

Mechanistische Charakterisierung der Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen von Glutaredoxinen und redoxsensitivem grün-fluoreszierendem Protein

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern zur
Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation



vorgelegt von

Fabian Geissel

Betreuer: Prof. Dr. Marcel Deponte

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 05. September 2022

Kennung der Universitätsbibliothek Kaiserslautern: DE-386

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass der Inhalt und die schriftliche Ausarbeitung meiner Dissertation selbstständig erarbeitet wurden und dazu nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Ort, Datum

Unterschrift

Promotionskommission

Vorsitzender:	Prof. Dr. Antonio Pierik
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marcel Deponte
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bruce Morgan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Danksagung.....	IV
Zusammenfassung	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Anhangverzeichnis.....	X
Abkürzungen	X
1. Einleitung.....	1
1.1. Malaria.....	1
1.1. Peroxiredoxine.....	3
1.2. Glutaredoxine	5
1.2.1. Glutaredoxine – der Reaktionsmechanismus.....	6
1.2.2. Glutaredoxine – aktiv oder inaktiv?	9
1.3. Das redox-sensitive grün fluoreszierende Protein (roGFP2).....	11
1.3.1. Der Fluoreszenzmechanismus von GFP und die Entwicklung von roGFP2	11
1.3.2. roGFP2 als fusioniertes Reporterprotein für intrazelluläre Redoxforschung	13
1.4. Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Materialien und Geräte	15
2.1.1. Geräte	15
2.1.2. Verbrauchsgegenstände	16
2.1.3. Chemikalien	17
2.1.4. Programme	19
2.1.5. Enzyme	20
2.1.6. Antikörper.....	20
2.1.7. Primer	20
2.1.8. Plasmide	21
2.1.9. Bakterienstämme	22
2.1.10. Plasmodiumstämme	23
2.2. Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.2.2. Agarose Gel-Elektrophorese.....	23

2.2.3.	Restriktionsverdau.....	24
2.2.4.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	24
2.2.5.	Ligation	25
2.2.6.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.2.7.	Transformation in <i>E. coli</i>	26
2.2.8.	Plasmid-DNA-Isolierung	26
2.2.9.	Expression und Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	27
2.2.10.	Kultivierung und Manipulation von <i>Plasmodium falciparum</i>	28
2.2.10.1.	Auftauen von <i>P. falciparum</i> Blutkulturen.....	28
2.2.10.2.	Kultivierung von <i>P. falciparum</i> Parasiten im Blutstadium.....	28
2.2.10.3.	Ausstriche, Giemsa-Färbung und Abschätzung der Parasitämie.....	29
2.2.10.4.	Einfrieren von <i>P. falciparum</i> Blutkulturen.....	29
2.2.10.5.	Synchronisierung von <i>P. falciparum</i> Blutkulturen.....	29
2.2.10.6.	Transfektion von <i>P. falciparum</i> Blutkulturen.....	30
2.2.10.7.	Genomische Integration durch Selection Linked Integration (SLI)	30
2.2.10.8.	DNA-Isolierung von <i>P. falciparum</i> Blutkulturen und Genotypisierung	31
2.2.10.9.	Lyse der Erythrozyten durch Saponin in <i>P. falciparum</i> Blutkulturen	31
2.3.	Biochemische Methoden.....	32
2.3.1.	Aufreinigung von Proteinen über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie.....	32
2.3.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.3.3.	Herstellung von Polyacrylamidgelen und Gelelektrophorese	34
2.3.4.	Western Blot Analyse	35
2.3.5.	Vorbereitung der Proteine durch Reduktion oder Oxidation.....	36
2.3.6.	<i>Redox Electrophoretic Mobility Shift</i> (EMSA)	36
2.4.	Kinetikmessungen.....	37
2.4.1.	Glutathion-Reduktase Aktivitätsbestimmung	37
2.4.2.	GSSCys <i>Steady-state</i> Enzymkinetiken	38
2.4.3.	<i>Stopped-flow</i> Enzymkinetiken	39
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Die genomische Integration des <i>PFPRX6</i>	42
3.1.1.	DNA-Analyse zeigt eine korrekte Integration des <i>PFPRX6</i> -Konstrukts in das Genom von <i>P. falciparum</i>	42
3.1.2.	PfPrx6-His ₈ -GFP konnte nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden.....	43
3.2.	Interkonversationsstudie von ScGrx7 und HsGrx5.....	44
3.2.1.	Mutationen in ScGrx7 können zu proteolytischem Abbau des Proteins in <i>E. coli</i> führen	46

