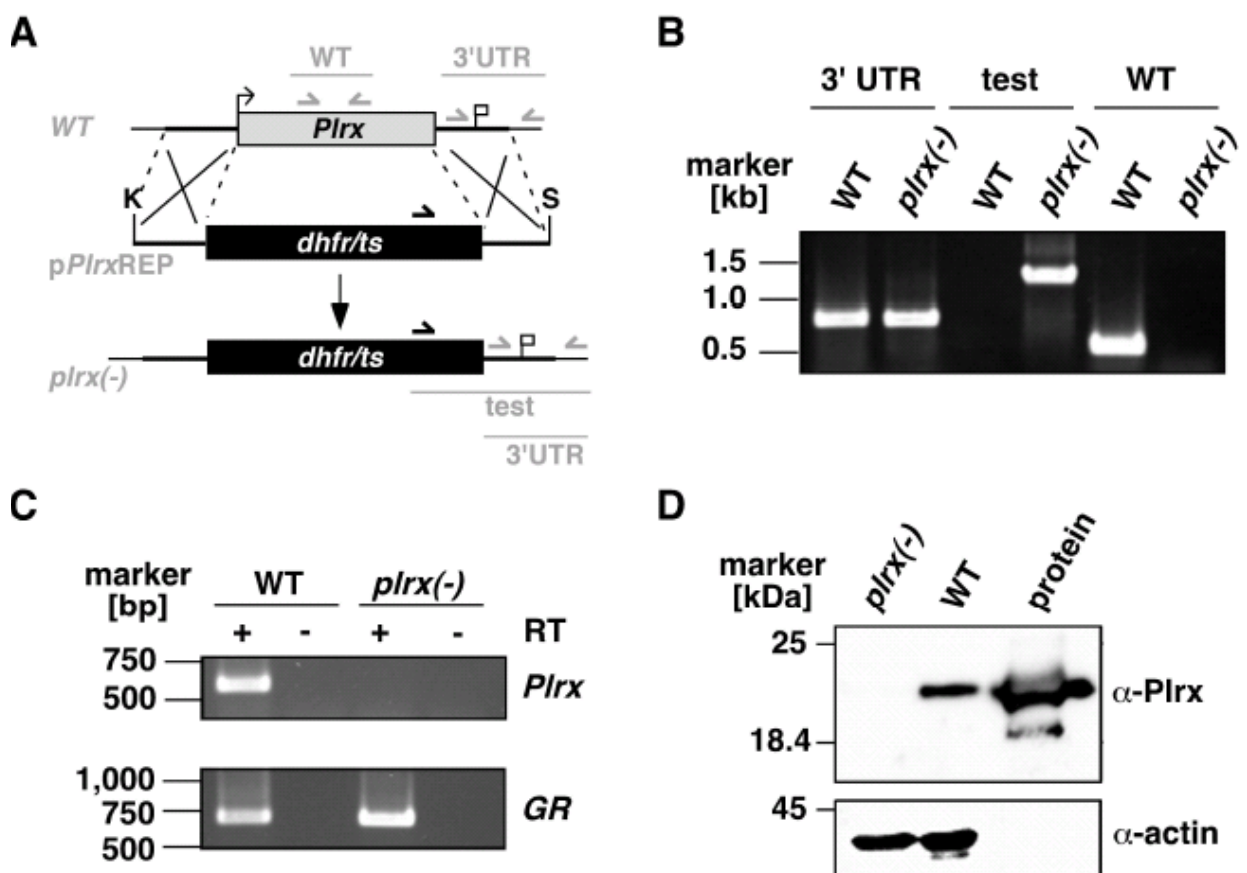


Abb. 3.2: Schematische Übersicht über die Depletion des *P. berghei* Plasmoredoxin-Gens

(A) Generierung des *Plrx*(-) Gen-Locus nach erfolgreicher Integration des *pPlrxREP* in das endogene *P. berghei* *Plrx*-Gen. *Replacement*- und WT-spezifische *Testprimer*-Kombinationen sowie die erwarteten Fragmente sind als

Linien dargestellt, die Pfeile geben die Positionen der *primer* an. (B) *Replacement*-spezifische PCR Analyse. Die Bestätigung der erwarteten Gen-Inaktivierung erfolgte durch Oligonukleotid-Kombinationen, welche nur im rekombinanten Locus zu einer Amplifikation führen (test). Das Nichterscheinen des WT-spezifischen Amplifikates in der klonalen *Plrx*(-) Population bestätigte die Reinheit der Parasitenlinie. (C) Depletion der *Plrx*-Transkripte in *Plrx*-defizienten Parasiten. cDNA von WT und *Plrx*(-) Parasiten wurde in der *Plrx*-spezifischen PCR Analyse eingesetzt (oberes Feld). Amplifikation von Glutathionreduktase-Transkript diente als Positivkontrolle (unteres Feld). (D) Western Blot Analyse von WT und *Plrx*(-) Blutsstadien. Proteinextrakte von WT und *Plrx*(-) Parasiten (jeweils 16 µg Protein) wurden auf 15%igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit dem polyklonalem anti-*Plrx* Antiserum (oberes Feld) oder polyklonalem anti-Aktin Serum (unteres Feld) detektiert. Als Positivkontrolle diente 160 ng rekombinantes *P. berghei* *Plrx* (protein).

Die erfolgreiche Generierung der *Plrx*-defizienten Parasiten zeigt, dass dieses Gen nicht essentiell für die Proliferation von *Plasmodium* Blutstadien ist.

3.1.2 Phänotypische Charakterisierung der *Plrx*(-) Blutstadien *in vitro* und *in vivo*

Um zu überprüfen, ob *Plrx* eine unterstützende Rolle in der Proliferation der Blutstadien einnimmt, wurde ein *in vivo* Wachstumsvergleich durchgeführt. Dies erfolgte durch intravenöse Injektion von jeweils 1000 WT und *Plrx*(-) Parasiten und Überprüfung des Parasitämie-Verlaufs alle 12 Stunden. Wie in Abb. 3.3 A gezeigt, war die Proliferation von *Plrx*(-) Parasiten von der Proliferation der WT Parasiten nicht zu unterscheiden; dieses Ergebnis zeigt, dass *Plrx* für die Etablierung und Proliferation einer Blutstadien-Infektion entbehrlich ist.

Um zu klären, ob der Verlust des *Plrx*-Gens die Proliferation der Blutstadien Parasiten unter erhöhtem Redox-Stress beeinträchtigt, wurde ein *in vitro*-Zellkulturassay eingesetzt. Hierbei wurden die Parasiten über 24 Stunden Medikamenten-Verdünnungen ausgesetzt; der Effekt dieser Medikamente auf die Proliferation der Plasmodien wird durch Hemmung des Einbaus von Hypoxanthin dargestellt. Mit diesem Test konnten IC₅₀-Werte für WT und *Plrx*(-) Parasiten bestimmt werden. Einige der eingesetzten Antimalariamittel wirken als Auslöser für oxidativen Stress [69]. Die getesteten Arzneimittel beinhalteten 4-Aminochinoline wie Chloroquin und Amodiaquin, sowie das erste synthetische Antimalariamittel Methylenblau, des weiteren Mefloquin und die zentrale Verbindung der Artemisin-Kombinations-Therapien (ACT), Artemisinin. Um Stadien-spezifische Effekte zu minimieren, wurden nicht-synchronisierte asexuelle Blutstadien eingesetzt [89]. Wie in der Tabelle der Abb. 3.3 B ersichtlich, unterscheiden sich die IC₅₀-Werte der *Plrx*(-) Parasiten nur unwesentlich von den WT Werten; damit kann zumindest *ex vivo* eine zentrale Rolle von *Plrx* in den antioxidativen Abwehrmechanismen von *Plasmodium* ausgeschlossen werden.

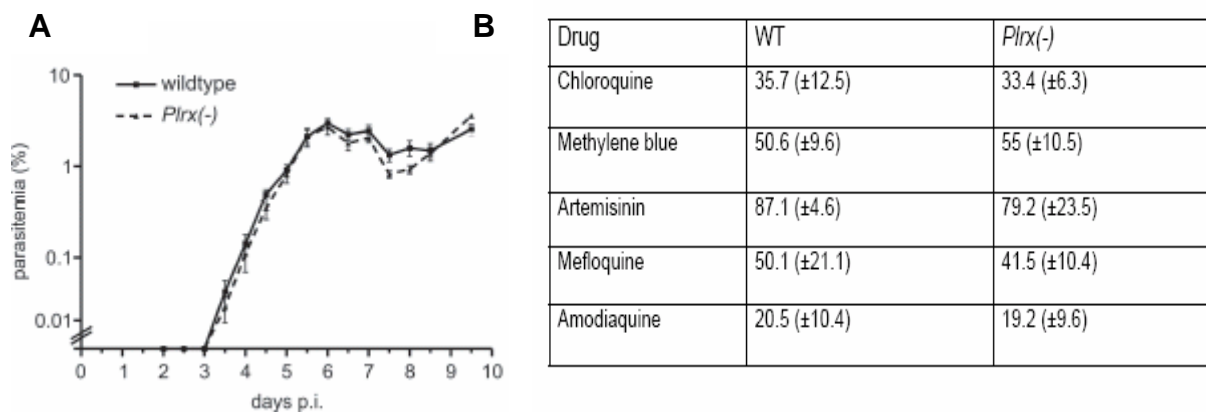


Abb. 3.3.: Charakterisierung der Plasmoredoxin-defizienten Blutstadien Parasiten *in vivo* und *in vitro*

(A) Wachstumsvergleich *in vivo* zwischen WT und *Plrx*(-) Parasiten. Fünf bzw. sechs naive Tiere wurden intravenös mit 1000 Blutstadien Parasiten infiziert, wobei die Parasitämie nachfolgend alle 12 Stunden durch Giemsa-gefärbte Blutaussstriche überprüft wurde. Hierbei zeigt sich, dass die *Plrx*-Depletion keine Auswirkungen auf die Replikation der asexuellen Blutstadien-Parasiten ausübt. (B) Charakterisierung der *Plrx*(-) Parasiten durch einen *in vitro* Zellkulturassay. Hierbei wurden die Parasiten über 24 Stunden Medikamenten-Verdünnungen ausgesetzt, anhand des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens konnten IC_{50} -Werte für WT und *Plrx*(-) Parasiten bestimmt werden. Die Angaben sind nanomolare [nM] Konzentrationen (±-Standardabweichung). Die IC_{50} -Werte der *Plrx*(-) Parasiten unterscheiden sich nur geringfügig von den für WT Parasiten ermittelten Werten.

Um zu überprüfen, ob diese Entbehrlichkeit auch unter *in vivo* Bedingungen auftritt, wurde der oben geschilderte Wachstumsvergleichs-Test unter erhöhten oxidativen Stressbedingungen angewendet. Als Antimalariamittel wurde Methylenblau gewählt, da gezeigt wurde, dass es pro-oxidative Eigenschaften durch Generierung von H_2O_2 besitzt [30]. Die WT- und *Plrx*(-)-infizierten Mäuse wurden oral mit 50 mg/kg Körpergewicht behandelt. Diese Dosis wurde gewählt, da Dosisfindungs-Studien eine rapide und vollständige Eliminierung von WT Parasiten bei 100 mg/kg Körpergewicht zeigten (Daten nicht gezeigt). Selbst mit erhöhtem oxidativen Stress *in vivo* war die Proliferation der *Plrx*-defizienten Parasiten von der Proliferation der WT Parasiten nicht zu unterscheiden (Abb. 3.4 A), womit eine zentrale Rolle von *P. berghei Plrx* im Redoxstoffwechsel ausgeschlossen werden kann.

Da die *in vitro* und *in vivo* Daten eine essentielle Rolle von *Plrx* in der Erhaltung der Redox-Homeostase in *Plasmodium* Blutstadien ausschließen, wurden die phänotypischen Analysen der *Plrx*-defizienten Parasiten auf eine Untersuchung der Transkriptionslevels ausgewählter Redox-Gene ausgedehnt. Mit dieser Analyse sollten mögliche intrazelluläre Veränderungen anderer zytosolischer Redox-Gene aufgezeigt werden. Die Effekte der *Plrx*-Deletion auf die mRNA-Level verschiedener, mit dem zellulären Redoxmetabolismus in Beziehung stehender Gene wurden analysiert. Hierbei lag der Fokus auf zytosolischen Genen, da *Plrx* ein zytosolisches Mitglied der antioxidativen Abwehr ist [15]. Die Level der Gen-Transkripte

wurden mit Hilfe quantitativer RT-PCR ermittelt, auf ein Kontrollgen (*P. berghei* Seryl-tRNA Synthetase) normalisiert. Die Effekte auf ein Ziel-Gen wurden nachfolgend als Unterschiede zu einer WT-Kontroll-Population dargestellt (Abb. 3.4 B). Die Transkript-Level der mRNA der beiden zentralen Stützen der Redox-Homeostase, Thioredoxinreduktase (*TrxR*) und Glutathionreduktase (*GR*), waren leicht erhöht. Es wurde gezeigt, dass *Plrx* mit beiden Systemen interagieren kann [15] und somit eine potentielle zusätzliche Abwehrlinie gegen oxidativen Stress darstellt. Die Annahme war, dass die Depletion von *Plrx* mit einer kompensatorischen Hochregulation von funktionell verwandten Genen, welche die reduzierende Kapazität von *Plrx* ausbalancieren, begleitet sein könnte. Solch eine Funktion könnte am wahrscheinlichsten von Thioredoxin (*Trx*) und/oder Glutathion (*GSH*) ausgeübt werden. Diese Annahme wird durch eine leichte Erhöhung des *Trx*-mRNA Levels unterstützt. Ein weiteres Mitglied der Thioredoxin-Superfamilie, Glutaredoxin (*Grx*) zeigte keine signifikante Veränderung des Transkript-Levels zwischen WT und *Plrx*-defizienten Parasiten. Darüber hinaus zeigten *Plrx*(-) Parasiten eine geringfügige Verminderung der Transkript-Level von Thioredoxinperoxidase 1 (*Tpx1*), der hauptsächlichen zytosolischen Peroxidase der Parasiten, und von Ribonukleotidreduktase (*RiboR*). Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Inaktivierung von *Plrx* nur geringgradige Veränderungen der Transkript-Level ausgesuchter redox-aktiver Gene zur Folge hat.

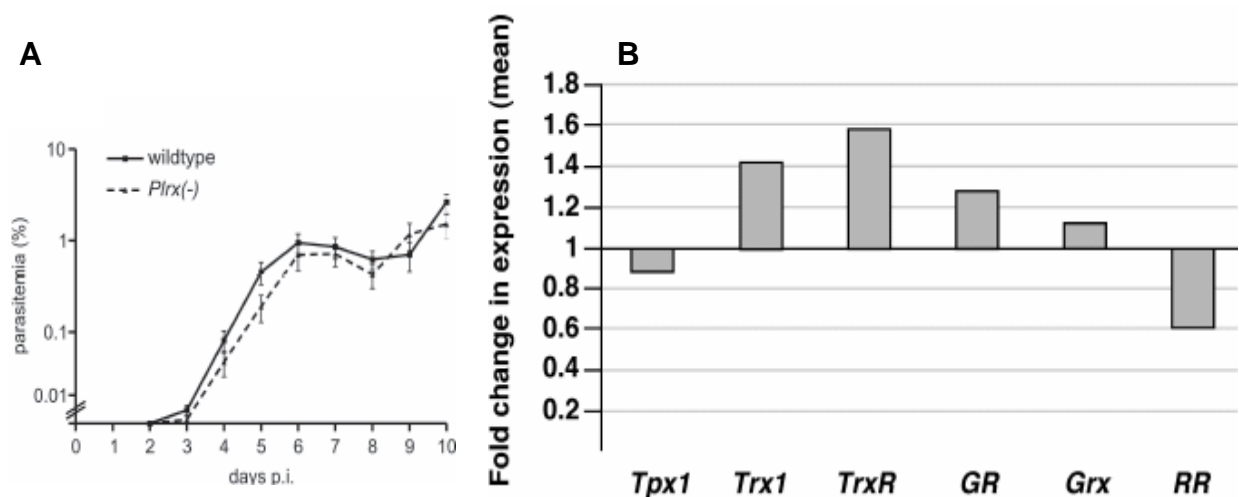


Abb. 3.4: Weiterführende *in vivo* und *in vitro* Charakterisierung der *Plrx*(-) Parasiten-Population

(A) *In vivo* Wachstumskurve für WT und *Plrx*(-) Parasiten unter konstanter Einwirkung von Methyleneblau (eingesetzte Konzentration: 50 mg/kg Körpergewicht), verabreicht über das Trinkwasser. Die Behandlung wurde umgehend nach der intravenösen Injektion von 1000 WT bzw. *Plrx*(-) Parasiten gestartet. Hierbei zeigt sich, dass die *Plrx*-Depletion auch unter erhöhten Redox-Stress Bedingungen keine Auswirkungen auf die Replikation der asexuellen Blutstadien Parasiten ausübt. (B) Messung der Transkript-Level durch quantitative *Real Time*-PCR. Amplifikationseffizienz und der Fluoreszenzsignal-Schwellenwert der exponentiellen Amplifikation (Ct-Wert) von jeweils Ziel- und Referenz-Gen (Seryl-tRNA Synthetase) wurden berücksichtigt. Die Regulation eines Ziel-Gens

ist dargestellt als relativer Expressionsunterschied im Vergleich zu einer WT-Kontroll-Population. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die verwendeten Abkürzungen sind: TPx-1: 2-Cys Peroxiredoxin, Trx1: Thioredoxin, TrxR: Thioredoxinreduktase, GR: Glutathionreduktase, Grx1: Glutaredoxin, RR: Ribonukleotidreduktase. Die Depletion des *PbPlrx*-Gens hat nur geringfügige Veränderungen der Gen-Transkription ausgewählter Redox-Gene zur Folge.

3.1.3 Phänotypische Untersuchungen der *Plrx(-)* Parasiten im Moskito-Vektor

Da keine erkennbare Funktion von *Plrx* in der Entwicklung der Blutstadien aufgezeigt werden konnte, wurden die phänotypischen Analysen auf den gesamten *P. berghei*-Lebenszyklus erweitert.

Plrx(-) Parasiten unterscheiden sich in ihrer sexuellen Entwicklungsphase, welche eine Voraussetzung für die Transmission zu Moskitos ist, nicht von WT Parasiten (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde die Entwicklung von Mitteldarm-Sporozoiten und die Fähigkeit dieser gereiften Sporozoiten, in die Speicheldrüsen einzudringen, untersucht. Die Ausbildung der Mitteldarm-Sporozoiten konnte ab Tag 10 und Tag 14 nach Infektion bestimmt werden. Die Mitteldärme wurden hierzu aus den infizierten Moskitos herauspräpariert und sowohl die Anzahl infizierter Moskitos als auch die Sporozoiten-Anzahl pro infiziertem weiblichen Moskito errechnet. Durch Präparation der Speicheldrüsen ab Tag 17 nach Infektion konnte ebenso die Anzahl an infektiösen Speicheldrüsen-Sporozoiten bestimmt werden.

Die Analysen infizierter Moskitos ergaben vergleichbare Zahlen von Oozysten, Mitteldarm- und Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten in WT und *Plrx*-defizienten Parasiten (Tab. 3.1). Folglich ist *Plrx* ebenfalls für die Sporogonie und Sporozoiten-Reifung entbehrlich.

Parasite	sporozoites				prepatency(days) ^e	
	Infectivity ^a	midgut ^b	salivary gland ^c	liver stages ^d	after i.v. injection	by bite
<i>Plrx(-)</i> ^f	74.1% (±9.7%)	17,100 (±27,200)	6,700 (±3,100)	344 (±1.4)	12/12 (d. 3.7)	10/10 (d. 5.7)
WT	88.8% (±1.8%)	13,900 (±10,300)	16,300 (±3,600)	N/D	8/8 (d. 3.8)	8/8 (d. 5.5)

Tab. 3.1: Depletion von Plasmoredoxin beeinträchtigt nicht den Verlauf des *Plasmodium* Lebenszyklus

^a Prozentsatz der Moskitos, welche an Tag 11-13 nach Infektion Oozysten enthielten. ^b Anzahl von Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten pro infiziertem weiblichen Moskito an Tag 12-14 nach Fütterung. ^c Anzahl von Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten pro infiziertem weiblichen Moskito an Tag 17-19 nach Fütterung. ^d Leberstadien sind reife Exo-erythrozytäre Formen, sichtbar gemacht 48 Stunden nach Inkubation von 10.000 Speicheldrüsen Sporozoiten mit kultivierten Hepatozyten. ^e Die Präpatenzzeit ist definiert als die Zeitspanne zwischen Injektion von 10.000 Speicheldrüsen Sporozoiten (i.v.) oder *by bite* Infektion unter Verwendung von 5-10 infizierten Moskitos bis zum Auftauchen der ersten Blutstadien Parasiten in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen. Die n/n- Angaben bei der Präpatenz bedeuten Mäuse, die eine Blutstadien-Infektion entwickeln/im Versuch

Ergebnisse

infizierten Mäusen. ^f Vier unabhängige *Plrx(-)* klonale Populationen (# 1, 2, 5 und 7) wurden im Moskito-Vektor verfolgt. Gezeigt sind die Durchschnittswerte dieser phänotypisch nicht voneinander zu unterscheidenden Klone. N/D bedeutet nicht durchgeführt.

Plasmodium Sporozoiten aus der Speicheldrüse besitzen eine einzigartige Form der Fortbewegung, die sogenannte *gliding motility* [197]. Dabei bildet der Sporozoit Liganden-Rezeptor-Komplexe mit dem Substrat, auf dem er sich fortbewegt, aus. Es wird beschrieben, dass diese charakteristische Bewegungsform mechanisch mit dem Eintritt in die Wirtszelle verwandt ist und auf den gleichen molekularen Mechanismen beruht [166]. Um die Funktionalität der *Plrx(-)* Sporozoiten zu bestätigen, wurde die *gliding motility* dieser Parasiten untersucht. Hierzu wurden die Sporozoiten auf eine BSA-beschichtete Oberfläche gegeben und die zurückgelassene Spur von Oberflächenproteinen mit Hilfe von Immunofluoreszenz sichtbar gemacht. Die *Plrx(-)* Sporozoiten zeigten *gliding motility*, welche sich weder qualitativ noch quantitativ von der *gliding motility* von WT Sporozoiten unterscheidet (Abb. 3.5).

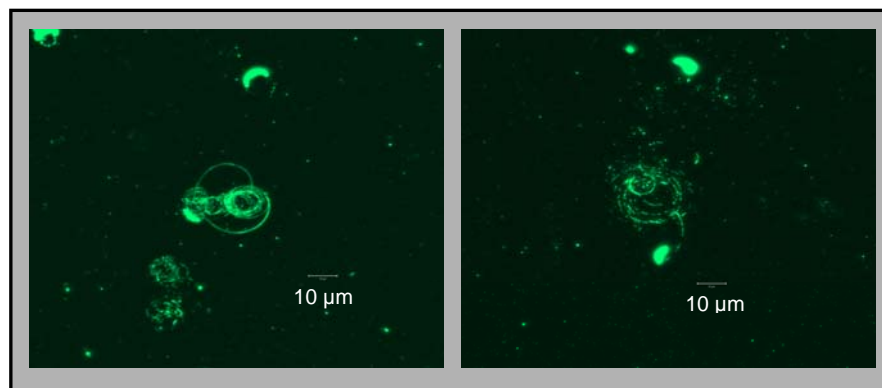


Abb. 3.5: Typisches Bewegungsmuster (*gliding motility*) von Wildtyp (links) und *Plrx(-)* Sporozoiten (rechts)

Die Sporozoiten wurden aus *Anopheles*-Speicheldrüsen isoliert, mit 3% BSA aktiviert und 15 min auf BSA-beschichteten Objektträgern inkubiert. Mit dem monoklonalen anti-*PbCSP* Antikörper wurden die Sporozoiten und die beim Gleiten hinterlassene Spur angefärbt. Durch Auszählen der sich nicht bewegenden Sporozoiten (ohne sichtbar gemachte Spur) im Vergleich zu sich bewegenden Sporozoiten (mit sichtbar gemachter Spur) verschiedener Ansätze kann man ebenfalls quantitative Aussagen treffen. Bei WT Sporozoiten zeigten 62-75% der Sporozoiten typisches *gliding*, dies ist vergleichbar mit dem für *Plrx(-)* Sporozoiten ermittelten Wert von 77% *gliding*.

Ob die *Plrx*-Depletion eine Auswirkung auf die Invasion der Speicheldrüsen-Sporozoiten in Hepatozyten und die intrazelluläre Leberstadienentwicklung ausübt, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden. In den Hepatozyten liegt der Parasit am Ende der Leberschizogonie als Exo-erythrozytäre Form (EEF) vor. Um zu klären, inwieweit *Plrx* an

dieser Stelle des *Plasmodium*-Lebenszyklus eine Rolle spielt, wurden kultivierte Hepatoma-Zellen (HepG2) mit Speicheldrüsen-Sporozoiten infiziert und die Entwicklung der EEFs nach 48 Stunden untersucht; dies geschah parallel mit WT und *Plrx*-defizienten Parasiten. Leberzellen, die mit *Plrx*(-) Sporozoiten infiziert wurden, waren morphologisch nicht von mit WT infizierten Zellen zu unterscheiden (Abb. 3.6) und produzierten Leberzellstadien in großer Anzahl (Tab. 3.1).

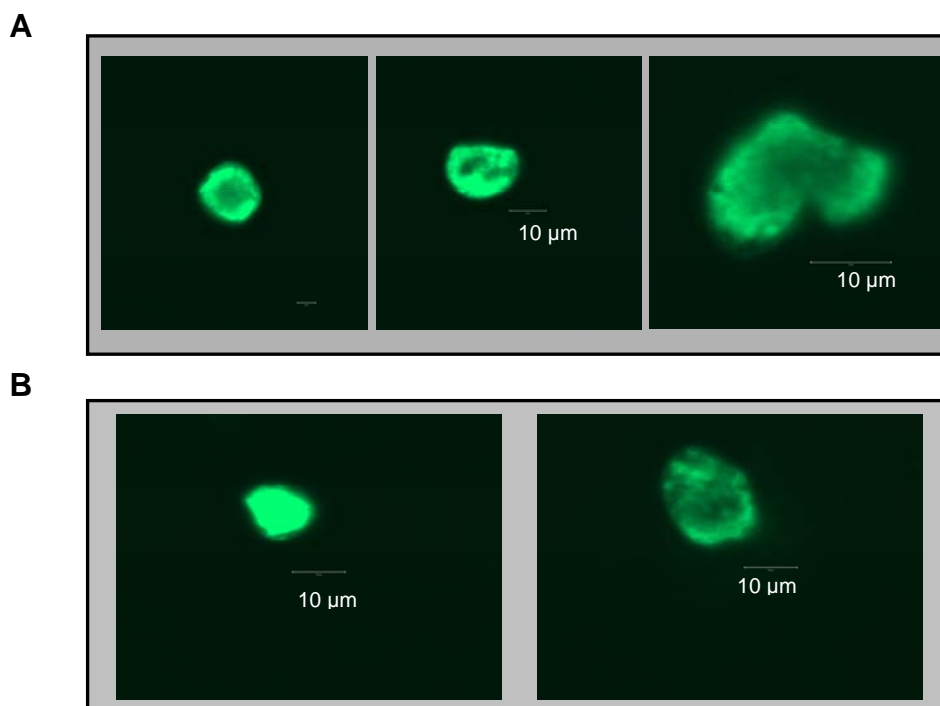


Abb. 3.6: Die Leberstadienentwicklung von *Plrx*(-) Parasiten (A) ist von der Entwicklung der Wildtyp Parasiten (B) nicht zu unterscheiden

Speicheldrüsen-Sporozoiten wurden zu sub-konfluenten Hepatoma-Zellen gegeben. Die sich intrazellulär entwickelnden Leberstadien (EEFs) wurden nach 48 Stunden mit anti-*PbHSP70* gefärbt.

Als nächstes wurde die *in vivo*-Infektivität der *Plrx*(-) Parasiten untersucht, d.h. ob diese Parasiten in der Lage sind, *in vivo* ihre Entwicklung vom Sporozoiten über die exoerythrozytäre Schizogonie bis hin zum Blutstadium zu vollziehen. Dazu wurde eine bestimmte Anzahl (10^4) WT- bzw. *Plrx*(-) Speicheldrüsen-Sporozoiten in Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) intravenös injiziert. Sowohl die WT- als auch die *Plrx*(-)infizierten Tiere entwickelten eine Blutstadien-Infektion in einer Präpatenzzeit von ungefähr 4 Tagen (Tab. 3.1). Weiterhin wurde untersucht, ob die *Plrx*(-) Parasiten ebenfalls bei natürlicher Transmission durch den Stich infizierter Moskitos (*by bite*) infektiös sind; dies geschah mit Hilfe von C57/bl6-Mäusen, die eine hohe Empfänglichkeit für eine Infektion mit *Plasmodium*

Sporozoiten aufweisen [174]. Mit WT- bzw. *Plrx(-)*-infizierte Moskitos nahmen ihre Blutmahlzeit von C57/bl6-Mäusen, welche sowohl nach WT als auch nach *Plrx(-)* Infektion in einem Zeitraum von 5-6 Tagen eine Blutstadien-Infektion entwickelten (Tab. 3.1).

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine unter den gewählten experimentellen Bedingungen zentrale Rolle von *Plrx* im *Plasmodium*-Lebenszyklus ausgeschlossen werden kann.

3.2 Herstellung und Charakterisierung von *P. berghei TrxR(-)* Parasiten

Es sollte untersucht werden, ob das Thioredoxinreduktase (*TrxR*)-Gen in den Blutstadien von *Plasmodium* eine essentielle Rolle einnimmt. Mit Hilfe des *P. berghei* Transfektionssystems konnte das endogene *TrxR*-Gen in den Blutstadien ausgeschaltet werden. Durch die Ausschaltung des *TrxR*-Gens im Genom von *Plasmodium berghei* konnte die Bedeutung dieses Enzyms als mögliches *drug target* in der Therapie gegen Malaria untersucht werden. Zur stabilen Inaktivierung des endogenen *TrxR*-Gens (PlasmoDB-Datenbanknummer: PB001157.00.0) wurde die *replacement*-Strategie gewählt. Hierbei wurden zwei DNA-Fragmente in den Transfektionsvektor b3D.DT^H.^ΔD kloniert. Deren Sequenzen kodieren für die beiden flankierenden Regionen des *TrxR*-Gens. Die zwei Zielfragmente wurden an die 5'- und 3'-Enden des im b3D.DT^H.^ΔD-Transfektionsvektor enthaltenen Selektionsmarkers *TgDHFR* kloniert; somit entstand der Transfektionsvektor p*TrxR(-)*REP (Abb. 3.7 A). Für die Transfektion wurden 5-10 µg DNA des Konstruktes p*TrxR(-)*REP eingesetzt, welches mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert, nachfolgend präzipitiert und in sterilem PBS aufgenommen wurde. Bei der Transfektion wurden die Schizonten-Stadien des *P. berghei* Stammes GFP-507cl durch Elektroporation transfiziert und das linearisierte Zielkonstrukt durch homologe Rekombination in das Genom integriert. In Mäuse injiziert, wurden die rekombinanten Parasiten mit dem gewünschten Konstrukt vom ersten Tag nach der Elektroporation an durch Pyrimethamin im Trinkwasser selektioniert. Um zu verifizieren, dass es sich bei den selektierten Parasiten um rekombinante Parasiten mit dem integrierten *replacement*-Konstrukt handelt, wurde die genomische DNA der resistenten Parasiten gewonnen und mithilfe von PCR untersucht. Dabei wurden die Oligonukleotide so eingesetzt, dass nur bei dem integrierten Konstrukt eine Sequenz amplifiziert werden konnte, nicht jedoch bei Wildtyp Parasiten (Daten nicht gezeigt).

Um sicherzustellen, dass eine Population nur aus rekombinanten Parasiten besteht, wurde die parentale Blutstadien-Population von der erfolgreichen Transfektion zur Selektion

klonaler Parasiten-Stämme, welche ausschließlich die *TrxR*-Deletion enthalten, genutzt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, bei der statistisch gesehen nur ein Parasit pro Verdünnung vorliegt. Jeweils 100 µl einer solchen Verdünnung wurden in 15 NMRI-Mäuse intravenös injiziert. Nach 7 und 10 Tagen konnten die ersten Parasiten in den Tieren detektiert werden.

3.2.1 Genotypische Untersuchung der *TrxR*(-) Parasiten

Um zu überprüfen, ob es sich bei den klonierten Parasiten um *TrxR*-defiziente Parasiten handelt, wurde die genomische DNA dieser verschiedenen klonalen Populationen präpariert und mit PCR und spezifischen Testprimern untersucht (Lage der verwendeten primer Abb. 3.7 A ersichtlich). Zur *replacement*-spezifischen Amplifikation wurden folgende Oligonukleotid-Kombinationen eingesetzt: Primerkombination 3`test und Primerkombination 5`test, welche nur bei erfolgreich integriertem Konstrukt eine Sequenz amplifizieren können, nicht jedoch bei Wildtyp Parasiten. Als weitere Oligonukleotid-Kombination diente WT, mit der der Wildtyp *TrxR*-Locus amplifiziert werden konnte. Dass mit dieser Kombination kein Amplifikat in den *TrxR*(-) Parasiten detektiert werden konnte, zeigte, dass diese klonalen Populationen keine WT Parasiten mehr enthielten. In Abb. 3.7 B ist die *replacement*-spezifische PCR Analyse von einer klonalen Population der *TrxR*(-) Parasiten dargestellt. Es entstanden drei klonale *TrxR*(-) Parasiten-Populationen, die genotypisch identisch waren. Die nachfolgenden phänotypischen Untersuchungen wurden mit Klon #2 und #3 durchgeführt.

Nachdem die Integration des *replacement*-Konstruktes in das *P. berghei*-Genom nachgewiesen werden konnte, wurde weiterhin das Fehlen von *TrxR*-Transkript untersucht. Hierzu wurde aus *TrxR*(-) Blutstadien mRNA isoliert und davon ausgehend cDNA synthetisiert. Mit dieser hergestellten cDNA konnte das Vorhandensein von *TrxR*-Transkript mit PCR und den *TrxR*-spezifischen Oligonukleotiden untersucht werden. Im Gegensatz zu Wildtyp (WT) Parasiten mit intaktem *TrxR*-Gen konnte in den *TrxR*-defizienten Parasiten kein Transkript detektiert werden (Abb. 3.7 C). Zur Überprüfung der mRNA-Präparation diente eine Kontrollamplifikation eines Teils des Glutathionreduktase-Gens. Weiterhin wurde eine Western Blot Analyse mit Proteinextrakten von WT und *TrxR*(-) Blutstadien-Parasiten durchgeführt, um nachzuweisen, dass in den *TrxR*(-) Parasiten kein TrxR-Protein hergestellt wird (Abb. 3.7 D), hierbei diente Aktin als Ladungskontrolle.

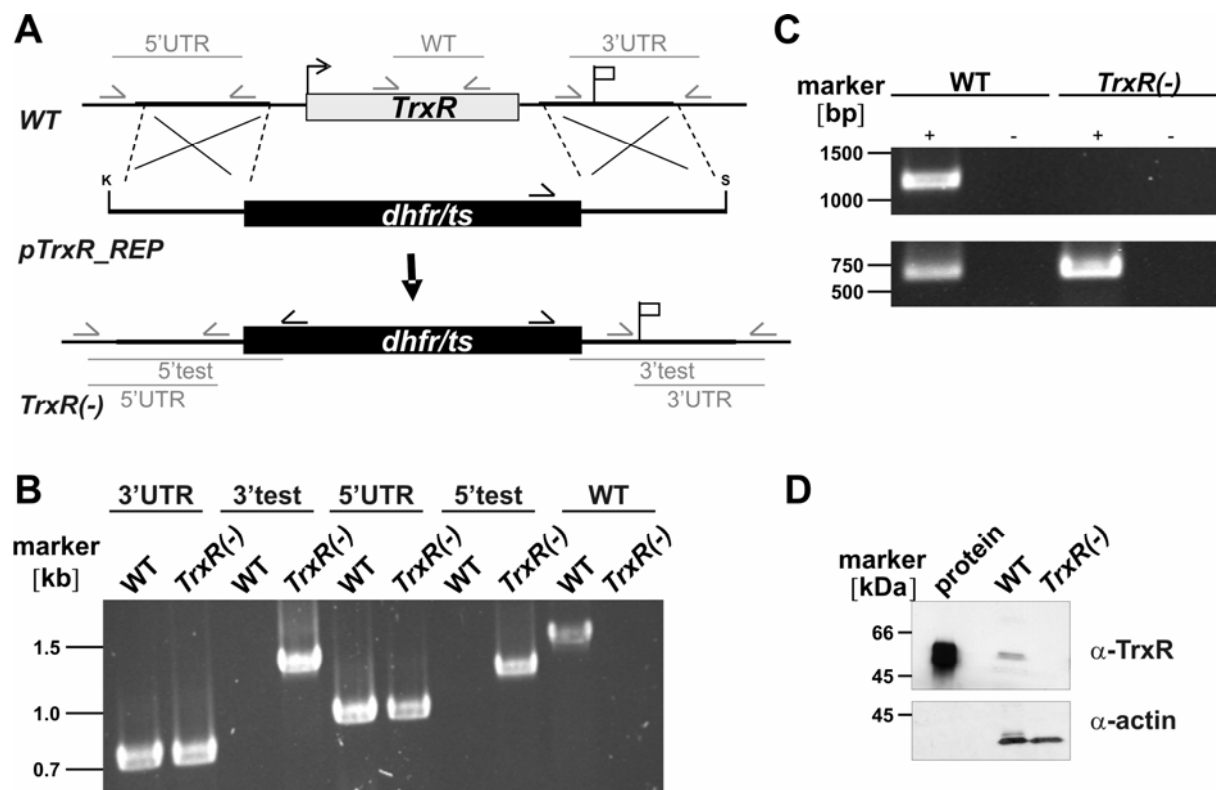


Abb. 3.7: Schematische Übersicht über die Depletion des *P. berghei* Thioredoxinreduktase-Gens

(A) Generierung des *TrxR*(-) Gen-Locus nach erfolgreicher Integration des *pTrxR_REP* in das endogene *P. berghei TrxR*-Gen. *Replacement*- und *WT*-spezifische Testprimer Kombinationen sowie die erwarteten Fragmente sind als Linien dargestellt, die Pfeile geben die Positionen der *primer* an. (B) *Replacement*-spezifische PCR Analyse. Die Bestätigung der erwarteten Gen-Inaktivierung erfolgte durch Oligonukleotid-Kombinationen, welche nur im rekombinanten Locus zu einer Amplifikation führen (test). Das Nichterscheinen des *WT*-spezifischen Amplifikates in der klonalen *TrxR*(-) Population bestätigt die Reinheit der Parasitenlinie. (C) Depletion der *TrxR*-Transkripte in *TrxR*-defizienten Parasiten. cDNA von *WT* und *TrxR*(-) Parasiten wurde in der *TrxR*-spezifischen PCR Analyse eingesetzt (oberes Feld). Amplifikation von Glutathionreduktase-Transkript diente als Positivkontrolle (unteres *WT* Feld). (D) Western Blot Analyse von *WT* und *TrxR*(-) Blutstadien. Proteinextrakte von *WT* und *TrxR*(-) Parasiten (jeweils 16 µg Protein) wurden auf 10%igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit polyklonalem *P. falciparum* anti-*TrxR* Antiserum (oberes Feld) oder polyklonalem anti-Aktin Serum (unteres Feld) detektiert. Als Positivkontrolle diente 160 ng rekombinantes *P. falciparum TrxR* (protein).

Die erfolgreiche Generierung der *TrxR*-defizienten Parasiten zeigt, dass dieses Gen nicht essentiell an der Proliferation von *Plasmodium* Blutstadien beteiligt ist.

3.2.2 Phänotypische Charakterisierung der *TrxR*(-) Parasiten

Um zu überprüfen, ob *TrxR* eine unterstützende Rolle in der Proliferation der Blutstadien einnimmt, wurde ein *in vivo* Wachstumsvergleich durchgeführt. Dies erfolgte durch intravenöse Injektion von jeweils 1000 *WT* und *TrxR*(-) Parasiten und Überprüfung des Parasitämie-Verlaufs alle 12 Stunden. Nach einer anfänglichen Verzögerung im Wachstum der *TrxR*(-) Population, erreicht die Parasitämie von *WT* und *TrxR*(-) Parasiten vergleichbare

Höchstwerte an Tag 7 nach der Infektion (Abb. 3.8 A). Dies bedeutet, dass eine Inaktivierung von *TrxR* die Anfangsphase der Proliferation von *Plasmodium* zu beeinträchtigen scheint, gleichzeitig kann aber eine essentielle Funktion für die Etablierung einer Blutstadien-Infektion ausgeschlossen werden.

Um zu klären, ob der Verlust des *TrxR*-Gens die Proliferation der Blutstadien unter erhöhtem Redox-Stress beeinträchtigt, wurde der oben geschilderte Wachstumsvergleichs-Test unter erhöhtem oxidativen Stress angewendet. Als Antimalariamittel wurde Methylenblau gewählt, da gezeigt wurde, dass es pro-oxidative Eigenschaften durch Generierung von H_2O_2 besitzt [30]. Die WT- und *TrxR*(-)infizierten Mäuse wurden oral mit 50 mg/kg Körpergewicht behandelt. Selbst mit erhöhtem oxidativen Stress *in vivo* war die Proliferation der *TrxR*-defizienten Parasiten von der Proliferation der WT Parasiten nicht zu unterscheiden (Abb. 3.8 B), womit eine zentrale Rolle von *P. berghei TrxR* im Redoxstoffwechsel ausgeschlossen werden kann.

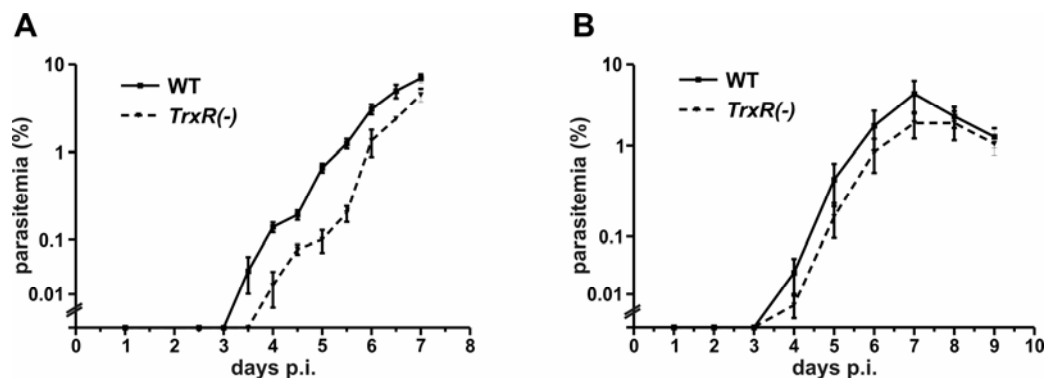


Abb. 3.8: *In vivo* Wachstumsvergleichs-Kurven von WT und *TrxR*(-) Parasiten ohne (A) und mit (B) Behandlung der Mäuse mit Methylenblau

(A) Der Wachstumsvergleich *in vivo* zeigt, dass nach einer anfänglichen Verzögerung im Wachstum der *TrxR*(-) Population die Parasitämie von WT und *TrxR*(-) Parasiten vergleichbare Höchstwerte an Tag 7 nach der Infektion erreichen. (B) Unter erhöhtem oxidativen Stress durch Methylenblau Behandlung ist das Wachstum der *TrxR*-defizienter Blutstadien dem der WT Parasiten vergleichbar.