3.2.2.	Zwei konservierte Argininreste in ScGrx7 gehören zur <i>Glutathion-Scaffold-Site</i> ...	47
3.2.3.	Das inaktive HsGrx5 lässt sich durch das Entfernen einer konservierten Schleife aktivieren.....	47
3.2.4.	Die Aktivität von HsGrx5 ^{loop} lässt sich durch das Einfügen von zwei Argininresten nicht weiter steigern.....	48
3.3.	PfGrx kann GSNO direkt reduzieren	50
3.4.	Der Reaktionsmechanismus von roGFP2 und PfGrx	52
3.4.1.	roGFP2 und PfGrx – Die Einzelschritte der oxidativen Halbreaktion	55
3.4.1.1.	roGFP2 ^{WT} lässt sich durch glutathionyliertes PfGrx schnell oxidieren, nicht aber durch das Grx-interne C29-C32-Disulfid	55
3.4.1.2.	Die Oxidation von roGFP2 kann durch beide Cysteine vermittelt werden, schneller allerdings durch Cys208.....	59
3.4.2.	roGFP2 und PfGrx – Die Einzelschritte der reduktiven Halbreaktionen.....	65
3.4.2.1.	PfGrx benötigt GSH zum Aufbrechen des roGFP2-Disulfids	66
3.4.2.2.	PfGrx deglutathionyliert Monothiol-roGFP2-SSG ohne GSH	71
3.4.3.	Die Übertragungsgeschwindigkeit von Oxidationsäquivalenten innerhalb des roGFP2-PfGrx-Fusionskonstruktes ist limitiert	76
4.	Diskussion.....	80
4.1.	Ein <i>PFPRX6-HIS₈-GFP</i> -Stamm kann genutzt werden, um PfPrx6 <i>in vivo</i> genauer zu untersuchen.....	80
4.2.	Glutaredoxine	83
4.2.1.	Das Einfügen von Motiven aus HsGrx5 kann ScGrx7 inaktivieren	83
4.2.2.	HsGrx5 kann durch Motive aus ScGrx7 aktiviert werden.....	84
4.3.	Glutaredoxine sind Regulatoren der Stickoxid-Signaltransduktion	87
4.4.	roGFP2 als Reporterprotein oder Proteinsubstrat	87
4.4.1.	roGFP2 eignet sich nicht zur dynamischen Untersuchung von intrazellulären nicht-Glutathion-Disulfiden	88
4.4.2.	Nutzung von Mono- und Dithiol-roGFP2 als Proteinsubstrat zeigt, dass PfGrx GSH zur Reduktion von nicht-Glutathion-Disulfiden aktivieren muss.....	90
4.4.3.	Die Geschwindigkeit des Übertrags einer Glutathioneinheit im roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukt ist limitiert.....	92
5.	Fazit und Ausblick.....	98
6.	Literaturverzeichnis.....	100
7.	Anhang	108

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Marcel Deponte bedanken, in dessen Labor ich an interessanten Themen forschen durfte. Du warst mir nicht nur ein guter Lehrer und Mentor, den ich bei Fragen jederzeit aufsuchen konnte, sondern auch eine Quelle für Motivation und Inspiration.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Bruce Morgan für die erfolgreichen Kooperationsprojekte und die vielen wertvollen Tipps und Ideen zu meiner Arbeit bedanken.

Dankeschön an meinen Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Antonio Pierik und PD Dr. Daili Netz für die Bereitstellung vieler Geräte und Materialien während meiner Promotionszeit.

Vielen Dank an meine Kolleginnen und Kollegen Robin Schumann, Eileen Bischoff, Lukas Lang, Gino Turra, Britta Husemann, Luzia Schneider, Sophie Möhring, Felix Ayelazuno, Ann-Cathrin Wolf und Doreen Knochenhauer, die mir sowohl während der Arbeitszeit mit Idee und Rat als auch an warmen Sommerabenden bei einem kühlen Bier zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich besonders herzlich meiner Familie danken. Auf euren Rückhalt und eure Sicherheit konnte ich mich während meiner akademischen Laufbahn immer verlassen.