Die weitere Analyse der *TrxR*(-) Parasiten in Blutstadien ergab, dass Wachstum, Ausbildung von Gametozyten und Exflagellation der Mikrogamonten sich nicht von WT Parasiten unterscheiden ließen (Daten nicht gezeigt). Die Entwicklung dieser rekombinanten Parasiten wurde deshalb im Moskito-Vektor weiterverfolgt. Die Analyse der Entwicklung innerhalb der *Anopheles* Mücken erfolgt mit den bereits in Kapitel 3.1.3 genannten Assays. Die Etablierung einer Infektion in dem Mitteldarm der *Anopheles*-Mücken war bei den *TrxR*-defizienten

Parasiten erschwert; dies zeigte sich daran, dass am Tag 10 nach Infektion der Moskitos nur 38% der mit *TrxR(-)*-infizierten Mücken Mitteldärme mit reifen Oozysten aufwiesen, im Vergleich zu 77% der mit WT-infizierten Mücken (Tab. 3.2). Obwohl die mit *TrxR(-)* Parasiten infizierten Moskitos eine signifikant geringere Infektivität und Anzahl an Mitteldarm-Sporozoiten auswiesen, scheinen die *TrxR*-defizienten Parasiten offensichtlich diese insgesamt geringere Mitteldarm-Infektion kompensieren zu können, da die Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoitenzahlen mit WT vergleichbare Werte erreichten (Tab. 3.2). Folglich ist *TrxR* ebenfalls für die Sporogonie und Sporozoiten-Reifung entbehrlich.

Parasite	sporozoites				prepatent period ^e	
	Infectivity ^a	midgut ^b	salivary gland ^c	liver stages ^d	i.v.	by bite
<i>TrxR(-)</i> ^f	38% (±10%)	9,500 (±2,900)	8,250 (±1,600)	79 (±20)	7/7(d.4)	5/5 (d4.6)
WT	77% (±18%)	27,800 (±5,400)	12,100 (±2,200)	329 (±62)	4/4(d.5)	6/6 (d3.5)

Tab. 3.2: Depletion von *TrxR* beeinträchtigt nicht den Verlauf des *Plasmodium* Lebenszyklus

^a Prozentsatz der Moskitos, welche an Tag 11-13 nach Infektion Oozysten enthielten. ^b Anzahl von Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten pro infiziertem weiblichen Moskito an Tag 12-14 nach Fütterung. ^c Anzahl von Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten pro infiziertem weiblichen Moskito an Tag 17-19 nach Fütterung. ^d Leberstadien sind reife Exo-erythrozytäre Formen sichtbar gemacht 48 Stunden nach Inkubation von 10.000 Speicheldrüsen-Sporozoiten mit kultivierten Hepatozyten. ^e Die Präpatenzzeit ist definiert als die Zeitspanne zwischen Injektion von 10.000 Speicheldrüsen Sporozoiten (i.v.) oder *by bite* Infektion unter Verwendung von 5-10 infizierten Moskitos bis zum Auftauchen der ersten Blutstadien Parasiten in Giemsa-gefärbten Blutsausstrichen (Angabe in Klammern, d entspricht days). Die n/n-Angaben bei der Präpatenz bedeuten Mäuse, die eine Blutstadien-Infektion entwickeln/im Versuch infizierten Mäusen. ^f Zwei unabhängige *TrxR(-)* klonale Populationen (# 2 und 3) wurden im Moskito-Vektor verfolgt. Gezeigt sind die Durchschnittswerte dieser phänotypisch nicht voneinander zu unterscheidenden Klone.

Wurden die reifen Sporozoiten auf ihre *in vitro*-Infektivität für den Säugetier-Wirt untersucht, konnte festgestellt werden, dass interessanterweise die *TrxR(-)* Sporozoiten im Vergleich zu WT Sporozoiten *in vitro* eine geringere Anzahl Leberstadien (Tab. 3.2) produzieren, die sich aber morphologisch nicht von WT Leberstadien unterscheiden (nicht gezeigt).

Als nächstes wurden die reifen Sporozoiten auf ihre *in vivo*-Infektivität untersucht. Die verwendeten Nagerwirte zeigen nach vergleichbaren Präpatenzzeiten eine Blutstadieninfektion nach *in vivo*-Infektion mit WT und *Plrx(-)* Parasiten (Tab. 3.2). Dies geschah entweder durch intravenöse Injektion der jeweiligen Sporozoiten oder über den natürlichen Transmissionsweg durch Biss infizierter Moskitos.

Alle Daten zusammengenommen zeigen unter den gewählten experimentellen Bedingungen an keiner Stelle des *Plasmodium*-Lebenszyklus einen entscheidenden phänotypischen Defekt der *TrxR*-defizienten Parasiten.

3.3 Glutathionreduktase ist essentiell für erythrozytäre Plasmodien Stadien

Da der *TrxR*-abhängige Stoffwechselweg keine essentielle Rolle in der antioxidativen Abwehr der Plasmodien Parasiten einzunehmen scheint, wurde weiterhin das zweite zentrale antioxidative System mit dem Enzym Glutathionreduktase (*GR*) untersucht.

Es wurde zunächst versucht, die endogenen *GR*-Gene von *P. yoelii* (PlasmoDB-Datenbanknummer: PY01204) und *P. berghei* (PlasmoDB-Datenbanknummer: PB001317.02.0) mit der Integrations-Strategie zu inaktivieren. Dazu wurden 5'- und 3'-verkürzte DNA-Fragmente des jeweiligen Gens in den b3D.DT^H.^{AD}-Transfektionsvektor kloniert, resultierend in *pPyGR_INT* und *pPbGR_INT*. Die Integration dieser Vektoren in das *Plasmodium*-Genom führt über homologe Rekombination durch *single crossover* zu zwei trunkierten, und damit inaktivierten *GR*-Kopien (Abb. 3.9).

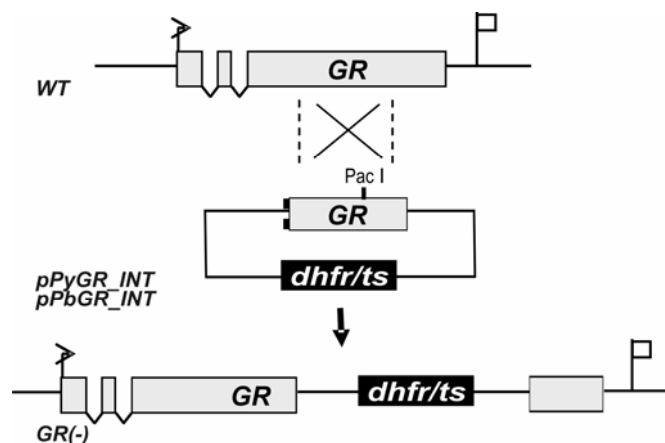


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Integrations-Strategie zur Gen-Inaktivierung des *Plasmodium* Glutathionreduktase-Gens

Der Wildtyp-Locus des endogenen *GR*-Gens ist schematisch im oberen Teil sichtbar (WT), hierbei repräsentiert der Pfeil das Startkodon und die Fahne den Transkriptions-Stopp. Die Integrationskonstrukte *pPyGR_INT* und *pPbGR_INT* sind als Plasmid schematisch darunter dargestellt mit endogener *PacI*-Schnittstelle zur Linearisierung. Der rekombinante Integrationslocus, wie er nach der Transfektion erscheint, ist ganz unten dargestellt. Dabei entstehen zwei verkürzte Versionen des *GR*-Gens, wobei einmal das 3'-Ende und einmal das 5'-Ende deletiert ist; das integrierte Plasmid mit dem *DHFR/TS*-Marker ist nur teilweise dargestellt. Der entstandene rekombinante Locus beinhaltet am 5'-Ende eine 3'-deletierte *GR*-Kopie, die keine RNA-Prozessierungs-Sequenz mehr enthält, gefolgt von dem Selektionsmarker und einer 5'-deletierten nicht transkribierten *GR*-Kopie.

Für die *Plasmodium* Transfektion nach der Biorad-Methode wurden 30 bis 80 µg der durch Maxi-Präparation gewonnenen Plasmid-DNA eingesetzt. Die Transfektionsvektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht linearisiert, nachfolgend präzipitiert, in sterilem PBS aufgenommen und zur Transfektion eingesetzt. In Ratten (im Falle der *P. berghei* Transfektion) oder Mäuse (im Falle der *P. yoelii* Transfektion) injiziert, wurden die transfizierten Parasiten vom ersten Tag nach der Elektroporation durch Pyrimethamin, welches intraperitoneal injiziert wurde, selektioniert. Es gab zwei verschiedene Ergebnisse der Transfektionen: entweder wurden resistente Parasiten-Populationen zumeist zwischen Tag 7 und Tag 10 nach Transfektion sichtbar; dies war in etwa 50% der Transfektionen der Fall oder es konnten keine resistenten Parasiten selektioniert werden.

Nach dem Sichtbarwerden resistenter Parasiten in Blutaussstrichen wurden diese Populationen in naive Mäuse übertragen und unter Selektionsdruck durch Pyrimethamin vermehrt. Um zu verifizieren, dass es sich bei den selektierten Parasiten um rekombinante Parasiten mit den integrierten Integrations-Konstrukten handelt, wurde die genomische DNA der resistenten Parasiten gewonnen und mithilfe von PCR untersucht. Dabei wurden die Oligonukleotide möglichst so eingesetzt, dass nur bei dem integrierten Konstrukt eine Sequenz amplifiziert werden konnte, nicht jedoch bei Wildtyp Parasiten. Die unterschiedlichsten genotypischen Analysen zeigten jedoch immer ein WT-spezifisches Muster; bei keiner der resistenten Populationen konnte eine erfolgreiche Integration der pPyGR_INT- und pPbGR_INT-Vektoren und damit verbunden eine GR-Inaktivierung gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Um den Parasiten Resistenz gegenüber Pyrimethamin zu verleihen, muss das Integrationskonstrukt nicht integriert sein, sondern könnte auch episomal vorliegen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Oligonukleotide so kombiniert, dass nur bei Vorliegen eines episomalen Konstruktes eine Sequenz amplifiziert werden konnte. Ein Teil der resistenten WT Parasiten wurden nach dieser genotypischen Analyse als Parasiten, die das Resistenz-verleihende Konstrukt als Episom vorliegen haben, identifiziert.

Führen Transfektionen nicht zu resistenten Parasiten, könnte dies ein Hinweis auf technische Probleme in verschiedenen Bereichen der Transfektion (Vektoren, Regionen der Homologie, Protokoll) sein oder aber auf eine potentielle Essentialität des GR-Gens hindeuten.

Da mehrere Versuche mit den *P. berghei* und *P. yoelii* Transfektionssystemen unter Nutzung der oben genannten Integrations-Vektoren zu keiner detektierbaren *GR*-Inaktivierung führten, wurden in einem systematischen Ansatz verschiedene Vektoren zur Gen-Inaktivierung hergestellt (Abb. 3.10). Diese Plasmide unterschieden sich in der Art der zugrundeliegenden Transfektionsvektoren, der Größe bzw. Lage der Homologie-Regionen und in den angewendeten Strategien zur Gen-Inaktivierung, neben der *replacement*- (Abb. 3.10 A) wurde ebenfalls die Integrations-Strategie (Abb. 3.10 B) eingesetzt.

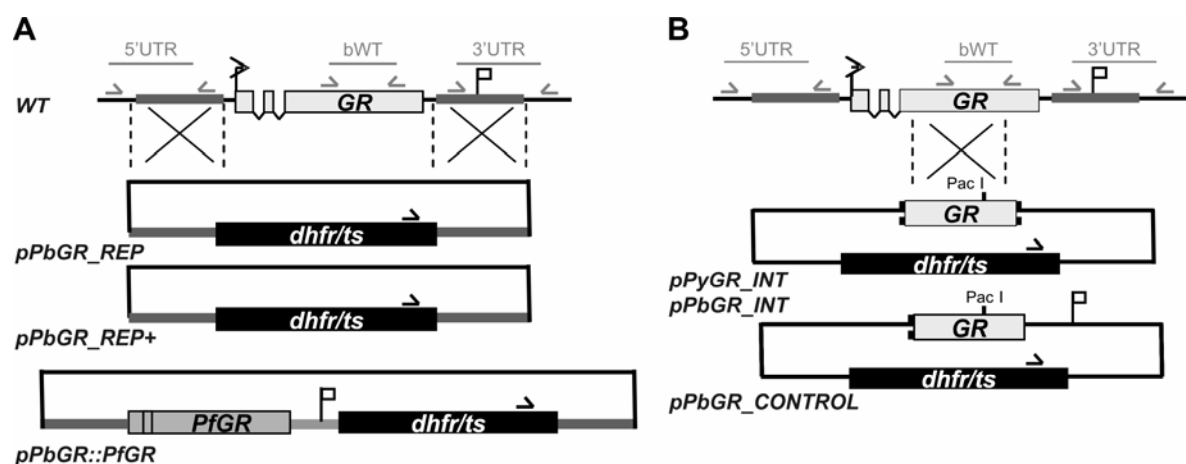


Abb. 3.10: Übersicht der für die Gen-Inaktivierung des Glutathionreduktase-Gens eingesetzten Transfektionsvektoren

Der WT *GR*-Locus (WT) soll entweder mit (A) *replacement*-Konstrukten (im Falle der Plasmide pPbGR_REP, pPbGR_REP+ und pPbGR::PfGR) oder mit (B) Integrations-Konstrukten (im Falle der Plasmide pPyGR_INT, pPbGR_INT und pPbGR_CONTROL) inaktiviert werden.

Diese Plasmide wurden in einer systematischen Vorgehensweise eingesetzt. Die aufgeführten Strategien beinhalteten: (i) die Nutzung zweier Transfektionsprotokolle (Ref. 12, 13 GR Paper), (ii) mehrere Transfektionsvektoren mit wechselnden Regionen der Homologie, (iii) verschiedene Parasitenspezies und (iv) innerhalb der Spezies unterschiedliche Parasitenstämme (Tab. 3.3).

<u>species</u>	<u>strain</u>	<u>strategy^a</u>	<u>technology^b</u>	<u>regions of homology^c</u>	<u>Successful targetings/ transfections^d</u>
<i>P. yoelii</i>	17XNL	INT	gp	1.54 kb	0/8 (0%)
<i>P. berghei</i>	NK65	INT	gp, nf	1.08 kb	0/5 (0%)
<i>P. berghei</i>	NK65	REP	gp, nf	0.74 + 0.76 kb	0/6 (0%)
<i>P. berghei</i>	ANKA	REP+	nf	0.78 + 0.56 kb	0/2 (0%)
<i>P. berghei</i>	NK65, ANKA	CONTROL	gp, nf	2.1 kb	3/3 (100%)
<i>P. berghei</i>	NK65, ANKA	COMP	nf	0.78 + 0.56 kb	2/2 (100%)

Tab. 3.3: Übersicht der Strategien zur Erreichung des *Plasmodium* Glutathionreduktase Gen-Locus

^a Nomenklatur entspricht Abb. 3.10: COMP, Komplementations-Vektor; INT, Integrations- und REP, *replacement*-Vektor. ^b Transfektions-Protokolle mit Biorad *gene pulser* (gp) und/oder *nucleofector device* (nf) wurden gemäß [90, 188] durchgeführt. ^c Die Größe der Regionen, die als homologe Rekombinationsstellen dienen sollen, sind in Kilobasen (kb) angegeben. ^d Erfolgreiche Integration der Vektoren in das *Plasmodium*-Genom wurde durch Genotypisierung bestätigt, wohingegen nicht-erfolgreiche Transfektionen entweder keine lebensfähige Parasiten oder Pyrimethamin-resistente WT Populationen zur Folge hatten.

Die Anwendung der verschiedenen Strategien in zahlreichen Kombinationen führte in keinem Fall zu einer detektierbaren Gen-Inaktivierung des *P. berghei* oder *P. yoelii* *GR*-Gens (Tab. 3.3). Die Transfektionen der Konstrukte, welche eine *GR*-Inaktivierung als Folge der Integration des Konstruktes besitzen, führten entweder zur Herstellung resistenter Parasiten-Populationen oder es konnten keine resistenten Plasmodien selektioniert werden. Die erhaltenen, resistenten Parasiten-Populationen wurden durch genotypische Analysen als WT und/oder Episom-enhaltende Parasiten charakterisiert.

Zur Bestätigung, dass der endogene *GR*-Locus prinzipiell für eine Insertion zugänglich ist, wurde der Kontrollvektor *pPbGR_CONTROL* (Abb. 3.11 A, mittlerer Bildabschnitt) hergestellt.

Dabei unterscheidet sich das verwendete Konstrukt von den oben beschriebenen Deletionskonstrukten ausschließlich im 3'-Bereich des *GR*-Gens, der hier vollständig vorliegt. Die Transfektion dieses Vektors führt durch ein einfaches Rekombinationsereignis zu einem duplizierten Gen-Locus, welcher eine funktionelle Kopie des *GR*-Gens unter den endogenen Promotorelementen und eine nichtfunktionelle, 5'-verkürzte Version des Gens enthält (Abb. 3.11 A, unterer Bildabschnitt).

Durch einmalige Transfektion dieses Konstruktes in drei parallelen Ansätzen (siehe Tabelle 3.3) konnten parenterale *P. berghei* Populationen mit der erwarteten und durch genotypische Analysen bestätigten Locus-Modifikation erhalten werden. In Abb. 3.11 B ist die PCR Analyse einer parentalen *bGRCONTROL*-Population dargestellt.

Daraus kann gefolgert werden, dass die Schwierigkeiten – sogar unter Anwendung einer Vielfalt an Strategien – einen *GR(-)*-Locus zu generieren, nicht auf einer generellen Unzugänglichkeit dieses Genomabschnitts für Modifikations-Ereignisse basieren.

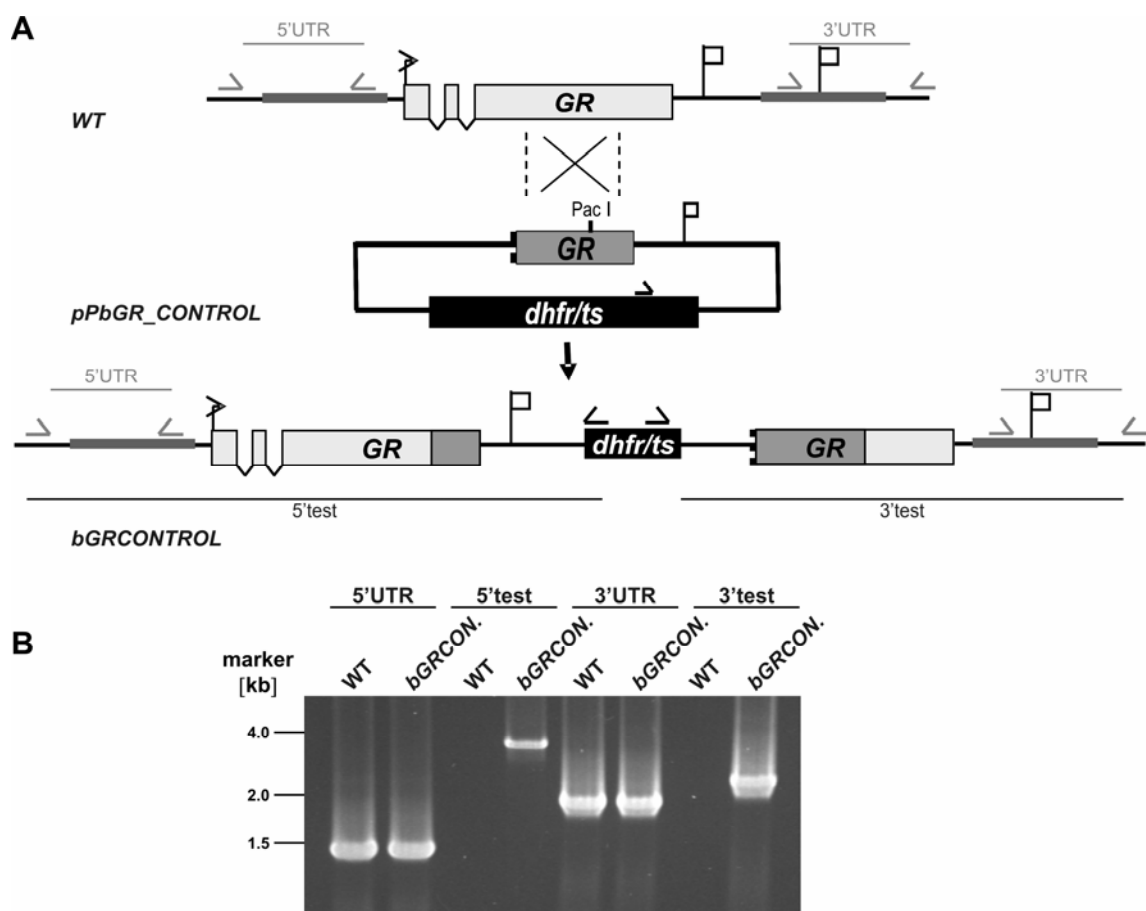


Abb. 3.11: Der endogene *GR*-Locus ist prinzipiell für eine Insertion zugänglich

(A) Der Wildtyp-Locus des endogenen *PbGR*-Gens ist schematisch im oberen Teil sichtbar (WT), hierbei repräsentiert der Pfeil das Startkodon und die Fahne den Transkriptions-Stopp. Das Kontroll-Konstrukt *pPbGR_CONTROL* ist als Plasmid schematisch darunter dargestellt mit endogener *PacI*-Schnittstelle zur Linearisierung. Der rekombinante Integrationslocus *bGRCONTROL*, wie er nach der Transfektion erscheint, ist ganz unten dargestellt. Dabei entstehen zwei Versionen des *GR*-Gens, eine funktionelle Kopie in gesamter Länge und eine trunkierte, nicht-funktionelle Kopie, beide sind getrennt durch den Selektionsmarker *DHFR/TS*. Die Integrations-spezifischen *Primer*kombinationen und die erwarteten Fragmente sind als Pfeile bzw. Linien dargestellt. (B) Genotypisierung einer parentalen *bGRCONTROL* Parasiten-Population durch Integrations-spezifische PCR Analyse. Die Bestätigung der erwarteten Gen-Inaktivierung erfolgte durch Oligonukleotid-Kombinationen, welche nur im rekombinanten Locus zu einer Amplifikation führen (test).