Zusammenfassung

Peroxiredoxine sind Peroxidasen, die in allen Reichen der Lebewesen vorkommen. Sie gehören zu den häufigsten Proteinen in einer Zelle und spielen eine wichtige Rolle im Redox-Metabolismus, dienen als Signalüberträger und können als Chaperone fungieren. Das hier untersuchte Peroxiredoxin 6 aus *Plasmodium falciparum* (PfPrx6) hat in *in vitro* Tests bereits eine große Aktivität bei der Reduktion von Hydroperoxiden gezeigt, jedoch keine Reaktion mit gängigen Reduktionspartnern, sodass der Mechanismus der Regeneration aus seiner oxidierten Form bis heute ungeklärt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *PFPRX6-HIS₈-GFP*-Konstrukt in das Genom des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* integriert. Die Integration konnte hierbei nur auf DNA-Ebene bestätigt werden. In zukünftigen Experimenten muss daher im nächsten Schritt die Anwesenheit des Protein-Konstrukts nachgewiesen werden. Hiernach kann das Konstrukt durch einen Pulldown aus dem Zelllysate isoliert und mithilfe von Massenspektrometrie untersucht werden, mit welchen Proteinen das PfPrx6 interagiert. Findet sich ein geeigneter Kandidat, kann eine folgende *in vitro* Studie bestätigen oder widerlegen, ob dieser das PfPrx6 effizient reduzieren kann.

Neben Peroxiredoxinen spielen Glutaredoxine (Grx) eine zentrale Rolle in der Homöostase des Redox-Milieus einer Zelle. Trotz großer struktureller Ähnlichkeit zueinander werden sie nach ihrer Funktion in zwei Klassen unterteilt: aktive Klasse 1 Glutaredoxine, welche enzymatisch die Reduktion von oxidierten Zellbestandteilen katalysieren, und redox-inaktive Klasse 2 Glutaredoxine, die wichtig für die Synthese und den Transfer von Eisen-Schwefel-Clustern sind. In vergangenen Studien wurde gezeigt, dass die Reaktion eines Grx mit einem glutathionylierten Substrat nach einem Ping-Pong-Mechanismus verläuft, also in zwei getrennte Schritte unterteilt ist. In der oxidativen Halbreaktion bindet der Glutathion-Rest des Substrats an die *Glutathion-Scaffold-Site* („Glutathion-Gerüst-Zentrum“) und transferiert das Glutathion auf das Grx. In der hierauf folgenden reduktiven Halbreaktion bindet ein zweites Molekül reduziertes Glutathion (GSH) in die *Glutathion-Activator-Site* („Glutathion-Aktivierungs-Zentrum“) und regeneriert unter Freisetzung von oxidiertem Glutathion (GSSG) das reduzierte Glutaredoxin.

In dieser Arbeit wurden Aminosäuren des Klasse 1 ScGrx7 und des Klasse 2 HsGrx5

ausgetauscht, um die Motive zu identifizieren, die ein Grx aktiv oder inaktiv machen. Das Einfügen der Mutationen R152W und R153P in ScGrx7 verlangsamte die oxidative Halbreaktion auf etwa 20 % der Aktivität des Wildtypenzym, hatte aber keinen Einfluss auf die reduktive Halbreaktion. Somit ist davon auszugehen, dass diese Reste Teil der *Glutathion-Scaffold-Site* sind. Ein weiterer Unterschied der Grx-Varianten ist eine fünf Aminosäuren lange Schleife im HsGrx5, welche in aktiven Glutaredoxinen fehlt. Es wurde eine ScGrx7^{loop}-Mutante erstellt, die einen Verlust von mehr als 99 % ihrer Aktivität aufweist. Das Ausschneiden dieser fünf Aminosäuren in HsGrx5 konnte hingegen dessen katalytische Funktion aktivieren. Somit konnte gezeigt werden, dass diese Schleife einer der Hauptunterschiede der beiden Glutaredoxinklassen ist und diese als eine Art An- und Ausschalter der katalytischen Aktivität dient.