Da durch die Anwendung einer Vielfalt an Strategien zur *GR*-Inaktivierung Spezies-, Stamm-, Protokoll- oder Vektor-bedingte technische Probleme nahezu ausgeschlossen werden können, scheint die Gen-Inaktivierung von *GR* einen letalen Effekt auf Plasmodien auszuüben. Somit scheint *GR* eine zentrale Rolle für das *in vivo* Wachstum von Plasmodien Blutstadien einzunehmen.

3.3.1 Trans-Spezies-Komplementation der *P. berghei* Glutathionreduktase

Um diese potentiell lebensnotwendige Funktion von *GR* zur Etablierung einer *Plasmodium* Blutstadien-Infektion funktionell bestätigen zu können, wurde als nächster Schritt eine *GR*-Mutante mit zurück gewonnener Funktion hergestellt. Hierbei sollte untersucht werden, ob das *GR*-Gen einer anderen *Plasmodium* Spezies – in diesem Fall das Ortholog von *P. falciparum* (PlasmoDB-Datenbanknummer: PF14_0192) – das *P. berghei* Gen komplementieren kann. In dieser Strategie wurde das endogene *PbGR*-Gen mit einem *replacement*-Vektor, welcher die *P. berghei* *GR* 5'-flankierende Region, die *P. falciparum* *GR* kodierende Sequenz und die *P. berghei* *DHFR/TS* 3'UTR zur stabilen mRNA Expression enthielt, komplementiert. Klonierung dieser genannten Regionen in den b3D.DT^H.^D-Transfektionsvektor resultierte in dem Konstrukt *pPbGR::PfGR*.

Durch ein doppeltes homologes Rekombinationsereignis sollte das *PfGR*-Gen in den endogenen *P. berghei* Expressions-Locus integrieren (Abb. 3.12 A). Die Integration eines orthologen Gens unter Kontrolle der endogenen Promotorelemente ist eine unerlässliche Voraussetzung, um eine zeitlich falsch abgestimmte Expression des Genproduktes zu vermeiden [97]. Parentale Parasiten-Populationen konnten nach Transfektion dieses Konstruktes mit *P. berghei* Schizonten des Stammes ANKA GFP-507cl unter Nutzung des Amaxa-Transfektionsprotokolls erhalten werden. Diese parental Populationen wurden genotypisiert, um die korrekte Herstellung des mutierten *GR*-Locus zu verifizieren. Dabei wurden die verwendeten Oligonukleotide so eingesetzt, dass nur bei dem integrierten Komplementations-Konstrukt eine Sequenz amplifiziert werden konnte, nicht jedoch bei Wildtyp oder bei Vorlage des Konstrukts als Episom. In zwei parallelen Ansätzen (siehe Tab. 3.3) konnten parenterale Populationen mit detektierbarer Gen-Komplementation erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

Diese parental Parasiten wurden nachfolgend zur Isolierung einer entsprechenden klonalen Parasitenlinie eingesetzt, so dass die rekombinanten Parasiten dann ausschließlich den komplementierten *GR*-Genabschnitt enthalten. Es konnten zwei klonale Parasiten-

Populationen, genannt $\Delta GR::PfGR$, erhalten werden, die genotypisch und phänotypisch identisch waren.

Das korrekte *replacement*-Ereignis wurde durch PCR analysiert. Hierbei wurden die eingesetzten Oligonukleotide so gewählt, dass im Vergleich zu WT Parasiten die Integration des Transfektionsvektors dargestellt und das Fehlen von WT (= *P. berghei* GR-enhaltenden) Parasiten in der klonalen Parasitenlinie dargestellt werden konnte (Abb. 3.12 B).

Nachdem die Integration des Komplementations-Konstruktes in das *P. berghei*-Genom nachgewiesen werden konnte, wurde weiterhin das Fehlen von *P. berghei*-spezifischem GR-Transkript untersucht. Hierzu wurden aus $\Delta GR::PfGR$ Blutsstadien mRNA isoliert und davon ausgehend cDNA synthetisiert. Mit dieser hergestellten cDNA konnte das Vorhandensein von *PbGR*-Transkript mit PCR und *P. berghei*-spezifischen Oligonukleotiden untersucht werden. Im Gegensatz zu Wildtyp (WT) Parasiten mit endogenem GR-Gen konnte in den mit dem *P. falciparum* Ortholog komplementierten Parasiten kein *PbGR*-Transkript detektiert werden (Abb. 3.12 C), wohl aber ein *P. falciparum*-spezifisches Transkript, welches nicht bei WT Parasiten erscheint. Zur Überprüfung der mRNA-Präparation diente eine Kontrollamplifikation eines Teils des Plasmoredoxin-Gens.

Das Vorhandensein des *PfGR*-Proteins konnte im Western Blot nicht eindeutig bestimmt werden, da der verwendete *P. falciparum* GR-Antikörper eine Kreuzreaktion mit dem *P. berghei* GR-Protein aufwies (nicht gezeigt).

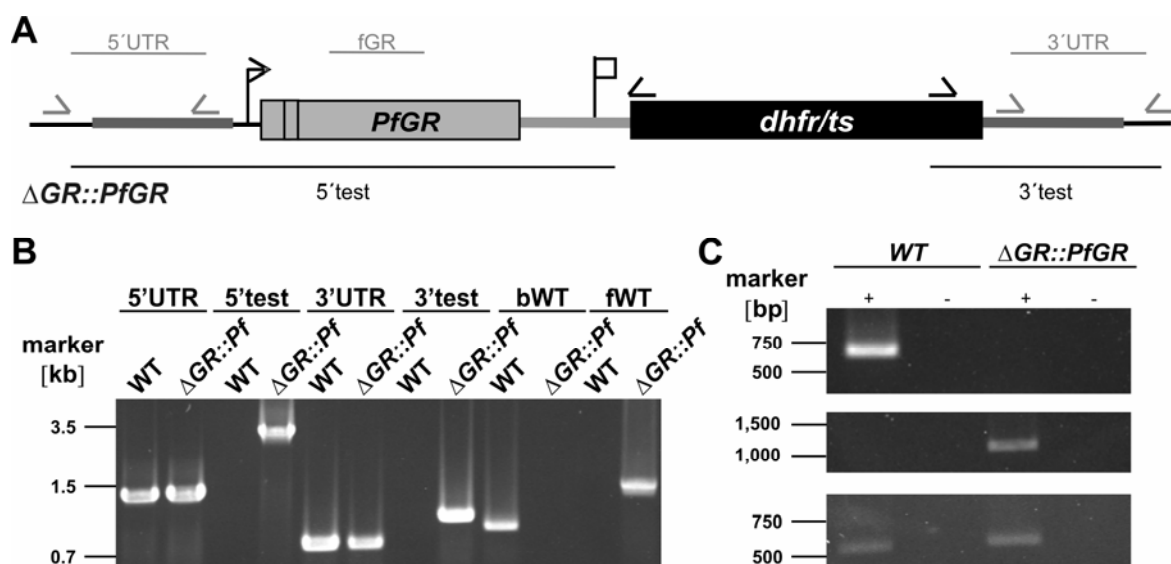


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Komplementation des *P. berghei* GR-Gens mit dem *P. falciparum* Ortholog

(A) Der erwartete $\Delta GR::PfGR$ Locus nach erfolgreicher Integration des Komplementations-Vektors; hierbei erfolgte der Austausch des *P. berghei* GR-Gens mit dem Ortholog von *P. falciparum* unter Kontrolle der

endogenen Promotorelemente. Integrations-spezifische Testprimer Kombinationen sowie die erwarteten Fragmente sind als Linien dargestellt, die Pfeile geben die Positionen der primer an. (B) Genotypische Bestätigung des GR-Austauschs durch replacement-spezifische PCR Analysen mit Oligonukleotid-Kombinationen, welche nur im rekombinanten Locus zu einer Amplifikation führen (test). Das Fehlen eines bGR-spezifischen Amplifikates (bWT) bestätigt die Reinheit der klonalen Parasitenlinie $\Delta GR::PfGR$. Das Vorhandensein eines fGR-spezifischen Amplifikates (fWT) bestätigt die Integration des *P. falciparum* GR-Gens in das *P. berghei*-Genom. (C) Depletion von *P. berghei* GR-Transkripten in $\Delta GR::PfGR$ Parasiten. WT und $\Delta GR::PfGR$ cDNAs von Blutstadien dienten als template für PbGR- (oberes Bildelement) und PfGR- (mittleres Bildelement) spezifische PCR Reaktionen. Amplifikation des Plasmoredoxin-Transkriptes (unteres Bildelement) diente als Positivkontrolle.

Um zu bestätigen, dass das *P. falciparum* GR-Ortholog das Fehlen des *Pb* Gens komplementieren kann, wurde ein *in vivo* Wachstumsvergleich durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 1000 WT bzw. $\Delta GR::PfGR$ Parasiten intravenös in Mäuse injiziert und der Verlauf der Parasitämie alle 12 Stunden verfolgt. Die komplementierte Parasiten-Population $\Delta GR::PfGR$ zeigte keinen Wachstumsnachteil verglichen mit WT Parasiten (Abb. 3.13). Dies bedeutet, dass das *P. falciparum* GR-Gen funktionell das *P. berghei* Gen komplementieren kann.

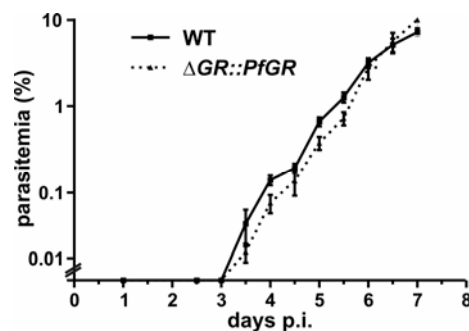


Abb. 3.13: Replikation der $\Delta GR::PfGR$ Parasiten unterscheidet sich nicht von der Replikation der WT Parasiten

Gezeigt sind *in vivo* Wachstumsvergleichs-Kurven von WT und $\Delta GR::PfGR$ Blutstadien. Jeweils sechs naive Tiere wurden intravenös mit 1000 Blutstadien Parasiten infiziert, wobei die Parasitämie nachfolgend alle 12 Stunden durch Giemsa-gefärbte Blutaussstriche überprüft wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der GR-abhängige Stoffwechselweg eine essentielle Funktion für Plasmodien Blutstadien einnimmt.

3.4 Charakterisierung des Inhibitors Methylenblau

Neben der auf genetischer Ebene erfolgten Validierung verschiedener redox-aktiver Gene als *drug targets* wurde im Rahmen dieser Arbeit der Hemmstoff Methylenblau (MB) enzymkinetisch einerseits an Plasmodien, andererseits an humanen Disulfidreduktasen GR und TrxR charakterisiert.

3.4.1 Methylenblau ist ein potenter Inhibitor der *P. falciparum* Disulfidreduktasen

Der hemmende Effekt von MB auf die physiologischen Reaktionen der untersuchten Enzyme ist in Tab. 3.4 zusammengefasst. Die Ermittlung der Hemmwirkung von MB folgte dem in Kapitel 2.2.7.4.8 geschilderten Ablauf.

MB ist ein potenter Inhibitor der rekombinanten *P. falciparum* Glutathionreduktase mit einer halbmaximalen Konzentration (IC_{50} -Wert) im unteren mikromolaren Bereich (5,4 μM). Damit konnte der bereits beschriebene IC_{50} -Wert bestätigt werden [57]. Zwar wurde die humane GR ebenfalls gehemmt (IC_{50} -Wert von 16,4 μM), im direkten Vergleich mit der *Plasmodium* GR erfährt sie jedoch eine um den Faktor 3 geringere Hemmung. Der Hemmtyp konnte nicht eindeutig bestimmt werden, es handelt sich aber nicht um eine kompetitive Hemmung. In der Annahme, dass es sich eher um einen nicht-kompetitiven Hemmtyp [57] als um einen unkompetitiven [23] Hemmtyp handelt, entsprechen die IC_{50} -Werte der Tabelle den K_i -Werten. MB als Inhibitor der humanen GR bindet vermutlich in der zentralen Höhle zwischen den zwei Untereinheiten der GR [171, 216].

Die ermittelte Hemmwirkung im Falle der Thioredoxinreduktase zeigt eine um den Faktor zwei stärkere Hemmung der humanen TrxR verglichen mit der *Plasmodium* TrxR.

3.4.2 Methylenblau als Substrat für Disulfidreduktasen

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Methylenblau in der Lage ist, als artifizielles Substrat der verschiedenen *Plasmodium* und humanen Disulfidreduktasen zu dienen. Anhand kinetischer Parameter aus *steady-state* Kinetiken lassen sich allgemeine Aussagen zur Substratspezifität und Substrataffinität ableiten, die für spezielle Inhibitor kinetiken von Bedeutung sind. Die Wechselzahl k_{cat} [s^{-1}], definiert als die Anzahl Substratmoleküle (in Mol), die pro Zeiteinheit (sec) katalytischem Zentrum des Enzyms (in Mol) unter optimalen Bedingungen umgesetzt wird, kann darüber hinaus bestimmt werden. Im kinetischen Optimum k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] wird die Katalysegeschwindigkeit des Enzyms nur durch die Geschwindigkeit beschränkt, mit der es in der Lösung seinem Substrat begegnet

(Diffusionsgeschwindigkeit). Die K_M - und V_{max} -Werte der physiologischen Substrate GSSG und Trx sowie des artifiziiellen Substrates MB der unterschiedlichen Disulfidreduktasen wurden anhand nicht-linearer Regression ermittelt sowie die dazugehörigen k_{cat} - und k_{cat}/K_M -Werte der Enzymkatalyse bestimmt.

Das Potential von MB als Substrat der untersuchten Enzyme ist in Tab. 3.4 zusammengefasst. Hierfür wurden, wie in den Kapiteln 2.2.7.4.6 und 2.2.7.4.7 beschrieben, die Enzymaktivitäten mit dem physiologischen Disulfid-Substrat und mit dem artifiziiellen Substrat MB in parallelen Ansätzen bestimmt. Assays mit MB als Substrat wurden mit 1 U Enzym pro ml durchgeführt, während 10 mU/ml Enzym bei Untersuchungen mit dem physiologischen Substrat eingesetzt wurden. Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass *in situ* die Enzymkonzentrationen (>1 U/ml, [101, 137]) in der Tat über 100fach höher als normalerweise in enzymkinetischen Untersuchungen verwendet vorliegen.

Enzyme	Subunit M_r	K_M of MB (μM)	k_{cat} for MB (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	IC_{50} for MB (μM)	K_M for cogn. substrate (μM)	k_{cat} for cogn. substrate (s^{-1})	NADPH auto-oxidase (s^{-1})
Human GR	52.4	6.3	0.03	4,760	16.4	65	200	0.003
Human GR C58A	52.4	17	0.13	7,650	NA	NA	NA	0.005
Human GR C63A	52.4	56	0.62	11,100	NA	NA	NA	0.070
Human GR C58A/C63A	52.4	67	0.60	8,900	NA	NA	NA	0.065
Human TrxR1	55.2	95	10.00	105,000	30	10	25	0.001
Porcine LipDH	55.0	28	3.40	121,000	>1,000	>1,000	290	0.220
<i>P. falciparum</i> GR	57.2	50	2.50	50,000	5.4	83	150	0.030
<i>P. falciparum</i> TrxR	60.3	68	6.30	88,200	59	2-10	50	0.006
<i>P. falciparum</i> mtLipDH	57.2	49	7.40	151,000	>1,000	>1,000	320	ND

Tab. 3.4: Aktivitäten der als Methylenblau Reduktasen untersuchten Disulfidreduktasen

Die in dieser Arbeit untersuchten Disulfidreduktasen sind rot umrandet. GR wurde im GR-Assaypuffer bei pH 6,9 untersucht, TrxR bei pH 7,4. cogn. *cognate* = verwandtes Substrat. NA steht für *not applicable* (nicht verwendbar), da die humanen GR- Mutanten keine messbare Aktivität mit GSSG zeigten. ND bedeutet nicht durchgeführt.

Die Reduktion von den Disulfiden wurde unter Nutzung des optischen Tests bei 340 nm als NAD(P)H-Oxidation gemessen. Bei dieser Wellenlänge liegen die ϵ -Werte für MB bei 3,9 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [154] und für LeukoMB bei 3,3 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [30]. Der gegenläufige Beitrag des Produktes LeukoMB an der gesamten Absorptionsabnahme wurde vernachlässigt, da unter aeroben Bedingungen mit hoher Geschwindigkeit autooxidiert wird, so dass die MB-Konzentration als konstant und die Konzentration von LeukoMB als sehr gering angesehen werden kann. Die Reaktion lief bis zum vollständigen Verbrauch von NADPH ab; der steilste

Teil der Absorptionsabnahme wurde zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen.

Die Korrektur der spontanen Reaktion von MB und NADPH sowie die NADPH-Autooxidations-Aktivität wurden wie in den Kapiteln 2.2.7.4.4 und 2.2.7.4.5 beschrieben für die entsprechenden Enzyme berücksichtigt.

Die K_M -Werte als Maß der Substrataffinität zu dem jeweiligen Enzym sowie die dazugehörigen Wechselzahlen k_{cat} und katalytischen Effizienzen k_{cat}/K_M der untersuchten Disulfidreduktasen mit MB sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Der direkte Vergleich zwischen humaner und *Plasmodium* GR zeigt, dass MB eine höhere Affinität zum humanen Enzym zeigt, da bereits bei einer Substratkonzentration von 6,3 μM das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeitet, im Gegensatz zu der Substratkonzentration von 50 μM , welche die *Plasmodium* GR benötigt. Ausschlaggebend für die Bewertung, welche Affinität ein Substrat zu einem bestimmten Enzym besitzt und wie gut es durch dieses Enzym umgesetzt werden kann, ist nicht allein der K_M -Wert; wichtige zusätzliche Aussagen liefern in diesem Zusammenhang die Wechselzahl k_{cat} der betrachteten Reaktion und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M . Bei Betrachtung dieser Werte fällt auf, dass der Substratumsatz pro Sekunde bei der *Plasmodium* GR mit $2,50 \text{ s}^{-1}$ deutlich höher als bei der humanen GR mit $0,03 \text{ s}^{-1}$ liegt. Dies wird noch deutlicher bei Einbeziehung der katalytischen Effizienz: demnach setzt die *Plasmodium* GR mit einer katalytischen Effizienz von $50.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ MB als Substrat etwa 10mal effektiver um als die humane GR mit einer katalytischen Effizienz von $4.760 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Betrachtet man die Werte von *Plasmodium* und humaner TrxR, lässt sich eine geringfügig effizientere Umsetzung von MB durch die humane Disulfidreduktase feststellen. Zwar liegt der K_M -Wert für MB bei dem *Plasmodium* Enzym mit 68 μM niedriger als der entsprechende Wert bei der humanen TrxR mit 95 μM , aber die Wechselzahl von 10 s^{-1} ist bei dem humanen Enzym höher als die der Parasiten Disulfidreduktase ($6,3 \text{ s}^{-1}$). Diese erhöhte Wechselzahl hat zur Folge, dass die katalytische Effizienz der Umsetzung von MB als artifiziellem Substrat der TrxR mit $105.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei dem humanen Enzym geringfügig höher liegt als die der *Plasmodium* TrxR mit $88,2000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unter dem Gesichtspunkt der selektiven Hemmung MB ein effektiver Inhibitor der Glutathionreduktase ist, da hier – anders als im Fall

der TrxR – das *Plasmodium* Enzym in seiner physiologischen Funktion stärker als das humane Enzym gehemmt wird.