Durch das Verwenden des redox-sensitiven grün-fluoreszierenden Proteins 2 (roGFP2) als Elektronendonator und Reporterprotein konnte ebenfalls die direkte Reduktion von GSNO, einem Derivat von Glutathion, das hauptsächlich als Stickoxidspeicher gesehen wird, durch PfGrx nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann auf die Beteiligung von Glutaredoxinen an der NO-Signalkette hinweisen.

roGFP2 wird bereits in weiten Bereichen der Redox-Forschung eingesetzt. Es besitzt Cysteine an den Stellen 151 und 208, die eine Disulfidbrücke ausbilden können. Je nach Oxidationszustand dieser Cysteine ändert das roGFP2 seine spektralen Eigenschaften. Zuletzt wurde es meist als Reportereinheit in Fusionskonstrukten mit Glutaredoxinen oder Peroxiredoxinen, die als Sensorproteine dienen, eingesetzt. Diese Konstrukte können in zellulären Tests genutzt werden, beispielsweise zur Bestimmung lokaler Peroxidkonzentrationen, zur Untersuchung des Glutathion-Redoxstatus oder als *Screening-Methode* für Aktivitätsbestimmungen und Struktur-Funktions-Analysen der fusionierten Sensorproteine.

In dieser Arbeit wurde die Reaktion von roGFP2 und Grx aus *Plasmodium falciparum* (PfGrx) untersucht, sowohl als Fusionskonstrukt, als auch als getrennte Einzelproteine. Um sowohl den Monothiol- als auch den Dithiolmechanismus der Glutaredoxine zu verstehen, wurden die Mutanten PfGrx^{C32/88S} (Monothiol) und PfGrx^{C88S} (Dithiol) erstellt, sowie die roGFP2-Mutanten roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S}. Es konnte gezeigt werden, dass die Oxidation des roGFP2 nur durch den Übertrag von Glutathion effizient verläuft, wobei der Transfer selbst im

Fusionskonstrukt bei großen Substratkonzentrationen geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Der Übertrag eines nicht-Glutathion Disulfids von PfGrx^{C88S} auf roGFP2 verläuft nur sehr langsam. In dynamischen *in cellulo* Tests, die einen solchen Übertrag untersuchen wollen, muss also mit großen Beeinflussungen der Daten durch effizientere, glutathionabhängige Nebenreaktionen gerechnet werden.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Reduktion von roGFP2 als Disulfidsubstrat sehr langsam verläuft und nur in Anwesenheit von GSH stattfinden kann. Ein Kompetitionstest mit GSMe (*S*-Methyl-Glutathion) zeigt, dass das Grx hierfür ein Molekül GSH rekrutiert und nicht etwa zufällig durch GSH glutathionylierte Proteine angreift. Obwohl das Dithiol-Grx hierbei effizienter ist, kann auch das Monothiol-Grx auf diese Weise Disulfidsubstrate wie roGFP2 reduzieren.

Die Reduktion der glutathionylierten roGFP2 Monothiol-Mutanten konnte effizient von beiden Grx-Varianten katalysiert werden, auch in Abwesenheit von GSH. PfGrx^{C88S} weist hierbei allerdings eine größere Geschwindigkeit auf. Somit scheint das Cys32 des PfGrx die Konformation des Cys29 und damit dessen Reaktivität zu beeinflussen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Weltkarte der Malariaausbreitung von 2000 bis 2019.....	1
Abbildung 2 Der Blutkreislauf von <i>Plasmodium falciparum</i>	2
Abbildung 3 Der katalytische Zyklus eines Peroxiredoxins.....	4
Abbildung 4 Der Reaktionsmechanismus eines Klasse 1 Glutaredoxins nach dem Ping-Pong-Prinzip.....	7
Abbildung 5 Plausible Mechanismen zur Reduktion eines Protein Disulfids durch ein Monothiol-Glutaredoxin.....	8
Abbildung 6 Strukturelle Unterschiede zwischen enzymatisch aktiven und inaktiven Glutaredoxinen.....	10
Abbildung 7 Schematische Darstellung der reversiblen Deprotonierung im Chromophor des GFP.....	12
Abbildung 8 Schematische Darstellung einer <i>Stopped-flow</i> Apparatur.....	41
Abbildung 9 Eine Genotypisierung bestätigt die korrekte Integration des pSLI-Plasmids.	43
Abbildung 10 Ein Western-Blot zeigt keine Expression des <i>PFPRX6-HIS₆-GFP</i> -Konstrukts.....	44
Abbildung 11 ScGrx7 und HsGrx5 konnten in großer Reinheit isoliert werden.	46
Abbildung 12 Die Schleife am aktiven Zentrum ist ein wichtiger struktureller Unterschied zwischen enzymatisch aktiven und inaktiven Glutaredoxinen.	49
Abbildung 13 Die Oxidation von roGFP2 mit GSNO kann durch PfGrx katalysiert werden.....	52
Abbildung 14 Oxidiertes und reduziertes roGFP2 zeigen unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften.	54
Abbildung 15 Oxidation von reduziertem roGFP2 ^{WT} durch PfGrx ^{C88S} -SSG und PfGrx ^{C32/88S} -SSG.	56
Abbildung 16 Sekundärdiagramme der oxidativen Halbreaktion von reduziertem roGFP2 ^{WT} durch voroxidiertes PfGrx.....	57
Abbildung 17 roGFP2 lässt sich effizient von glutathionyliertem PfGrx oxidieren, der Übertrag eines internen Disulfids ist jedoch langsam.	58
Abbildung 18 Oxidiertes und reduziertes roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C208S} zeigen nur geringe Unterschiede in ihren Fluoreszenzeigenschaften.....	60
Abbildung 19 roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C208S} lassen sich komplett glutathionylieren.....	61
Abbildung 20 Primärdiagramme der oxidativen Halbreaktion von roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C208S} mit PfGrx ^{C88S}	62
Abbildung 21 Primärdiagramme der oxidativen Halbreaktion von roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C208S} mit PfGrx ^{C32/88S}	63
Abbildung 22 roGFP2 ^{C151S} und PfGrx ^{C32/88S} besitzen ein ähnliches Redoxpotential.	64
Abbildung 23 Sekundärdiagramme der oxidativen Halbreaktion von reduziertem roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C151S} durch glutathionyliertes PfGrx.....	65
Abbildung 24 Reduktion von oxidiertem roGFP2 ^{WT} durch PfGrx ^{C88S} und PfGrx ^{C32/88S} in Anwesenheit von GSH.	66
Abbildung 25 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2 ^{WT} mit reduziertem PfGrx ^{C88S}	67
Abbildung 26 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2 ^{WT} mit reduziertem PfGrx ^{C32/88S}	68
Abbildung 27 Tertiärdiagramme der Reaktion von oxidiertem roGFP2 mit reduziertem PfGrx und GSH.	69
Abbildung 28 Glutathion muss zur Reduktion von roGFP2 ^{WT} -S ₂ von PfGrx aktiviert werden. 70	
Abbildung 29 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathionyliertem	

roGFP2 ^{C151S} mit reduziertem PfGrx ^{C88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.....	71
Abbildung 30 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathionyliertem roGFP2 ^{C151S} mit reduziertem PfGrx ^{C32/88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.....	72
Abbildung 31 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathionyliertem roGFP2 ^{C208S} mit reduziertem PfGrx ^{C88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.....	73
Abbildung 32 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathionyliertem roGFP2 ^{C208S} mit reduziertem PfGrx ^{C32/88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.....	74
Abbildung 33 Glutathionylierte roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C208S} können effizient von PfGrx ohne GSH reduziert werden.	75
Abbildung 34 Die Oxidationsgeschwindigkeit des roGFP2-PfGrx-Fusionskonstruktes durch GSSG ist sättigbar.....	77
Abbildung 35 Das roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukt lässt sich schnell durch GSSG oxidieren..	78
Abbildung 36 PfGrx muss GSH rekrutieren und aktivieren um oxidiertes roGFP2-S ₂ zu reduzieren.	91
Abbildung 37 Schematische Darstellung der Assoziation von GSSG an PfGrx im roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukt.	93
Abbildung 38 Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von roGFP2 und PfGrx.	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte	15
Tabelle 2 Verbrauchsgegenstände	16
Tabelle 3 Kits	17
Tabelle 4 Chemikalien	17
Tabelle 5 Programme	19
Tabelle 6 Enzyme.....	20
Tabelle 7 Antikörper.....	20
Tabelle 8 Primer	20
Tabelle 9 Plasmide.....	21
Tabelle 10 Bakterienstämme.....	22
Tabelle 11 Plasmodiumstämme	23
Tabelle 12 Versuchsaufbau der <i>Stopped-flow</i> Messungen.	41
Tabelle 13 Vergleich der ungefähren k_{cat} und K_m Werte und Dalziel-Koeffizienten Φ_1 und Φ_2 von ScGrx7 und HsGrx5 und deren Mutanten.	50
Tabelle 14 Geschwindigkeitskonstanten der oxidativen Halbreaktion von roGFP2 ^{WT} , roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C208S}	59
Tabelle 15 Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion von roGFP2 ^{WT}	70
Tabelle 16 Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion von roGFP2 ^{C151S} und roGFP2 ^{C208S}	75
Tabelle 17 Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation von roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukten durch GSSG	76