Zur Charakterisierung der Substrat-Eigenschaften von MB an den untersuchten Disulfidreduktasen werden die jeweiligen zusammengehörigen Paare betrachtet (humane und *Pf* GR bzw. humane und *Pf* TrxR). Dies zeigt, dass die *Plasmodium* Glutathionreduktase effizienter als das humane Enzym MB umsetzen kann, während im Gegensatz dazu die humane TrxR einen im Vergleich zum Plasmodien Enzym nur geringfügig erhöhten Umsatz von MB aufweist.

Somit zählt MB zu den pharmakologisch interessanten Substanzen, welche mit antioxidativen Disulfidreduktasen in Wechselwirkung treten. Weitere Vertreter dieser Wirkstoffklasse umfassen Nitrofurantoin und Naphtochinonderivate [7, 101]. Der in der Einleitung erwähnte und durch die Abb. 1.7 verdeutlichte redox-aktive Zyklus von MB bei der Behandlung von Methämoglobinämien kann somit auch Enzym-katalysiert – wie in dieser Arbeit gezeigt besonders effizient durch die GR – ablaufen (siehe Abb. 3.14).

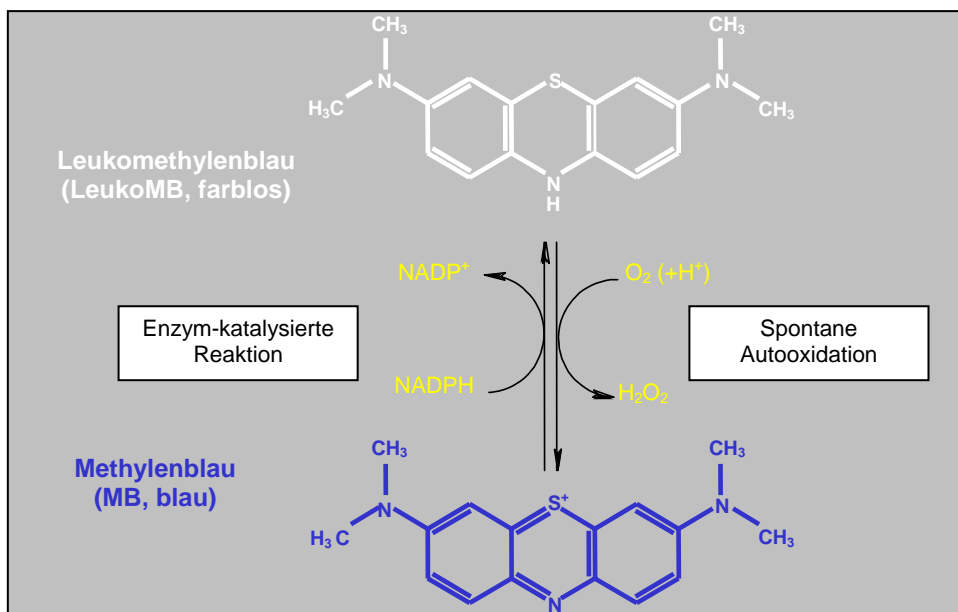


Abb. 3.14: Metylenblau als H_2O_2 -produzierender Redoxpendler in *P. falciparum*

Die Glutathionreduktase und andere Disulfidreduktasen des Malariaparasiten katalysieren die Reduktion von Metylenblau (MB) durch NADPH. Das resultierende LeukoMB, ein höchst effizienter Autooxidator, wird nachfolgend durch O_2 oxidiert. Jeder dieser Reaktionszyklen führt zu einem Verbrauch von NADPH und zellulärem Sauerstoff, und zur gleichzeitigen Produktion von (Parasiten-)toxischen reaktiven Sauerstoffspezies, vorwiegend H_2O_2 .

In diesem zyklischen Prozess katalysiert die Glutathionreduktase die Reduktion von MB durch NADPH. Dies führt zur Bildung des farblosen LeukoMB, welches ein höchst effizienter Autooxidator ist. Somit wird LeukoMB spontan durch zellulären Sauerstoff oxidiert, wobei reaktive Sauerstoffspezies in der Form von H_2O_2 entstehen. In jedem Enzym-katalysierten Redox-Zyklus entstehen somit pro-oxidative Verbindungen.

Aus zellpharmakologischer Perspektive wird Methylenblau daher als subversives Substrat oder Sabotage-Inhibitor bezeichnet, da in Gegenwart von MB normalerweise antioxidative, das intrazelluläre reduzierende Milieu der Parasiten schützende Disulfidreduktasen als pro-oxidative ROS-generierende Enzyme dienen. In jedem Reaktionszyklus kommt es bilanzmäßig zu einem Verbrauch wichtiger, zellulärer Ressourcen wie Sauerstoff und NADPH und zur Bildung von (parasito)toxischem H_2O_2 .

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung bestimmter redox-aktiver Gene von *Plasmodium* als *drug target* untersucht. Dies geschah mit Hilfe von Methoden der reversen Genetik in Nagetier-Malariamodelle. Die erhaltenen Daten zeigen eine entbehrliche Funktion der Gene für Plasmoredoxin und Thioredoxinreduktase, wohingegen die Glutathionreduktase auch auf genetischer Ebene als eines der meist versprechenden *drug targets* bei *Plasmodium* validiert werden konnte.

Zusätzlich wurde im Rahmen der Arbeit ein spezifischer Inhibitor, Methylenblau, auf seine Wechselwirkungen mit Plasmodien und humanen Disulfidreduktasen untersucht; diese Ergebnisse liefern zusätzliche Erklärungen und Mechanismen für die antiplasmodiale Wirkung von Methylenblau auf molekularer Ebene.

4.1 Reverse Genetik bei Plasmodien

Mit Aufklärung der kompletten genetischen Sequenz von *P. falciparum* [66] wurde eine Fülle neuer Informationen verfügbar, die für viele Bereiche der Malaria-Forschung von Nutzen sind [204]. Das Plasmodien-Genom umfasst 14 Chromosomen, auf denen geschätzte 5000 Gene kodiert sind. Die zentrale Herausforderung zur Nutzung der Sequenz-Informationen ist, die jene Parasiten-Gene bzw. deren Genprodukte zu identifizieren, welche an einem bestimmten biologischen Prozess, wie z.B. der in dieser Arbeit untersuchten antioxidativen Abwehr, entscheidend beteiligt sind. Für dieses Vorhaben sind molekulargenetische Methoden unerlässlich, mit denen das Genom manipuliert und somit eine definierte Funktion einer bestimmten Sequenz zugeordnet werden kann.

Plasmodium war die letzte Gattung der medizinisch relevanten Protozoen, welche den Methoden der reversen Genetik zugänglich wurde [36]. Die Transfektion dieser Parasiten wird dadurch erschwert, dass sie während des größten Teils ihres Lebenszyklus intrazellulär innerhalb einer Vakuole lokalisiert sind, wobei der parasitäre Nukleus von seiner Umgebung durch vier Membranen getrennt ist. Erst 1993 gelangen transiente Transfektionen bei – extrazellulär liegenden – Gameten und Zygoten von *P. gallinaceum* [73]; der entscheidende Durchbruch fand aber 1995 statt, als erythrozytäre Stadien von *P. falciparum* [212] und *P.*

berghei [196] transfiziert werden konnten. Die Transfektion war transient bei *P. falciparum* und, mithilfe eines Pyrimethamin-Resistenzgens, stabil bei *P. berghei*.

Die zunächst bestehenden Probleme der ineffizienten Transfektions konnten zumindest für *P. berghei* mit der Etablierung eines neuen Transfektions-Protokolls unter Nutzung des Amaxa-Elektroporators entscheidend verbessert werden [90, 91]. Bei *P. falciparum* hingegen liegt die Effizienz bei der Transfektion von Plasmid-DNA weiterhin bei 10^{-5} bis 10^{-6} [149]. Limitiert wird die Transfektions-Technologie dadurch, dass Gene mit einer essentiellen Funktion für Blutstadien, auf denen die Selektion basiert, nicht genau untersucht werden können. Mutanten mit gestörter Funktion z.B. bei der Erythrozyten-Invasion oder Replikation innerhalb der Erythrozyten sind entweder nicht lebensfähig und damit nicht detektierbar oder sie werden von Parasiten verdrängt, die durch das *Gen-targeting* nicht erreicht werden konnten. Welches ist dann – mit den zurzeit bei Malaria-Parasiten anwendbaren Methoden der reversen Genetik – der bestmögliche Beweis dafür, dass ein bestimmtes Gen lebensnotwendig ist? Es ist der Einsatz eines integrierbaren, aber nicht-inaktivierenden Vektors im direkten Vergleich mit einem Gen-inaktivierenden Plasmid [42]. Diese Strategie wurde beispielsweise für MSP-1 und AMA-1 verfolgt. Durch Mutanten mit zurück gewonnener Funktion ergaben sich bei diesen Untersuchungen auch Hinweisen auf die Rollen von MSP-1 und AMA-1 bei der Erythrozyten-Invasion durch Merozoiten; dies wurde durch Austausch von homologen Genen zwischen human- und Nagetier-pathogenen Plasmodien-Spezies erreicht [148, 194].

Für Gene, welche sich mit der Transfektions-Technologie nur eingeschränkt untersucht lassen, bieten sich molekulare Methoden an, mit denen Gene mutagenisiert oder herunter reguliert werden können; hier ist vor allem das Tetrazyklin-induzierbare Transaktivator-System zur Gen-Expression zu nennen. Dieses ist das zuverlässigste System zur Untersuchung essentieller Gene in *T. gondii* [124], welches aber erst kürzlich auf *P. falciparum* übertragen werden konnte [125]. Zwar hat sich das Tetrazyklin-induzierbare System bei *P. falciparum* zur Expression von Transgenen, wie z.B. GFP-markierten Oberflächenproteinen, bewähren können [170], jedoch ist unter induzierten Bedingungen eine starke Expression nur bei 10-20% der Parasiten zu finden. Es scheint sehr wahrscheinlich, dass diese stark exprimierenden Parasiten eine relativ große Anzahl Plasmid-Kopien enthalten. Infolgedessen ist dieses System gegenwärtig für konditionelle *knock outs* nicht geeignet, da unter diesen Umständen eine integrierte Kopie des induzierbaren Plasmids vorhanden sein kann, welche ausreichend hohe Spiegel des

induzierten Transgens exprimiert und somit in der Lage ist, die Funktion des deletierten, endogenen Gens zu komplementieren [126].

RNA-Interferenz (RNAi) ist in den letzten Jahren zu einer weiteren leistungsstarken Methode der Targetvalidierung geworden, bei der ein zu untersuchendes Gen durch Abbau der kodierenden mRNA ausgeschaltet wird. Bei *Plasmodium* ist diese Methode jedoch schwer zugänglich und nicht zufrieden stellend, wie die Studie zu Falcipain-1 zeigte. Hier legten RNAi-Untersuchungen den Schluss nahe, dass diesem Gen eine essentielle Funktion in den Blutstadien zugeschrieben werden kann [116], wohingegen die Herstellung von Falcipain-1 *knock out*-Parasiten letztlich zeigte, dass dieses Protein weder essentiell für Blutstadien ist, noch morphologische Veränderungen dieser Parasiten bewirkt [180]. Diese Ergebnisse zeigen, zusammen mit dem Fehlen einer erkennbaren RNAi-Maschinerie in *Plasmodium*-Genomen [8, 24], dass genetische *screens* in *P. falciparum* auf der Basis dieser Technologie Schwierigkeiten bergen.

Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Targetvalidierung unter Nutzung spezifischer Inhibitoren mit möglichst hoher Korrelation zwischen dem hemmenden Effekt *in vitro* auf einzelne isolierte Stoffwechselkomponenten, wie z.B. Enzyme eines bestimmten Stoffwechselweges, und Hemmwirkung *in vivo* auf den Parasiten in seiner Wirtszelle. Dieser Ansatz wurde z.B. kürzlich gewählt, um die verschiedenen Endopeptidasen des Hämoglobin-Abbaus in Plasmodien auf ihre Tauglichkeit als *drug target* zu untersuchen [44]. Jedoch handelt es sich bei der chemischen Validierung in jedem Fall nur um eine Annäherung an eine essentielle Funktion eines bestimmten Genproduktes, da zusätzliche Effekte auf die untersuchten Enzyme und andere *targets* experimentell nicht ausgeschlossen werden können. Ein Beispiel für diese Problematik sind auch die Wirkungen des Methylenblau auf die Disulfidreduktasen von *Plasmodium falciparum* [30].

Um ein Gen demnach eindeutig einer bestimmten Funktion zuzuordnen zu können, ist die viel versprechendste, gegenwärtig erhältliche Methode der reversen Genetik die Transfektion zur stabilen Gen-Inaktivierung bzw. Gen-Komplementierung. Der Vorteil eines verbesserten Transfektionsprotokolls mit deutlich erhöhter Effizienz [90, 91] kommt besonders bei dem Mäusemalaria-Modell von *P. berghei* zum Tragen. Dieses System bietet weiterhin den Vorteil, dass die Funktion eines Genes während des kompletten Lebenszyklus untersucht werden kann. Da die Plasmodien-Enzyme der antioxidativen Abwehr sehr attraktive *drug targets* darstellen, wurde in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig die hierarchische

Natur der beteiligten Komponenten auf genetischer Ebene unter Nutzung stabiler Transfektion im Mäusemalaria-Modellsystem untersucht.

4.2 Depletion von Plasmoredoxin offenbart eine nicht-essentielle Funktion im Lebenszyklus von *Plasmodium*

Bei Plasmoredoxin handelt es sich um ein im Redoxstoffwechsel von *Plasmodium* zentral positioniertes, redox-aktives Protein mit vielseitigen Interaktionen innerhalb des antioxidativen Netzwerkes [15]. Zusätzlich zu seinen biochemisch interessanten Eigenschaften, besitzt Plasmoredoxin ein Merkmal, welches für die rationale Entwicklung spezifischer Antimalariamittel von besonderer Wichtigkeit ist, nämlich das Fehlen eines homologen Proteins in der menschlichen Wirtszelle. Plasmoredoxin scheint einzig bei *Plasmodium*-Spezies vorzukommen; diese Einschätzung basiert auf den derzeit erhältlichen Datenbank-Informationen. Innerhalb der Thioredoxin-Familie besitzt *P. falciparum* Plasmoredoxin die höchste Identität von 31,4% mit *P. falciparum* Thioredoxin [15]. Außerhalb dieser Gruppe ist die maximale Identität etwa 32%, hierbei handelt es sich zum einen um ein Respiration-regulierendes Protein von *Bacillus subtilis* (ResA, Datenbanknummer: P35160) und zum Anderen um HelX (Datenbanknummer: M96013), eine Disulfid-Oxidoreduktase des Bakteriums *Rhodobacter capsulatus* [15]. Phylogenetische Analysen zeigen weiterhin, dass *Plasmodium* Plasmoredoxine eine neue Familie redox-aktiver Proteine innerhalb der Thioredoxin-Superfamilie repräsentieren.

Die vorliegende Arbeit befasste sich deshalb mit der zellulären Rolle von Plasmoredoxin in dem Nagetiermalaria-Modell von *Plasmodium berghei*.

Mithilfe von klassischer, reverser Genetik konnte das Plasmoredoxin-Gen in *P. berghei* inaktiviert werden. Die nachfolgende Charakterisierung der Plasmoredoxin-defizienten Parasiten zeigte eine unbeeinträchtigte Entwicklung dieser Parasiten in erythrozytären Wirtszellen. Dieser Befund schließt die Nutzung spezifischer gegen Plasmoredoxin gerichteter Wirkstoffe in der Entwicklung neuer Antimalariamittel. Die erfolgreiche Generierung Plasmoredoxin-defizienter Parasiten erlaubte eine detaillierte Beurteilung der *in vivo* Funktion dieses Proteins für alle Stadien des kompletten Lebenszyklus von *Plasmodium*. Auch hier konnte keine lebensnotwendige Rolle von Plrx bei einer der unterschiedlichen Phasen des Lebenszyklus gezeigt werden. Folglich ist eine gezielte Inhibition von Plasmoredoxin weder für eine Transmissions-blockierende noch für eine kausal-prophylaktische Bekämpfung der Malaria geeignet.

Um eine Erklärung für das Fehlen einer essentiellen Rolle von Plasmoredoxin in Malariaparasiten zu finden, muss dieses redox-aktive Protein nicht isoliert, sondern im Zusammenhang der Thioredoxin-Familie betrachtet werden. Plasmodien besitzen zusätzlich zu Plasmoredoxin eine Anzahl kleiner Redox-Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu Thioredoxin. Zu dieser Familie gehören die Thioredoxine, Glutaredoxine, das Tryparedoxin der Trypanosomen, Proteindisulfid-Isomerasen und einige bakterielle Disulfidbrückenbildende Proteine.

Diese Gruppe von Proteinen führen mit Hilfe ihrer katalytisch aktiven Cystein-Reste Oxidations- und Reduktions-Reaktionen aus. Die gemeinsamen Merkmale der Mitglieder dieser Familie sind das typische Motiv des aktiven Zentrums C-X-X-C sowie eine Ähnlichkeit der Tertiärstruktur der Proteine, die sogenannte Thioredoxin-Faltung, trotz geringer Ähnlichkeit der jeweils zugrunde liegenden Aminosäure-Sequenz [119]. Homozygote Deletion des zytoplasmatischen Trx1 oder der mitochondrialen Isoform Trx2 von Mäusen hatte Letalität in einem frühen embryonalen Stadium zur Folge, was darauf hinweist, dass das Thioredoxin-System eine Schlüssel-Rolle in der Entwicklung multizellulärer Organismen einnimmt [121, 144].

Bisher wurden fünf Thioredoxin-verwandte Proteine zusätzlich zu Plasmoredoxin in *P. falciparum* identifiziert [142]. Das zytoplasmatische Trx1 ist das hauptsächliche Substrat für Thioredoxinreduktase und ist selbst in der Lage, Thioredoxin-abhängige Peroxidasen zu reduzieren. Darüber hinaus ist Trx1 imstande, mit Peroxiden, Dehydroascorbat, Liponsäure, GSSG und Lipoamid direkt zu reagieren. Für Trx2 (und TPx2) wurde eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen [26]. Trx2 zeigt außerdem eine generelle Aktivität der Disulfid-Reduktion und dient als Elektronendonator für Thioredoxinperoxidase und Glutathiondisulfid. Trx3 wurde als redox-aktives Protein charakterisiert, welches durch *P. falciparum* Thioredoxinreduktase reduziert werden kann; zusätzlich besitzt es eine potentielle Apikoplast-*targeting* Sequenz. Des Weiteren wurden zwei Thioredoxin-ähnliche Proteine in *P. falciparum* identifiziert (Tlp1 und Tlp2), von denen angenommen wird, dass sie partiell überlappende Funktionen mit klassischen Thioredoxinen besitzen.

Eine Erklärung für die in dieser Arbeit festgestellte Entbehrlichkeit des Plasmoredoxin könnte folglich Redundanz in den Funktionen der Mitglieder der Thioredoxin-Familie sein. Ähnlich ist die Situation bei bestimmten Bakterien. Das *E. coli* Zytosol enthält typischerweise zwei Thioredoxine (TrxA und TrxC) sowie drei Glutaredoxine (GrxA, GrxB, GrxC) [34, 157]. Von diesen fünf Proteinen sind drei (TrxA, TrxC und GrxA) in der Lage, die Ribonukleotidreduktase zu reduzieren. Null-Mutanten, denen eines dieser drei Gene fehlt,

sind lebensfähig [157, 165], wohingegen der entsprechende Dreifach-*knock out* nicht lebensfähig ist [184]. Die essentielle Aufgabe dieser sich gegenseitig ergänzenden bakteriellen Redox-Proteine kann am besten durch ihre überlappende Funktion erklärt werden [151]. Folglich ist in *E. coli* das Vorhandensein einer dieser Oxidoreduktasen ausreichend für das Überleben [184].

Ein weiteres Beispiel findet sich bei *Saccaromyces cerevisiae*. Bei der Hefe gibt es zwei zytoplasmatische Glutaredoxine (Grx1/2, [34, 40, 115] und zwei Thioredoxine (Trx1/2, [136]. Analog zu den Verhältnissen bei Bakterien ist nur die vierfache Hefe-Mutante nicht lebensfähig und jedes einzelne Glutaredoxin oder Thioredoxin ist imstande, die Lebensfähigkeit wiederherzustellen [48]. Allerdings entwickeln Stämme, deren Glutaredoxin-Gene inaktiviert wurden, eine veränderte Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies [40, 115]. Des Weiteren zeigt der Thioredoxin Doppel-*knock out* einen schwerwiegenden Defekt im Zellzyklus, der in einer verlängerten S- und einer verkürzten G1-Phase resultiert [136]. Dieser Effekt ist vermutlich begründet in einer ineffizienten Thioredoxin-abhängigen Ribonukleotid-Reduktion mit der Folge einer ungenügenden Deoxyribonukleotid-Produktion, dem Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der DNA-Synthese.

Aufgrund der hochentwickelten revers-genetischen Methoden für Hefe und *E. coli* konnten somit vielfache Gen-Inaktivierungen innerhalb der Glutathion- und Glutaredoxin/Thioredoxin-Stoffwechselwege generiert werden [40, 115, 136, 184]. Dies führte zum Nachweis der überlappenden Eigenschaften dieser zwei Systeme und trug zum Verständnis der zellulären Antwort auf oxidativen und reduktiven Stress bei.