Anhangverzeichnis

Anhang 1 Sequenzierungsergebnis des genomischen Lokus von <i>PFPRX6</i> nach Integration des pSLI- <i>PFPRX6-HIS₈-GFP</i>	109
Anhang 2 GSSCys-Test <i>Steady-state</i> Kinetiken von ScGrx7 Wildtyp und Mutanten ScGrx7 ^{WP} , ScGrx7 ^{loop} und ScGrx7 ^{WP+loop}	111
Anhang 3 Sekundärdiagramme des GSSCys-Tests für ScGrx7 Wildtyp und Mutanten ScGrx7 ^{WP} , ScGrx7 ^{loop} und ScGrx7 ^{WP+loop}	113
Anhang 4 Ausgewählte k_{cat}^{app} und K_m^{app} Werte von GSSCys-Tests mit ScGrx7 ^{WT} , ScGrx7 ^{WP} , ScGrx7 ^{loop} und ScGrx7 ^{WP+loop}	114
Anhang 5 GSSCys-Test <i>steady-state</i> Kinetiken von HsGrx5 ^{loop} und HsGrx5 ^{RR+loop}	115
Anhang 6 Sekundärdiagramme des GSSCys-Tests für HsGrx5 ^{loop} und HsGrx5 ^{RR+loop}	116
Anhang 7 Ausgewählte k_{cat}^{app} und K_m^{app} Werte von GSSCys-Tests mit HsGrx5 ^{WT} , HsGrx5 ^{RR} , HsGrx5 ^{loop} und HsGrx5 ^{RR+loop}	117
Anhang 8 Primärdiagramme der Reaktion von roGFP2 mit GSNO und PfGrx.....	118
Anhang 9 Vorbehandlung von PfGrx ^{C88S} und PfGrx ^{C32/88S} mit Diamid oder GSSG.....	119
Anhang 10 Angenähertes Sättigungsverhalten der Reduktion von roGFP2 ^{WT} durch PfGrx und GSH.....	119
Anhang 11 Maximale Reaktionsgeschwindigkeit k_{cat} der Reduktion von roGFP2 ^{WT} durch PfGrx ^{C88S} und PfGrx ^{C32/88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.....	119
Anhang 12 Reaktionskonstanten der Reaktion dritter Ordnung zwischen roGFP2, PfGrx und GSH.....	120
Anhang 13 Sekundärdiagramme der Reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2 mit reduziertem PfGrx und GSH, in Abhängigkeit von GSH aufgetragen.....	120
Anhang 14 Reaktionskonstanten der reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2 mit reduziertem PfGrx und GSH, in Abhängigkeit von GSH.....	121
Anhang 15 Wettbewerbstest bei der reduktiven Halbreaktion von roGFP2 durch PfGrx ^{C32/88S} durch GSMe.....	121
Anhang 16 Sekundärdiagramme der Reaktion von roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukten mit GSSG.....	122
Anhang 17 Reaktion von reduziertem roGFP2 ^{WT} mit GSSG.....	123

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
α	anti
#	Nummer
Δ	Delta
%	Pro Hundert
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung

Abs	Absorption
Amp	Ampicillin
AOP	Antioxidant Protein
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein9
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
cm	Zentimeter
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser (hier Millipore Wasser)
Dia	Diamid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli (Ec)</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	et alii (und andere)
FF	<i>Fully folded</i> (vollständig gefaltet)
g	Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GR	Glutathion Reduktase
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion (reduziert)
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GSSG	Glutathion Disulfid
h	Stunden
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
iRBC	Infiziertes rotes Blutkörperchen
kBp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
k_{obs}	Observed Geschwindigkeitskonstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
LU	<i>Locally unfolded</i> (lokal entfaltet)
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mmPEG	methyl-Polyethylenglykol-maleimid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
N-Terminus	Amino-Terminus
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
<i>P. falciparum (Pf)</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	Protein Data Bank
Phu	Phusion Polymerase
Prx	Peroxiredoxin
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
roGFP2	<i>Redox sensitive green fluorescent protein 2</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae (Sc)</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SLI	<i>Selection linked integration</i>
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tBOOH	<i>tert</i> -Butyl Hydroperoxid
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
Trx	Thioredoxin
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
x	Mal (Multipliziert mit)
x g	Mal (Multipliziert mit) Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1. Malaria

Malaria ist auch im Jahr 2022 noch immer eine ernstzunehmende Krankheit, die vor allem in ärmeren Regionen einen tödlichen Verlauf nehmen kann. Zwar nahm die Zahl der Todesfälle in den letzten 20 Jahren bei etwa gleichbleibender Anzahl an Infektionen um ca. 30 % ab, dennoch starben im Jahr 2020 weltweit noch immer rund 627 000 Menschen an den Folgen dieser Erkrankung [1].

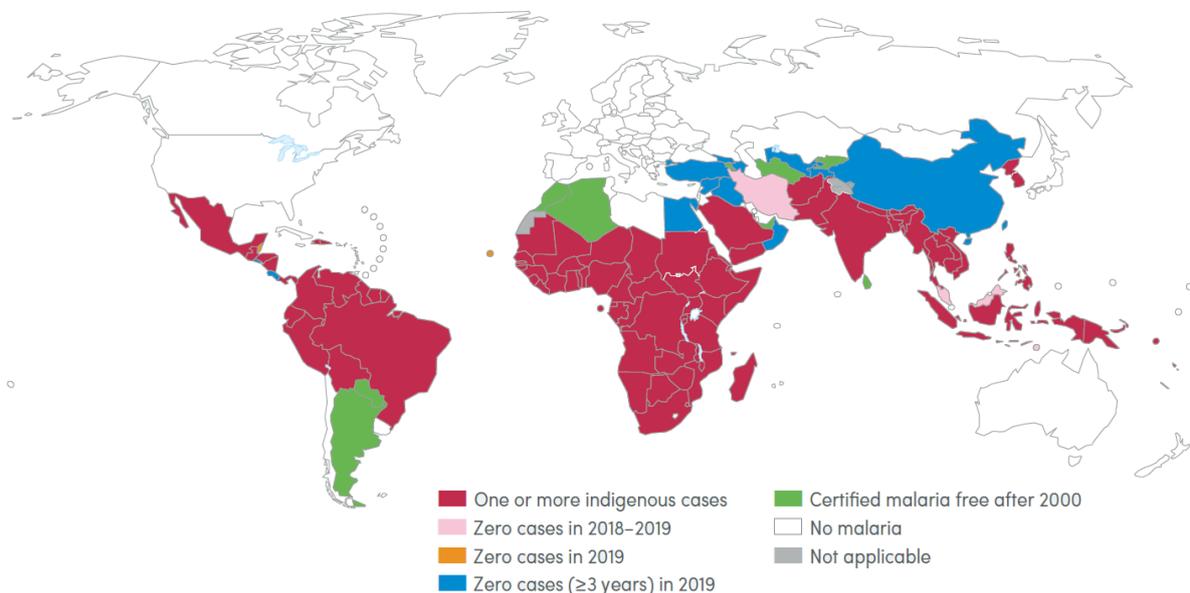


Abbildung 1 Weltkarte der Malariaausbreitung von 2000 bis 2019.

Tropische und subtropische Gebiete, vor allem in Ländern mit schwach ausgeprägter Gesundheitsversorgung, begünstigen die Ausbreitung von Malaria. Quelle: World Malaria Report 2021, WHO

Die verbreitetste Form von Malaria ist die Malaria Tropica, die durch den Parasiten *Plasmodium falciparum* verursacht wird [2]. Eine Übertragung ist nur möglich durch direkten Blutkontakt oder den Stich einer infizierten Anophelesmücke, die dem Erreger als Vektor dient [3]. Hierbei injiziert die Mücke Speichel, der die Blutgerinnung unterbinden soll. Dieser enthält Parasiten im Sporozoiten-Stadium, welche durch die Haut über die Blutbahn in Leberzellen wandern und sich dort vermehren [4]. Nach 1-2 Wochen platzen die Zellen und entlassen Merozoiten in die Blutbahn, wo sie Erythrozyten befallen [5]. Dort durchlaufen sie die drei Stadien des asexuellen Blutkreislaufs, die im Zuge dieser Arbeit untersucht wurden (Abb. 2).