Gegenwärtig sind solch ausgereifte Methoden der reversen Genetik für *Plasmodium* nicht verfügbar. In der Zukunft wird es jedoch interessant sein, zu untersuchen, welche redox-aktiven Proteine des Malariaparasiten funktionell mit Plasmoredoxin überlappen. Dieses Protein könnte spezifische und wichtige zelluläre Funktionen im Zusammenwirken mit anderen Mitgliedern der Thioredoxin-Familie erfüllen, welche mit den in dieser Arbeit angewendeten Untersuchungen nicht beobachtet werden konnten. Zu erwarten ist, dass diese spezialisierten Funktionen besonders bei ausgeprägtem oxidativen Stress in bestimmten Parasitenstadien deutlich werden.

Im Anbetracht der entbehrlichen Rolle von Plasmoredoxin für die Blutstadien von Plasmodien und der Wahrscheinlichkeit weit reichender funktioneller Redundanz der Redox-

Abwehrmechanismen und Ribonukleotid-Reduktion kann Plasmoredoxin weitestgehend als *drug target* für die rationale Medikamentenentwicklung ausgeschlossen werden.

Die Validierung potentiell viel versprechender *drug targets* unter Anwendung der Methoden der reversen Genetik in Nagetiermalaria-Modellen ist ein unerlässliches Erfordernis im Verlauf präklinischer Medikamentenentwicklung. Die Feststellung, dass der Verlust von Plasmoredoxin die Entwicklung von *Plasmodium* Parasiten nicht beeinträchtigt, verdeutlicht die Bedeutung der reversen Genetik in der Entwicklung neuer Medikamente gegen Malaria.

4.3 Die Glutathionreduktase nimmt eine zentrale Rolle im Redoxnetzwerk des Malariaparasiten ein

Neben dem Plasmoredoxin als Mitglied der Thioredoxin-Familie wurden im Rahmen dieser Arbeit die beiden zentralen Enzyme der antioxidativen Abwehr von Plasmodien untersucht, die Thioredoxin- und die Glutathionreduktase. Diese Enzyme sind für die Verteilung der vom NADPH stammenden Elektronen auf die zellulären Komponenten des Redoxstoffwechsels verantwortlich, dienen somit der Verbindung des zellulären NADPH-Stoffwechsels mit dem Thiolstoffwechsel.

Die Interferenz mit dem Redoxstoffwechsel von Parasiten repräsentiert einen der viel versprechendsten Ansätze für die rationale Entwicklung neuer antiparasitärer Medikamente, da dieses Stoffwechselnetzwerk eine große Diversität unter den verschiedensten Pathogenen besitzt [101]. Zum Beispiel stützen Trypanosomatiden wie *Trypanosoma* und *Leishmania* ihre antioxidative Abwehr auf Trypanothion, ein Konjugat aus Glutathion mit Spermidin [55, 56]. Da der Trypanothion-abhängige Stoffwechsel einzigartig für diese Parasiten ist, repräsentiert er ein viel versprechendes *drug target*. Unterstützung dieses Ansatzpunktes kam von *knock out*- und *knock down*-Untersuchungen an der Trypanothionreduktase, welche zusammen eine essentielle Rolle des Enzyms und seines Produkts Dihydrotrypanothion für das Überleben und die Virulenz von *L. donovani* und *T. b. brucei* zeigen konnten [103, 191]. Im Gegensatz dazu konnte – abgesehen von Plasmoredoxin als Einzelkomponente – kein einzigartiger metabolischer Redoxstoffwechselweg bei *Plasmodium* identifiziert werden. Stattdessen verbinden die Malariaparasiten die zwei Arme der Glutathion- und Thioredoxin-abhängigen Reaktionen zu einem vielseitigen, funktionellen Redoxnetzwerk. In Ermangelung eines zusätzlichen Netzwerkes und des Fehlens von Katalase und einer klassischen Selen-haltigen Glutathionperoxidase sind die Malariaparasiten im verstärkten Maße von der Thioredoxin-

und Glutathionreduktase abhängig. Diese Besonderheit von Plasmodien macht man sich für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria zunutze. Hierbei ist es von größter Bedeutung, die hierarchische und eventuell essentielle Beschaffenheit der individuellen antioxidativen Abwehrlinien in *Plasmodium* zu definieren.

Die experimentelle Genetik unter Nutzung von *in vivo*-Modellen bietet exzellente Möglichkeiten der Verifizierung von *drug targets* unter physiologischen Bedingungen.

Durch gezielte Gen-Inaktivierungen bei zwei Nagetiermalaria-Modellen, *P. berghei* und *P. yoelii*, wurden im Rahmen meiner Arbeit die *in vivo*-Bedeutungen der Thioredoxinreduktase und der Glutathionreduktase untersucht. Somit wurde auf die in der Redox-Kaskade übergeordneten NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen fokussiert. Beide Enzyme agieren als Elektronen-Donatoren für ihre jeweiligen redox-aktiven Peptidsubstrate. In der Redox-Kaskade nachgeschaltete Komponenten sind es mehrere Mitglieder der Thioredoxin-Superfamilie, wie das oben ausführlich dargestellte Plasmoredoxin, die zusammen ein komplexes Netzwerk bilden.

Da initiale Ansätze zur Inaktivierung des Glutathionreduktase-Gens scheiterten, wurde für die Untersuchung dieses Gens eine systematische Strategie verfolgt. Die Sammlung von in dieser Arbeit vorgestellten Transfektionsvektoren zur Inaktivierung des Glutathionreduktase-Gens in zwei Malaria-Modell-Systemen ist wohl der vollständigste Ansatz für ein bei Plasmodien untersuchtes Gen. Diese Herangehensweise ist wesentlich, um technische Schwierigkeiten auszuschließen, welche die fälschliche Klassifizierung eines Gens und seiner Produkte als *drug target* zur Folge hätte.

Da Transfektion und Positivselektion zurzeit ausschließlich bei asexuellen Blutstadien-Parasiten möglich sind, können essentielle Gene nicht präzise untersucht werden, da Plasmodien-Mutanten mit Funktionsverlust des entsprechenden Gens nicht lebensfähig sind [36].

Mit gegenwärtigen Methoden der reversen Genetik bei Malaria-Parasiten ist der bestmögliche Beweis für Essentialität eines Gens der Einsatz eines integrierenden aber nicht Gen-inaktivierenden Vektors, und das im parallelen Vergleich mit einem Gen-inaktivierenden Plasmid. Klassische Beispiele dafür sind Gene, welche für die Merozoiten-Invasion der Erythrozyten benötigt werden (siehe [42] als Übersichtsartikel).

Hier wurde diese generelle Strategie durch Anwendung eines systematischen Ansatzes wesentlich erweitert; dies geschah unter Nutzung (i) von verschiedenen Parasiten-Spezies

und -Stämmen, (ii) von zwei Transfektionsprotokollen, (iii) einer Serie von Transfektionsvektoren mit (iv) Regionen unterschiedlicher Sequenzidentität als Determinanten für die Positionen der homologen Rekombination.

Unter allen getesteten Bedingungen wurde keine Glutathion-defiziente Parasiten-Population detektiert. Um zu beweisen, dass der Glutathionreduktase Gen-Locus prinzipiell für *gene targeting* erreichbar ist, wurde ein Transfektionsvektor eingesetzt, der über ein einzelnes homologes Rekombinationereignis zu einer funktionellen Glutathionreduktase-Kopie führt. Um den direkten Beweis für die Rolle der Glutathionreduktase bei der Etablierung einer Blutstadien-Infektion zu liefern, konnte erfolgreich eine Mutante mit zurück gewonnener Funktion generiert werden; dies erfolgte durch Spezies-übergreifende Komplementation des *P. berghei* Glutathionreduktase-Gens mit dem entsprechenden *P. falciparum* Ortholog.

Diese verschiedenen Linien der Beweisführung zeigen eine essentielle und zentrale Rolle der Glutathionreduktase im Redoxstoffwechsel von *Plasmodium* auf.

Dieses grundlegende Ergebnis führte zu der Frage nach funktioneller Redundanz mit dem zweiten Arm der antioxidativen Abwehr, welcher durch die Thioredoxinreduktase repräsentiert ist.

In einer Studie von Silke Müller und Mitarbeitern ließen sich keine Thioredoxinreduktase-defizienten Parasiten erzeugen; dieser Ansatz verwendet kultivierte Erythrozyten, die mit einem *P. falciparum* Laborstamm infiziert wurden [104]. Um die *in vivo*-Funktion der Thioredoxinreduktase in der physiologischen Umgebung der Plasmodien untersuchen zu können, wurde versucht, das *P. berghei* Ortholog mit einer vergleichbaren Strategie zu inaktivieren.

Im Gegensatz zu der vorherigen Studie konnten Thioredoxinreduktase-defiziente Parasiten erfolgreich generiert werden. Eine systematische phänotypische Analyse zeigte an keiner Stelle des *Plasmodium*-Lebenszyklus eine essentiell lebenswichtige Funktion der Thioredoxinreduktase. Mögliche Erklärungen für die Diskrepanz der hier berichteten Ergebnisse und der früherer Studien sind (i) technische Limitierungen des *P. falciparum* Transfektionssystems, (ii) eine besondere Bedeutung von *P. falciparum* Thioredoxinreduktase unter *in vitro*-Kulturbedingungen, welche nur partiell das physiologische Umfeld widerspiegeln, gekoppelt mit dem vollständigen Fehlen von Rückkopplungsmechanismen des Wirts oder (iii) qualitativ oder quantitativ verschiedene Funktionen der Thioredoxinreduktase bei Nagetier- und Menschenmalaria-Parasiten. Die letztgenannte

Möglichkeit erscheint mir zwar unwahrscheinlich, aber gerade aus der Perspektive der antioxidativen Netzwerke vorstellbar. Die Modifikation im Substratspektrum bei einem oder mehreren Glutaredoxinen könnte genügen, um die Thioredoxinreduktase bei *P. berghei* entbehrlich zu machen, da ihre Funktion auch von der Achse Glutathionreduktase → GSH → Glutaredoxin → Thioredoxin erfüllt würde. Interessant wäre es, experimentell zu prüfen, welche Mutationen in den Netzwerk-Komponenten notwendig wären, um auch bei *P. falciparum* die Thioredoxinreduktase-Aktivität entbehrlich zu machen

Insgesamt verdeutlicht das Fehlen eines praktikablen *in vivo*-Modells für die humanrelevanten Parasiten die wichtige Bedeutung funktioneller Studien in Nagetiermalaria-Modellen. Dies ist von besonderer Dringlichkeit in der präklinischen Entwicklung neuer Medikamente gegen Malaria.

Die *Plasmodium* Glutathionreduktase ist der führende Kandidat als *drug target* der rationalen Wirkstoffentwicklung, da (i) vollständige, strukturelle Informationen für die Modellierung von Inhibitoren erhältlich sind [171], (ii) detaillierte biochemische und enzym-kinetische Daten den Rahmen für Hochdurchsatz-*screening*-Verfahren von Hemmstoffen liefern [98] und (iii) verschiedene Inhibitoren mit Wirkung gegen Malaria synthetisiert werden konnten, welche vermutlich durch Ausübung eines hemmenden Effekts auf die Glutathionreduktase wirken [45, 57, 63].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der genetische Beweis erbracht werden, dass das Fehlen der Glutathionreduktase-Aktivität *in vivo* nichtlebensfähige Parasiten zur Folge hat. Dieses Ergebnis zeigt, dass es möglich ist, eine revers-genetische Strategie zur *in vivo* Validierung potentiell viel versprechender *drug targets* zu entwickeln. Ähnliche Strategien können für eine systematische Untersuchung aller zurzeit bekannten und viel versprechenden potentiellen *drug targets* [109] eingesetzt werden.

4.4 Molekulare Interaktionen von Methylenblau mit humanen und *Plasmodium* Disulfidreduktasen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zum Einfluss von Methylenblau auf *Plasmodium* und humane Disulfidreduktasen zeigen, dass Methylenblau neben seinen inhibierenden Eigenschaften interessante Charakteristika als subversives Substrat besitzt. Der Ausdruck subversives Substrat oder Sabotage-Inhibitor ist aus einer pharmakologischen Perspektive definiert und besagt, dass eine solche Verbindung die physiologische Funktion eines Enzyms in das genaue Gegenteil verkehrt [25, 101].

Die untersuchten antioxidativen Disulfidreduktasen sind Thiol-produzierende Enzyme, welche das intrazelluläre reduzierende Milieu erhalten. Bei Anwesenheit von Methyleneblau werden diese Enzyme zu pro-oxidativen, H_2O_2 -produzierenden Verbindungen, welche die reduzierenden zellulären Bedingungen herausfordern, statt sie zu bewahren [19, 101, 173]. Wie in Abb. 3.14 gezeigt, entsprechen die pharmakologischen Mechanismen von Methyleneblau denen eines Redoxpendlers. In jedem der ablaufenden Zyklen wird Methyleneblau unter Nutzung von NADPH reduziert. Das resultierende LeukoMB wird rasch durch spontan ablaufende Autooxidation umgewandelt; dabei entstehen die Produkte Methyleneblau und H_2O_2 . Bilanzmäßig führt jeder katalytische Zyklus zum Verlust von NADPH und zellulärem O_2 , wobei die reaktive Sauerstoffspezies H_2O_2 generiert wird. Es werden also NADPH und Sauerstoff in diesem pathologischen Reaktionszyklus verbraucht, wichtige Komponenten, welche für den Metabolismus der Parasiten benötigt werden. Des Weiteren ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das Verhältnis von NADPH zu NADP^+ betroffen. Glutathiondisulfid, das physiologische Substrat der Glutathionreduktase, wird weniger schnell reduziert, was toxische Effekte des akkumulierenden Glutathiondisulfids zur Folge haben kann. Außerdem steht weniger reduziertes Glutathion für die Glutathion S-Transferase zur Detoxifizierung von Häm und anderen lipophilen Verbindungen zur Verfügung [16].

Diese Befunde können auf *in vivo* Verhältnisse extrapoliert werden. Hierbei wird für das Zytosol von *P. falciparum* eine Glutathionreduktase-Aktivität von 3-10 U/ml unter V_{\max} -Bedingungen angenommen [2, 99], der V_{\max} -Wert für Methyleneblau ist etwa 50fach niedriger als für Glutathiondisulfid. Mit einer Methyleneblau-Konzentration von 30 μM und einem K_M -Wert von 50 μM für Methyleneblau (siehe Tab. 3.4), beträgt die Umsatzrate geschätzte 40 mU/ml oder 40 $\mu\text{M}/\text{min}$ bei 25°C bzw. 100 $\mu\text{M}/\text{min}$ bei 40°C, der Temperatur einer Malaria-Attacke. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die Konzentration des physiologischen Substrates Glutathion in der Disulfid-Form wahrscheinlich sehr gering ist, da ein hohes Dithiol- zu Disulfid-Verhältnis durch die zellulären Disulfidreduktasen aufrechterhalten wird. Nimmt man eine *in situ* Konzentration von 0,5 μM für die *P. falciparum* Thioredoxinreduktase an, wäre dieses Enzym für die Umsetzung von Methyleneblau genauso wichtig wie die *P. falciparum* Glutathionreduktase.

Im Gegensatz dazu besitzt die humane Glutathionreduktase einen k_{cat} -Wert von 0,03 s^{-1} , was bedeutet, dass unter Methyleneblau-Behandlung weniger als 0,5% des Glukose-Verbrauchs von nichtinfizierten und parasitierten Erythrozyten für den Methyleneblau-betriebenen Redox-

Zyklus verwendet werden kann. Für die humane Thioredoxinreduktase ist festzuhalten, dass diese nicht in Erythrozyten vorkommt [76, 113].

Ein weiterer Effekt unterstützt die Nutzung von Methylenblau als selektivem Hemmstoff gegen Malaria-Parasiten. Werden parasitierte und normale Erythrozyten in Methylenblau-haltigen Lösungen inkubiert, wird diese Verbindung selektiv in den parasitierten Erythrozyten angereichert [2]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht geklärt, könnte jedoch auf einer Bindung von Methylenblau an Strukturen des Parasiten begründet sein. Eine weitere Hypothese ist, dass Methylenblau zu ungeladenem LeukoMB reduziert wird, welches leicht durch die Membran der parasitären Verdauungs-Vakuole gelangt, dort zum Kation Methylenblau autooxidiert und somit in der Nahrungs-Vakuole eingeschlossen bleibt. Hierbei sollte betont werden, dass es sich bei Methylenblau um einen Redox-Mechanismus, nicht um einen schwachen Basen-Effekt handelt, der zur Anreicherung im Parasiten führt.

Bemerkenswert ist, dass Methylenblau bereits 1891 von Paul Ehrlich und Paul Guttman gegen Malaria eingesetzt wurde [77]; somit war Methylenblau das erste therapeutisch verwendete synthetische Präparat überhaupt. Wieder entdeckt wurde diese Verbindung mit Feststellung ihrer Wirkung auf die Glutathionreduktase der Malaria-Parasiten [57]. Die in dieser Arbeit vorgestellten molekularen Effekte von Methylenblau liefern einen Beitrag zur Erklärung der Wirk-Mechanismen dieses Medikaments auf zellulärer Ebene. Weitere Wirkungen von Methylenblau sind bereits bekannt und umfassen die nichtkompetitive Inhibition der *P. falciparum*, nicht aber der humanen Glutathionreduktase bei therapeutisch genutzten Konzentrationen [57, 171] und die Interferenz mit Methämoglobin und β -Hämatin, zwei nicht Genom-kontrollierten Angriffspunkten [11, 175, 198].

Diese pleiotropen Wirkungen von Methylenblau sind einer der Gründe, die diese Verbindung für eine Therapie der Malaria interessant machen, da eine Resistenzentwicklung der Parasiten unter diesen Voraussetzungen unwahrscheinlich ist. Ein weiterer Grund ist, dass Methylenblau alle „BONARIA“-Kriterien erfüllt (siehe Kapitel 1.3), eine wichtige Bedingung bei der Entwicklung von Medikamenten gegen Krankheiten der Armut. Vor allem der Umstand, dass Methylenblau ein zugelassenes Arzneimittel mit langjährigem klinischen Einsatz (vor allem als Antidot gegen Methämoglobin-induzierende toxische Verbindungen, [28, 175]) ist, kann helfen, die extremen Kosten einer Arzneimittelentwicklung zu senken. Dies ist wichtig, da diese Kosten häufig das größte Hindernis darstellen, wenn neue

Medikamenten-Programme gegen Infektionskrankheiten der Armen in Erwägung gezogen werden. Da Resistenzentwicklungen bei den Parasiten schneller voranschreiten als die Erforschung neuer Medikamente, sind neue Ansätze zur Behandlung parasitärer Erkrankungen zwingend notwendig. Um der Entwicklung von Arzneimittel-Resistenzen entgegenzuwirken, ist die generelle Empfehlung, eher nach Medikamenten-Kombinationen als Einzelsubstanzen zu suchen. In diesem Sinne wurden synergistische Effekte von Methylenblau in Kombination mit Artemisinin-Derivaten bei Tests an *P. falciparum* Kulturen aufgezeigt [2]. Zusätzlich wurde eine Kombination aus Methylenblau und Chloroquin (BlueCQ) *in vitro* und in klinischen Studien in Burkina Faso getestet [125, 128]. Wegen der fortgeschrittenen Ausbreitung von Chloroquin-resistenten Stämmen in Westafrika ist Chloroquin kein geeigneter Partner mehr für eine Kombinations-Therapie.

Als Konsequenz werden andere Methylenblau-enthaltende Antimalaria-Kombinationen in klinischen Studien getestet; Methylenblau-Amodiaquin (BlueAQ) ließ sich bereits als sichere und effektive Therapie der Malaria etablieren [217].

5 Zusammenfassung

Die Malaria-assoziierte Pathologie wird durch die Entwicklung von Plasmodien in den Erythrozyten ihres Wirtes verursacht. Um ein reduzierendes intrazelluläres Milieu in diesem Sauerstoff-reichen Umfeld zu erhalten, haben Malaria-Parasiten ein komplexes antioxidatives Netzwerk entwickelt, welches auf zwei zentralen Elektronen-Donatoren beruht, dem Glutathion und dem Thioredoxin. Die intrazellulären Spiegel dieser beiden redox-aktiven Peptide in reduzierter – und damit reduzierender Form – werden durch die entsprechenden NADPH-abhängigen Flavoenzyme Thioredoxinreduktase (TrxR) und Glutathionreduktase (GR) aufrechterhalten. Da Katalase und eine klassische Selen-abhängige Glutathionperoxidase in *Plasmodium* fehlen, spielen die auf den Enzymen Thioredoxin- und Glutathionreduktase basierenden Systeme eine besondere Rolle. Weitere Bestandteile der antioxidativen Abwehr sind verschiedene Mitglieder der Thioredoxin-Familie, vor allem das Plasmodien-spezifische Plasmoredoxin (Plrx), welches als zusätzliche Verteidigungslinie der Parasiten gegen oxidativen Stress diskutiert wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden antioxidative Proteine der Parasiten untersucht, die als Zielmoleküle für die rationale Medikamentenentwicklung von Bedeutung sind. Um zu klären, welche der beteiligten Proteine sich aufgrund einer essentiellen Funktion in den Blutstadien-Parasiten insbesondere dafür eignen, wurden die zugrunde liegenden Gene dreier Redox-Proteine mit Methoden der reversen Genetik untersucht. Dies geschah durch stabile Gen-Inaktivierung unter Nutzung von Integrations- und *replacement*-Strategien, im Falle der Glutathionreduktase ergänzt durch Gen-Komplementation mit dem entsprechenden Ortholog. Die Targetvalidierung individueller redox-aktiver Proteine ist eine unerlässliche Voraussetzung für die rationale Entwicklung neuer effektiver Antimalaria-Medikamente.

Die erfolgreiche Herstellung von Plasmoredoxin *knock out*-Mutanten in Nagetiermalaria-Modellparasiten und die phänotypischen Analysen im Verlauf des Lebenszyklus offenbarten *in vitro* und *in vivo* keine essentiellen Funktionen dieses Proteins. Dieses Ergebnis kann mit funktioneller Redundanz innerhalb der Mitglieder der Thioredoxin-Familie erklärt werden, somit bietet sich eine weitere Arzneimittelentwicklung allein auf der Basis Plasmoredoxin-spezifischer Inhibitoren nicht an.

Weiterhin konnten Thioredoxinreduktase-defiziente *P. berghei*-Mutanten erzeugt werden. Eine systematische Analyse dieser Parasiten im Verlauf des *Plasmodium*-Lebenszyklus zeigte an keiner Stelle eine lebensnotwendige Funktion der Thioredoxinreduktase. Dies steht

im Gegensatz zu früheren *in vitro*-Studien bei *P. falciparum*, welche diesem Enzym eine essentielle Funktion zuschrieben. Da ein praktikables *in vivo*-Modell für humanpathogene Malaria-Parasiten nicht verfügbar ist, verdeutlicht das hier vorgestellte Ergebnis der Targetvalidierung für Thioredoxinreduktase die Bedeutung funktioneller Studien in Nagetiermalaria-Modellen für die präklinische Entwicklung neuer Medikamente gegen Malaria.

Für eines der viel versprechendsten *drug targets* von Malaria-Parasiten, der Glutathionreduktase, konnte auf genetischer Ebene der Beweis erbracht werden, dass durch den Verlust der Funktion dieses Enzyms die Parasiten nicht lebensfähig sind. Somit nimmt die Glutathionreduktase in dem komplexen antioxidativen Netzwerk von *Plasmodium* eine zentrale und essentielle Rolle ein.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die molekulare Wirkungsweise des seit mehr als 100 Jahren klinisch genutzten Medikaments Methylenblau auf Malaria-Parasiten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese Verbindung neben ihren inhibierenden Eigenschaften interessante Charakteristika als subversives Substrat verschiedener Disulfidreduktasen besitzt. Bei Anwesenheit von Methylenblau werden diese Enzyme zu pro-oxidativen, H₂O₂-produzierenden Verbindungen, welche die reduzierenden zellulären Bedingungen herausfordern, statt sie zu bewahren.

6 Summary

Malaria-associated pathology is caused by the continuous expansion of *Plasmodium* parasites inside host erythrocytes. To maintain a reducing intracellular milieu in this oxygen-rich environment, malaria parasites have evolved a complex antioxidative network based on two central electron donors, glutathione and thioredoxin. The intracellular levels of these redox-active peptides in reduced and thus reducing forms are maintained by the respective NADPH-dependent flavoenzymes thioredoxin reductase (TrxR) and glutathione reductase (GR). As catalase and classical selenium-dependant glutathione peroxidase are absent in *Plasmodium*, the systems based on thioredoxin reductase and glutathione reductase play a prominent role. Further components of the antioxidative defense comprise different members of the thioredoxin family, especially *Plasmodium*-specific plasmoredoxin which has been discussed as an additional defense line against oxidative stress.

In the framework of this thesis, antioxidative parasite proteins that are of interest as targets for rational drug development were investigated. To clarify which proteins are particularly suitable as drug target due to an essential function for blood stage parasites, the respective genes of three redox proteins were studied employing reverse genetics. This was achieved by stable gene inactivation with integration and replacement strategies, in the case of glutathione reductase supplemented by gene complementation of the respective ortholog. Target validation of individual redox-active proteins is an indispensable prerequisite for the rational development of new and effective antimalarial drugs.

The successful generation of plasmoredoxin knockout mutants in the rodent model malaria parasite and phenotypic analysis during life cycle progression revealed both *in vitro* and *in vivo* a non-vital function of this protein. This finding can be explained by functional redundancy among the members of the thioredoxin family and discourages future drug discovery efforts that aim at specifically targeting plasmoredoxin.

Furthermore *P. berghei* thioredoxin reductase-deficient parasites could be generated in this thesis. A systematic phenotypic analysis of this mutant throughout the *Plasmodium* life cycle demonstrated no essential function for thioredoxin reductase at any phase of the parasite life cycle. This is in contrast to previous *in vitro* studies which attributed an essential role to thioredoxin reductase in *P. falciparum*. As a feasible *in vivo* model for human pathogen malaria parasites is not available, the presented target validation result of thioredoxin

reductase highlights the importance of functional studies in rodent malaria models to guide preclinical development of novel antimalaria intervention strategies.

For one of the most promising drug targets of malaria parasites, glutathione reductase, this work provides the genetic proof that in the case of this enzyme loss of function results in non-viable malaria parasites *in vivo*. Hence, glutathione reductase occupies an essential position in the complex antioxidant network of *Plasmodium* parasites.

Furthermore, the molecular mode of action of methylene blue, which has been clinically used as an antimalarial drug for over 100 years, against malaria parasites has been investigated. It could be shown that this compound – besides its inhibitory potential – has interesting characteristics as a subversive substrate of different disulfide reductases. In the presence of methylene blue, they turn into pro-oxidant, H₂O₂-producing enzymes which challenge the reducing cellular milieu that they are meant to protect in the absence of this perturbing drug.

7 Literaturverzeichnis

1. **Afonso, A., Hunt, P., Cheesman, S., Alves, A.C., Cunha, C.V., do Rosario, V., and Cravo, P.** 2006. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(2): 480-9.
2. **Akoachere, M., Buchholz, K., Fischer, E., Burhenne, J., Haefeli, W.E., Schirmer, R.H., and Becker, K.** 2005. In vitro assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinins. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(11): 4592-7.
3. **Akompong, T., Ghorri, N., and Haldar, K.** 2000. In vitro activity of riboflavin against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(1): 88-96.
4. **Alonso, P.L., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M., Bassat, Q., Aide, P., Ofori-Anyinam, O., Navia, M.M., Corachan, S., Ceuppens, M., Dubois, M.C., Demoitie, M.A., Dubovsky, F., Menendez, C., Tornieporth, N., Ballou, W.R., Thompson, R., and Cohen, J.** 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet.* **364**(9443): 1411-20.
5. **Alonso, P.L., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Macete, E., Aide, P., Sigauque, B., Milman, J., Mandomando, I., Bassat, Q., Guinovart, C., Espasa, M., Corachan, S., Lievens, M., Navia, M.M., Dubois, M.C., Menendez, C., Dubovsky, F., Cohen, J., Thompson, R., and Ballou, W.R.** 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet.* **366**(9502): 2012-8.
6. **Andrews, K.T. and Lanzer, M.** 2002. Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res.* **88**(8): 715-23.
7. **Andricopulo, A.D., Akoachere, M.B., Krogh, R., Nickel, C., McLeish, M.J., Kenyon, G.L., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Davioud-Charvet, E., and Becker, K.** 2006. Specific inhibitors of *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase as potential antimalarial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* **16**(8): 2283-92.
8. **Aravind, L., Iyer, L.M., Wellem, T.E., and Miller, L.H.** 2003. *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell.* **115**(7): 771-85.
9. **Atamna, H. and Ginsburg, H.** 1993. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **61**(2): 231-41.
10. **Atamna, H., Pascarmona, G., and Ginsburg, H.** 1994. Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites. *Mol Biochem Parasitol.* **67**(1): 79-89.
11. **Atamna, H., Krugliak, M., Shalmiev, G., Deharo, E., Pescarmona, G., and Ginsburg, H.** 1996. Mode of antimalarial effect of methylene blue and some of its analogues on *Plasmodium falciparum* in culture and their inhibition of *P. vinckei petteri* and *P. yoelii nigeriensis* in vivo. *Biochem Pharmacol.* **51**(5): 693-700.
12. **Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F., and Howard, R.J.** 1995. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell.* **82**(1): 77-87.
13. **Bauer, H., Gromer, S., Urbani, A., Schnolzer, M., Schirmer, R.H., and Muller, H.M.** 2003. Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Eur J Biochem.* **270**(21): 4272-81.
14. **Becker, K., Savvides, S.N., Keese, M., Schirmer, R.H., and Karplus, P.A.** 1998. Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nat Struct Biol.* **5**(4): 267-71.
15. **Becker, K., Kanzok, S.M., Iozef, R., Fischer, M., Schirmer, R.H., and Rahlfs, S.** 2003. Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites. *Eur J Biochem.* **270**(6): 1057-64.
16. **Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C., and Schirmer, R.H.** 2003. Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem.* **384**(4): 551-66.

17. **Becker, K. and Kirk, K.** 2004. Of malaria, metabolism and membrane transport. *Trends Parasitol.* **20**(12): 590-6.
18. **Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S., and Ginsburg, H.** 2004. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* **34**(2): 163-89.
19. **Becker K., K.S., Hunt N.H.** Oxidative stress and antioxidant defense in malarial parasites. *Molecular Approaches to Malaria*, ed. I. Sherman. 2005, Washington D.C.: ASM Press: 365-383.
20. **Beeson, J.G., Amin, N., Kanjala, M., and Rogerson, S.J.** 2002. Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Infect Immun.* **70**(10): 5412-5.
21. **Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A.E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R.E., and Morris, H.R.** 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* **392**(6673): 289-92.
22. **Biot, C., Dessolin, J., Grellier, P., and Davioud-Charvet, E.** 2003. Double-drug development against antioxidant enzymes from *Plasmodium falciparum*. *Redox Rep.* **8**(5): 280-3.
23. **Biot, C., Bauer, H., Schirmer, R.H., and Davioud-Charvet, E.** 2004. 5-substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials. *J Med Chem.* **47**(24): 5972-83.
24. **Blackman, M.J.** 2003. RNAi in protozoan parasites: what hope for the Apicomplexa? *Protist.* **154**(2): 177-80.
25. **Blumenstiel, K., Schoneck, R., Yardley, V., Croft, S.L., and Krauth-Siegel, R.L.** 1999. Nitrofurantol drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem Pharmacol.* **58**(11): 1791-9.
26. **Boucher, I.W., McMillan, P.J., Gabrielsen, M., Akerman, S.E., Brannigan, J.A., Schnick, C., Brzozowski, A.M., Wilkinson, A.J., and Muller, S.** 2006. Structural and biochemical characterization of a mitochondrial peroxiredoxin from *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* **61**(4): 948-59.
27. **Boyd, C.S. and Cadenas, E.** 2002. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol Chem.* **383**(3-4): 411-23.
28. **Bradberry, S.M.** 2003. Occupational methaemoglobinaemia. Mechanisms of production, features, diagnosis and management including the use of methylene blue. *Toxicol Rev.* **22**(1): 13-27.
29. **Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-54.
30. **Buchholz, K., Schirmer, R.H., Eubel, J.K., Akoachere, M.B., Dandekar, T., Becker, K., and Gromer, S.** 2008. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**(1): 183-91.
31. **Buchholz K., M.B., Schirmer R.H., Becker K.** Structure-based drug development against malaria. *Frontiers in Drug Design & Discovery.* **3**. 2007: Bentham Science Publishers: 225-255.
32. **Budde, H. and Flohe, L.** 2003. Enzymes of the thiol-dependent hydroperoxide metabolism in pathogens as potential drug targets. *Biofactors.* **17**(1-4): 83-92.
33. **Butler, D.** 2004. Global fund changes tack on malaria therapy. *Nature.* **429**(6992): 588.
34. **Carmel-Harel, O. and Storz, G.** 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol.* **54**: 439-61.
35. **Carter R., D.C.L.** *Parasitic Protozoa.* **3**. 1977, New York: Academic Press: 354-465.
36. **Carvalho, T.G. and Menard, R.** 2005. Manipulating the *Plasmodium* genome. *Curr Issues Mol Biol.* **7**(1): 39-55.
37. **Chae, H.Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G.** 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem.* **269**(44): 27670-8.
38. **Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K.** 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem.* **252**(3): 1102-6.
39. **Coleman, M.D. and Coleman, N.A.** 1996. Drug-induced methaemoglobinaemia. Treatment issues. *Drug Saf.* **14**(6): 394-405.

40. **Collinson, E.J., Wheeler, G.L., Garrido, E.O., Avery, A.M., Avery, S.V., and Grant, C.M.** 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem.* **277**(19): 16712-7.
41. **Compton, S.J. and Jones, C.G.** 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* **151**(2): 369-74.
42. **Cowman, A.F., Baldi, D.L., Healer, J., Mills, K.E., O'Donnell, R.A., Reed, M.B., Triglia, T., Wickham, M.E., and Crabb, B.S.** 2000. Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Lett.* **476**(1-2): 84-8.
43. **Craig, A. and Scherf, A.** 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* **115**(2): 129-43.
44. **Cunningham, E., Drag, M., Kafarski, P., and Bell, A.** 2008. Chemical target validation studies of aminopeptidase in malaria using alpha-aminoalkylphosphonate and phosphonopeptide inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.*
45. **Davioud-Charvet, E., Delarue, S., Biot, C., Schwobel, B., Boehme, C.C., Mussigbrodt, A., Maes, L., Sergheraert, C., Grellier, P., Schirmer, R.H., and Becker, K.** 2001. A prodrug form of a *Plasmodium falciparum* glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. *J Med Chem.* **44**(24): 4268-76.
46. **de Koning-Ward, T.F., Fidock, D.A., Thathy, V., Menard, R., van Spaendonk, R.M., Waters, A.P., and Janse, C.J.** 2000. The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Mol Biochem Parasitol.* **106**(2): 199-212.
47. **Ding, M., Kwok, L.Y., Schluter, D., Clayton, C., and Soldati, D.** 2004. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Mol Microbiol.* **51**(1): 47-61.
48. **Draculic, T., Dawes, I.W., and Grant, C.M.** 2000. A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **36**(5): 1167-74.
49. **Dubois, V.L., Platel, D.F., Pauly, G., and Tribouley-Duret, J.** 1995. *Plasmodium berghei*: implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance in vivo. *Exp Parasitol.* **81**(1): 117-24.
50. **Dyer, M. and Day, K.** 2000. Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. *Mol Biochem Parasitol.* **110**(2): 437-48.
51. **Eckman, J.R., Modler, S., Eaton, J.W., Berger, E., and Engel, R.R.** 1977. Host heme catabolism in drug-sensitive and drug-resistant malaria. *J Lab Clin Med.* **90**(4): 767-70.
52. **Eckman, J.R. and Eaton, J.W.** 1979. Dependence of plasmodial glutathione metabolism on the host cell. *Nature.* **278**(5706): 754-6.
53. **Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., and Krishna, S.** 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature.* **424**(6951): 957-61.
54. **Egan, T.J., Combrinck, J.M., Egan, J., Hearne, G.R., Marques, H.M., Ntenti, S., Sewell, B.T., Smith, P.J., Taylor, D., van Schalkwyk, D.A., and Walden, J.C.** 2002. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* **365**(Pt 2): 343-7.
55. **Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T., and Cerami, A.** 1985. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science.* **227**(4693): 1485-7.
56. **Fairlamb, A.H. and Cerami, A.** 1985. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* **14**(2): 187-98.
57. **Farber, P.M., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Becker, K., and Schirmer, R.H.** 1998. Recombinant *Plasmodium falciparum* glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Lett.* **422**(3): 311-4.
58. **Flohe, L., Jaeger, T., Pilawa, S., and Sztajer, H.** 2003. Thiol-dependent peroxidases care little about homology-based assignments of function. *Redox Rep.* **8**(5): 256-64.
59. **Fontanet, A.L., Johnston, D.B., Walker, A.M., Rooney, W., Thimasarn, K., Sturchler, D., Macdonald, M., Hours, M., and Wirth, D.F.** 1993. High prevalence of mefloquine-resistant *falciparum* malaria in eastern Thailand. *Bull World Health Organ.* **71**(3-4): 377-83.

60. **Francis, S.E., Sullivan, D.J., Jr., and Goldberg, D.E.** 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* **51**: 97-123.
61. **Frevert, U., Sinnis, P., Esko, J.D., and Nussenzweig, V.** 1996. Cell surface glycosaminoglycans are not obligatory for *Plasmodium berghei* sporozoite invasion in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* **76**(1-2): 257-66.
62. **Frevert, U.** 2004. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol.* **20**(9): 417-24.
63. **Friebolin, W., Jannack, B., Wenzel, N., Furrer, J., Oeser, T., Sanchez, C.P., Lanzer, M., Yardley, V., Becker, K., and Davioud-Charvet, E.** 2008. Antimalarial dual drugs based on potent inhibitors of glutathione reductase from *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem.* **51**(5): 1260-77.
64. **Gabay, T. and Ginsburg, H.** 1993. Hemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate--a possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. *Exp Parasitol.* **77**(3): 261-72.
65. **Gallup, J.L. and Sachs, J.D.** 2001. The economic burden of malaria. *Am J Trop Med Hyg.* **64**(1-2 Suppl): 85-96.
66. **Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Perlea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., and Barrell, B.** 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* **419**(6906): 498-511.
67. **Ghezzi, P. and Bonetto, V.** 2003. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics.* **3**(7): 1145-53.
68. **Gilbert, H.F.** 1984. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol.* **107**: 330-51.
69. **Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J., and Krugliak, M.** 1998. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem Pharmacol.* **56**(10): 1305-13.
70. **Giribaldi, G., Ulliers, D., Mannu, F., Arese, P., and Turrini, F.** 2001. Growth of *Plasmodium falciparum* induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. *Br J Haematol.* **113**(2): 492-9.
71. **Goldberg, D.E. and Slater, A.F.** 1992. The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitol Today.* **8**(8): 280-3.
72. **Goldberg, D.E.** 2002. Parasitology. When the host is smarter than the parasite. *Science.* **296**(5567): 482-3.
73. **Goonewardene, R., Daily, J., Kaslow, D., Sullivan, T.J., Duffy, P., Carter, R., Mendis, K., and Wirth, D.** 1993. Transfection of the malaria parasite and expression of firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(11): 5234-6.
74. **Greve, B., Lehman, L.G., Lell, B., Luckner, D., Schmidt-Ott, R., and Kremsner, P.G.** 1999. High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* **179**(6): 1584-6.
75. **Gromer, S., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Schirmer, R.H., and Becker, K.** 1998. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem.* **273**(32): 20096-101.
76. **Gromer, S., Urig, S., and Becker, K.** 2004. The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev.* **24**(1): 40-89.
77. **Guttmann P., E.P.** 1891. Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berl. Klin. Wochenschr.* **28**(953-956).
78. **Guyatt, H.L., Corlett, S.K., Robinson, T.P., Ochola, S.A., and Snow, R.W.** 2002. Malaria prevention in highland Kenya: indoor residual house-spraying vs. insecticide-treated bednets. *Trop Med Int Health.* **7**(4): 298-303.
79. **Haldane, J.B.S.** Proceedings of the 8th International Congress of Genetics. 1949: 267-272.

80. **Hoffman, S.L., Subramanian, G.M., Collins, F.H., and Venter, J.C.** 2002. Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria. *Nature*. **415**(6872): 702-9.
81. **Holmgren, A.** 1977. The function of thioredoxin and glutathione in deoxyribonucleic acid synthesis. *Biochem Soc Trans*. **5**(3): 611-2.
82. **Holmgren, A.** 1985. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*. **54**: 237-71.
83. **Hume, J.C., Lyons, E.J., and Day, K.P.** 2003. Human migration, mosquitoes and the evolution of Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol*. **19**(3): 144-9.
84. **Hunt, N.H. and Stocker, R.** 1990. Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells*. **16**(2-3): 499-526; discussion 527-30.
85. **Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., and Utsumi, K.** 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*. **10**(23): 2495-505.
86. **Irmiler A., B.A., Davioud-Charvet E., Hofmann V., Réau R, Gromer S., Schirmer R.H., Becker K.** Flavins and Flavoproteins, ed. W.d. Gruyter. **14**. 2002, Berlin, New York: 803-815.
87. **Jaeger, T. and Flohe, L.** 2006. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors*. **27**(1-4): 109-20.
88. **Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M.T., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T., and Mercereau-Pujalon, O.** 2005. Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*. **366**(9501): 1960-3.
89. **Janse, C.J., Waters, A.P., Kos, J., and Lugt, C.B.** 1994. Comparison of in vivo and in vitro antimalarial activity of artemisinin, dihydroartemisinin and sodium artesunate in the Plasmodium berghei-rodent model. *Int J Parasitol*. **24**(4): 589-94.
90. **Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., and Waters, A.P.** 2006. High efficiency transfection of Plasmodium berghei facilitates novel selection procedures. *Mol Biochem Parasitol*. **145**(1): 60-70.
91. **Janse, C.J., Ramesar, J., and Waters, A.P.** 2006. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. *Nat Protoc*. **1**(1): 346-56.
92. **Jongco, A.M., Ting, L.M., Thathy, V., Mota, M.M., and Kim, K.** 2006. Improved transfection and new selectable markers for the rodent malaria parasite Plasmodium yoelii. *Mol Biochem Parasitol*. **146**(2): 242-50.
93. **K. Becker, S.K., N.H. Hunt.** Oxidative stress and antioxidant defense in malarial parasites. *Molecular Approaches to Malaria*, ed. I. Sherman. 2005, Washington D.C.: ASM Press: 365-383.
94. **Kang, S.W., Baines, I.C., and Rhee, S.G.** 1998. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem*. **273**(11): 6303-11.
95. **Kanzok, S.M., Schirmer, R.H., Turbachova, I., Iozef, R., and Becker, K.** 2000. The thioredoxin system of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Glutathione reduction revisited. *J Biol Chem*. **275**(51): 40180-6.
96. **Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Muller, H.M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R., and Becker, K.** 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in Drosophila melanogaster. *Science*. **291**(5504): 643-6.
97. **Kocken, C.H., van der Wel, A.M., Dubbeld, M.A., Narum, D.L., van de Rijke, F.M., van Gemert, G.J., van der Linde, X., Bannister, L.H., Janse, C., Waters, A.P., and Thomas, A.W.** 1998. Precise timing of expression of a Plasmodium falciparum-derived transgene in Plasmodium berghei is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem*. **273**(24): 15119-24.
98. **Krauth-Siegel, R.L., Muller, J.G., Lottspeich, F., and Schirmer, R.H.** 1996. Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of Plasmodium falciparum, the causative agent of tropical malaria. *Eur J Biochem*. **235**(1-2): 345-50.
99. **Krauth-Siegel, R.L., Arscott, L.D., Schonleben-Janias, A., Schirmer, R.H., and Williams, C.H., Jr.** 1998. Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry*. **37**(40): 13968-77.
100. **Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K., and Schmidt, H.** 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biol Chem*. **384**(4): 539-49.

101. **Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H., and Schirmer, R.H.** 2005. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew Chem Int Ed Engl.* **44**(5): 690-715.
102. **Kretschmer H., B.U., Klauss V.** Malaria. Knobloch J. (ed.) Tropen- und Reisemedizin. 1996, Jena, Stuttgart, Lücke, Ulm: Gustav Fischer Verlag.
103. **Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M.R., Fairlamb, A.H., Krauth-Siegel, R.L., and Clayton, C.** 2000. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol.* **35**(3): 542-52.
104. **Krnajski, Z., Gilberger, T.W., Walter, R.D., Cowman, A.F., and Muller, S.** 2002. Thioredoxin reductase is essential for the survival of Plasmodium falciparum erythrocytic stages. *J Biol Chem.* **277**(29): 25970-5.
105. **Krogstad, D.J., Schlesinger, P.H., and Gluzman, I.Y.** 1985. Antimalarials increase vesicle pH in Plasmodium falciparum. *J Cell Biol.* **101**(6): 2302-9.
106. **Krohne-Ehrich, G., Schirmer, R.H., and Untucht-Grau, R.** 1977. Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptide. *Eur J Biochem.* **80**(1): 65-71.
107. **Kwiatkowski, D. and Greenwood, B.M.** 1989. Why is malaria fever periodic? A hypothesis. *Parasitol Today.* **5**(8): 264-6.
108. **Lambeth, J.D.** 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* **4**(3): 181-9.
109. **Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J., and Winzeler, E.A.** 2003. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science.* **301**(5639): 1503-8.
110. **Lew, V.L., Tiffert, T., and Ginsburg, H.** 2003. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Blood.* **101**(10): 4189-94.
111. **Lindl, T.** Zell- und Gewebekultur. 2000, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
112. **Lingelbach, K. and Joiner, K.A.** 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci.* **111 (Pt 11)**: 1467-75.
113. **Low, F.M., Hampton, M.B., Peskin, A.V., and Winterbourn, C.C.** 2007. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood.* **109**(6): 2611-7.
114. **Lucius R., L.-F.B.** Parasitologie. Grundlagen für Biologen, Mediziner, Veterinärmediziner. 1997, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
115. **Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W., and Grant, C.M.** 1998. The yeast Saccharomyces cerevisiae contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell.* **9**(5): 1081-91.
116. **Malhotra, P., Dasaradhi, P.V., Kumar, A., Mohmmmed, A., Agrawal, N., Bhatnagar, R.K., and Chauhan, V.S.** 2002. Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol.* **45**(5): 1245-54.
117. **Mandi, G., Witte, S., Meissner, P., Coulibaly, B., Mansmann, U., Rengelshausen, J., Schiek, W., Jahn, A., Sanon, M., Wust, K., Walter-Sack, I., Mikus, G., Burhenne, J., Riedel, K.D., Schirmer, H., Kouyate, B., and Muller, O.** 2005. Safety of the combination of chloroquine and methylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso. *Trop Med Int Health.* **10**(1): 32-8.
118. **Marnett, L.J.** 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* **21**(3): 361-70.
119. **Martin, J.L.** 1995. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure.* **3**(3): 245-50.
120. **Martin, W., Rotte, C., Hoffmeister, M., Theissen, U., Gelius-Dietrich, G., Ahr, S., and Henze, K.** 2003. Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. *IUBMB Life.* **55**(4-5): 193-204.
121. **Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., and Taketo, M.M.** 1996. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol.* **178**(1): 179-85.
122. **McMillan, P.J., Arcsott, L.D., Ballou, D.P., Becker, K., Williams, C.H., Jr., and Muller, S.** 2006. Identification of acid-base catalytic residues of high-Mr thioredoxin reductase from Plasmodium falciparum. *J Biol Chem.* **281**(44): 32967-77.
123. **Mehlhorn.** Grundriss der Parasitenkunde. Spektrum Akademischer Verlag. 2002, Heidelberg.

124. **Meissner, M., Schluter, D., and Soldati, D.** 2002. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*. **298**(5594): 837-40.
125. **Meissner, M., Krejany, E., Gilson, P.R., de Koning-Ward, T.F., Soldati, D., and Crabb, B.S.** 2005. Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(8): 2980-5.
126. **Meissner, M., Breinich, M.S., Gilson, P.R., and Crabb, B.S.** 2007. Molecular genetic tools in *Toxoplasma* and *Plasmodium*: achievements and future needs. *Curr Opin Microbiol*. **10**(4): 349-56.
127. **Meissner, P.E., Mandi, G., Witte, S., Coulibaly, B., Mansmann, U., Rengelshausen, J., Schiek, W., Jahn, A., Sanon, M., Tapsoba, T., Walter-Sack, I., Mikus, G., Burhenne, J., Riedel, K.D., Schirmer, H., Kouyate, B., and Muller, O.** 2005. Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in young children of Burkina Faso [ISRCTN27290841]. *Malar J*. **4**: 45.
128. **Meissner, P.E., Mandi, G., Coulibaly, B., Witte, S., Tapsoba, T., Mansmann, U., Rengelshausen, J., Schiek, W., Jahn, A., Walter-Sack, I., Mikus, G., Burhenne, J., Riedel, K.D., Schirmer, R.H., Kouyate, B., and Muller, O.** 2006. Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malar J*. **5**: 84.
129. **Menard, R. and Janse, C.** 1997. Gene targeting in malaria parasites. *Methods*. **13**(2): 148-57.
130. **Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K.** 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. **415**(6872): 673-9.
131. **Misra, H.P. and Fridovich, I.** 1972. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem*. **247**(21): 6960-2.
132. **Mons, B., Janse, C.J., Boorsma, E.G., and Van der Kaay, H.J.** 1985. Synchronized erythrocytic schizogony and gametocytogenesis of *Plasmodium berghei* in vivo and in vitro. *Parasitology*. **91 (Pt 3)**: 423-30.
133. **Mons, B.** 1986. Intra erythrocytic differentiation of *Plasmodium berghei*. *Acta Leiden*. **54**: 1-124.
134. **Mota, M.M., Thathy, V., Nussenzweig, R.S., and Nussenzweig, V.** 2001. Gene targeting in the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol*. **113**(2): 271-8.
135. **Mueller, A.K., Labaied, M., Kappe, S.H., and Matuschewski, K.** 2005. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature*. **433**(7022): 164-7.
136. **Muller, E.G.** 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem*. **266**(14): 9194-202.
137. **Muller, S., Gilberger, T.W., Krnajski, Z., Luersen, K., Meierjohann, S., and Walter, R.D.** 2001. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma*. **217**(1-3): 43-9.
138. **Muller, S., Liebau, E., Walter, R.D., and Krauth-Siegel, R.L.** 2003. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol*. **19**(7): 320-8.
139. **Muller, S.** 2004. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. **53**(5): 1291-305.
140. **Munte, C.E., Becker, K., Schirmer, R.H., and Kalbitzer, H.R.** 2005. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N sequence-specific resonance assignment and secondary structure of *Plasmodium falciparum* thioredoxin. *J Biomol NMR*. **32**(4): 340.
141. **Nevill, C.G., Some, E.S., Mung'ala, V.O., Mutemi, W., New, L., Marsh, K., Lengeler, C., and Snow, R.W.** 1996. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health*. **1**(2): 139-46.
142. **Nickel, C., Rahlfs, S., Deponte, M., Koncarevic, S., and Becker, K.** 2006. Thioredoxin networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Antioxid Redox Signal*. **8**(7-8): 1227-39.
143. **Nocht B., W.H.** 1910. Beobachtungen über relative Chininresistenz bei Malaria aus Brasilien *Dtsch. Med. Wochenschr*. **36**: 1557-1560.
144. **Nonn, L., Williams, R.R., Erickson, R.P., and Powis, G.** 2003. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol*. **23**(3): 916-22.
145. **Nordhoff, A., Bucheler, U.S., Werner, D., and Schirmer, R.H.** 1993. Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446-->Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. *Biochemistry*. **32**(15): 4060-6.

146. Nordhoff, A., Tziatzios, C., van den Broek, J.A., Schott, M.K., Kalbitzer, H.R., Becker, K., Schubert, D., and Schirmer, R.H. 1997. Denaturation and reactivation of dimeric human glutathione reductase--an assay for folding inhibitors. *Eur J Biochem.* **245**(2): 273-82.
147. Nosten, F., ter Kuile, F., Chongsuphajaisiddhi, T., Luxemburger, C., Webster, H.K., Edstein, M., Phaipun, L., Thew, K.L., and White, N.J. 1991. Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border. *Lancet.* **337**(8750): 1140-3.
148. O'Donnell, R.A., Saul, A., Cowman, A.F., and Crabb, B.S. 2000. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related Plasmodium species. *Nat Med.* **6**(1): 91-5.
149. O'Donnell, R.A., Preiser, P.R., Williamson, D.H., Moore, P.W., Cowman, A.F., and Crabb, B.S. 2001. An alteration in concatameric structure is associated with efficient segregation of plasmids in transfected Plasmodium falciparum parasites. *Nucleic Acids Res.* **29**(3): 716-24.
150. Orjih, A.U., Banyal, H.S., Chevli, R., and Fitch, C.D. 1981. Hemin lyses malaria parasites. *Science.* **214**(4521): 667-9.
151. Ortenberg, R., Gon, S., Porat, A., and Beckwith, J. 2004. Interactions of glutaredoxins, ribonucleotide reductase, and components of the DNA replication system of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(19): 7439-44.
152. Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar, A.D., and Madsen, S.K. 2000. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature.* **404**(6775): 307-10.
153. Pampana, E.J. A Textbook of Malaria Eradication. 2nd Edition ed. 1969, London: Oxford University Press.
154. Patil, K., Pawar, R. and Talap, P. 2000. Self-aggregation of methylene blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu4NBr and urea. *Phys. Chem.Chem. Phys.* **2**: 4313-4317.
155. Pelgrims, J., De Vos, F., Van den Brande, J., Schrijvers, D., Prove, A., and Vermorken, J.B. 2000. Methylene blue in the treatment and prevention of ifosfamide-induced encephalopathy: report of 12 cases and a review of the literature. *Br J Cancer.* **82**(2): 291-4.
156. Peters, W. 1970. The chemotherapy of rodent malaria. X. Dynamics of drug resistance. II. Acquisition and loss of chloroquine resistance in Plasmodium berghei observed by continuous bioassay. *Ann Trop Med Parasitol.* **64**(1): 25-40.
157. Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J. 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J Biol Chem.* **272**(25): 15661-7.
158. Rahlfs, S., Schirmer, R.H., and Becker, K. 2002. The thioredoxin system of Plasmodium falciparum and other parasites. *Cell Mol Life Sci.* **59**(6): 1024-41.
159. Rahlfs, S., Nickel, C., Deponte, M., Schirmer, R.H., and Becker, K. 2003. Plasmodium falciparum thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Rep.* **8**(5): 246-50.
160. Rahlfs, S. and Becker, K. 2006. Interference with redox-active enzymes as a basis for the design of antimalarial drugs. *Mini Rev Med Chem.* **6**(2): 163-76.
161. Rastogi, M., Pal, N.L., and Sen, A.B. 1987. Effect of variation in temperature on development of Plasmodium berghei (NK 65 strain) in Anopheles stephensi. *Folia Parasitol (Praha).* **34**(4): 289-97.
162. Reddy, R.C., Vatsala, P.G., Keshamouni, V.G., Padmanaban, G., and Rangarajan, P.N. 2005. Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* **326**(2): 472-4.
163. Reiter, P. 2000. From Shakespeare to Defoe: malaria in England in the Little Ice Age. *Emerg Infect Dis.* **6**(1): 1-11.
164. Ridley, R.G. 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature.* **415**(6872): 686-93.
165. Russel, M. and Holmgren, A. 1988. Construction and characterization of glutaredoxin-negative mutants of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(4): 990-4.
166. Russell, D.G. and Sinden, R.E. 1981. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J Cell Sci.* **50**: 345-59.
167. Sachs, J. and Malaney, P. 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature.* **415**(6872): 680-5.
168. Salinas, G., Selkirk, M.E., Chalar, C., Maizels, R.M., and Fernandez, C. 2004. Linked thioredoxin-glutathione systems in plathyhelminths. *Trends Parasitol.* **20**(7): 340-6.

169. **Sanchez-Perez, Y., Carrasco-Legleu, C., Garcia-Cuellar, C., Perez-Carreon, J., Hernandez-Garcia, S., Salcido-Neyoy, M., Aleman-Lazarini, L., and Villa-Trevino, S.** 2005. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* **217**(1): 25-32.
170. **Sanders, P.R., Gilson, P.R., Cantin, G.T., Greenbaum, D.C., Nebl, T., Carucci, D.J., McConville, M.J., Schofield, L., Hodder, A.N., Yates, J.R., 3rd, and Crabb, B.S.** 2005. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* **280**(48): 40169-76.
171. **Sarma, G.N., Savvides, S.N., Becker, K., Schirmer, M., Schirmer, R.H., and Karplus, P.A.** 2003. Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. *J Mol Biol.* **328**(4): 893-907.
172. **Savvides, S.N., Scheiwein, M., Bohme, C.C., Arteel, G.E., Karplus, P.A., Becker, K., and Schirmer, R.H.** 2002. Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem.* **277**(4): 2779-84.
173. **Schafer, F.Q. and Buettner, G.R.** 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* **30**(11): 1191-212.
174. **Scheller, L.F., Wirtz, R.A., and Azad, A.F.** 1994. Susceptibility of different strains of mice to hepatic infection with *Plasmodium berghei*. *Infect Immun.* **62**(11): 4844-7.
175. **Schirmer, R.H., Coulibaly, B., Stich, A., Scheiwein, M., Merkle, H., Eubel, J., Becker, K., Becher, H., Muller, O., Zich, T., Schiek, W., and Kouyate, B.** 2003. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep.* **8**(5): 272-5.
176. **Schirmer, R.H.** 2004. Medikamente für die Armen. *Spektrum der Wissenschaft.* **Dez.:** 110-113.
177. **Selkirk, M.E., Smith, V.P., Thomas, G.R., and Gounaris, K.** 1998. Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *Int J Parasitol.* **28**(9): 1315-32.
178. **Sies, H. and Cadenas, E.** 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **311**(1152): 617-31.
179. **Sies, H.** 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* **215**(2): 213-9.
180. **Sijwali, P.S., Kato, K., Seydel, K.B., Gut, J., Lehman, J., Klemba, M., Goldberg, D.E., Miller, L.H., and Rosenthal, P.J.** 2004. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(23): 8721-6.
181. **Sinden, R.E. and Croll, N.A.** 1975. Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Parasitology.* **70**(1): 53-65.
182. **Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I., and Miller, L.H.** 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell.* **82**(1): 101-10.
183. **Stadtman, E.R. and Levine, R.L.** 2000. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* **899**: 191-208.
184. **Stewart, E.J., Aslund, F., and Beckwith, J.** 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *Embo J.* **17**(19): 5543-50.
185. **Storch V., W.U.** *Systematische Zoologie.* 2004, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
186. **Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., and Wellems, T.E.** 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell.* **82**(1): 89-100.
187. **Su, X.Z., Wu, Y., Sifri, C.D., and Wellems, T.E.** 1996. Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**(8): 1574-5.
188. **Thathy, V. and Menard, R.** 2002. Gene targeting in *Plasmodium berghei*. *Methods Mol Med.* **72**: 317-31.
189. **Thurston, J.P.** 1953. The chemotherapy of *P. berghei* I. Resistance to drugs. *Parasitology.* **43**: 246-252.
190. **Tongren, J.E., Zavala, F., Roos, D.S., and Riley, E.M.** 2004. Malaria vaccines: if at first you don't succeed. *Trends Parasitol.* **20**(12): 604-10.
191. **Tovar, J., Cunningham, M.L., Smith, A.C., Croft, S.L., and Fairlamb, A.H.** 1998. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a

- trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(9): 5311-6.
192. **Trager, W. and Jensen, J.B.** 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science. **193**(4254): 673-5.
193. **Trager, W. and Jensen, J.B.** 1977. Cultivation of erythrocytic stages. Bull World Health Organ. **55**(2-3): 363-5.
194. **Triglia, T., Healer, J., Caruana, S.R., Hodder, A.N., Anders, R.F., Crabb, B.S., and Cowman, A.F.** 2000. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. Mol Microbiol. **38**(4): 706-18.
195. **Turrini, F., Ginsburg, H., Bussolino, F., Pescarmona, G.P., Serra, M.V., and Arese, P.** 1992. Phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. Blood. **80**(3): 801-8.
196. **van Dijk, M.R., Waters, A.P., and Janse, C.J.** 1995. Stable transfection of malaria parasite blood stages. Science. **268**(5215): 1358-62.
197. **Vanderberg, J.P.** 1974. Studies on the motility of Plasmodium sporozoites. J Protozool. **21**(4): 527-37.
198. **Vennerstrom, J.L., Makler, M.T., Angerhofer, C.K., and Williams, J.A.** 1995. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. Antimicrob Agents Chemother. **39**(12): 2671-7.
199. **Videla, L.A. and Fernandez, V.** 1988. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. Arch Biol Med Exp (Santiago). **21**(1): 85-92.
200. **Vlami-Gardikas, A. and Holmgren, A.** 2002. Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. Methods Enzymol. **347**: 286-96.
201. **Wahlgren, M., Carlson, J., Helmbj, H., Hedlund, I., and Treutiger, C.J.** 1992. Molecular mechanisms and biological importance of Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting. Mem Inst Oswaldo Cruz. **87 Suppl 3**: 323-9.
202. **Waters, A.P., Thomas, A.W., van Dijk, M.R., and Janse, C.J.** 1997. Transfection of malaria parasites. Methods. **13**(2): 134-47.
203. **Waters, A.P., Mota, M.M., van Dijk, M.R., and Janse, C.J.** 2005. Parasitology. Malaria vaccines: back to the future? Science. **307**(5709): 528-30.
204. **Waters, C.T., Janse C.J.** Malaria Parasites: Genomes and Molecular Biology. 2004: Wymondham: Caister Academic Press.
205. **Wellems, T.E. and Plowe, C.V.** 2001. Chloroquine-resistant malaria. J Infect Dis. **184**(6): 770-6.
206. WHO, *World Malaria Report 2005*. 2005. p. www.rbm.who.int/wmr2005/.
207. WHO, *Guidelines for the treatment of malaria.*, in www.who.int/malaria/docs/treatmentguidelines2006. 2006.
208. **Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., and Schlitzer, M.** 2003. New antimalarial drugs. Angew Chem Int Ed Engl. **42**(43): 5274-93.
209. **Williams, C.H., Arscott, L.D., Muller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K., and Schirmer, R.H.** 2000. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. Eur J Biochem. **267**(20): 6110-7.
210. **Wood, P.A. and Eaton, J.W.** 1993. Hemoglobin catabolism and host-parasite heme balance in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant Plasmodium berghei infections. Am J Trop Med Hyg. **48**(4): 465-72.
211. **Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L.B.** 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends Biochem Sci. **28**(1): 32-40.
212. **Wu, Y., Sifri, C.D., Lei, H.H., Su, X.Z., and Wellems, T.E.** 1995. Transfection of Plasmodium falciparum within human red blood cells. Proc Natl Acad Sci U S A. **92**(4): 973-7.
213. **Yayon, A., Vande Waa, J.A., Yayon, M., Geary, T.G., and Jensen, J.B.** 1983. Stage-dependent effects of chloroquine on Plasmodium falciparum in vitro. J Protozool. **30**(4): 642-7.
214. **Yeh, I. and Altman, R.B.** 2006. Drug Targets for Plasmodium falciparum: a post-genomic review/survey. Mini Rev Med Chem. **6**(2): 177-202.
215. **Young, M.D. and Moore, D.V.** 1961. Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. Am J Trop Med Hyg. **10**: 317-20.

216. **Zappe, H.A.** 1980. Die Bindungsstellen Hämolyse-induzierender Pharmaka an der Glutathionreduktase aus menschlichen Erythrozyten. Röntgenstrukturanalyse von Enzym-Pharmakon-Komplexen.
217. **Zoungrana, A., Coulibaly, B., Sie, A., Walter-Sack, I., Mockenhaupt, F.P., Kouyate, B., Schirmer, R.H., Klose, C., Mansmann, U., Meissner, P., and Muller, O.** 2008. Safety and efficacy of methylene blue combined with artesunate or amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso. *PLoS ONE*. **3**(2): e1630.

edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5382-6



9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 3 8 2 6