Die ersten etwa 18 h befinden sich die Parasiten im Ringstadium, wonach sie zu Trophozoiten heranwachsen [6]. In dieser Phase beginnt der Erreger Nährstoffe aus der Wirtszelle aufzunehmen, vor allem Proteine [7]. Nach weiteren ca. 16 h geht der Parasit in das Stadium des Schizonten über, in welchem sich der Zellkern im Laufe der Schizogonie zu teilen beginnt, wodurch neue Tochterzellen entstehen. [8]. Ist die Entwicklung des Parasiten nach insgesamt ca. 48 h abgeschlossen, platzt der Erythrozyt und entlässt bis zu 32 Merozoiten in die Blutbahn, wo diese wiederum neue rote Blutkörperchen befallen können [9]. Einige dieser Parasiten entwickeln sich zu Gametozyten [10], welche bei einem erneuten Stich der Anophelesmücke von dieser aufgenommen werden und sich dort sexuell fortpflanzen können [11]. Sticht die Mücke einen weiteren Menschen, beginnt der Kreislauf erneut.

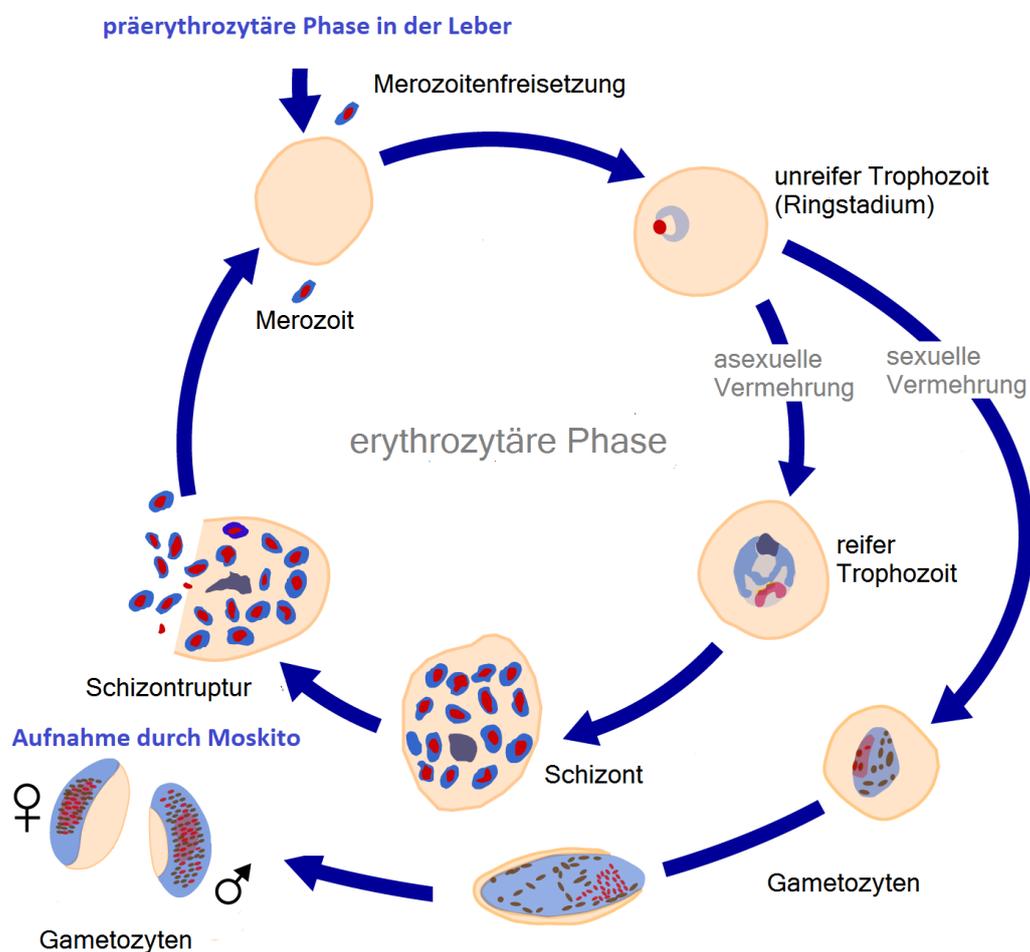


Abbildung 2 Der Blutkreislauf von *Plasmodium falciparum*.

Ein bis zwei Wochen nach der Infektion mit *P. falciparum* brechen die Parasiten aus der Leber aus und geraten in Form von Merozoiten in die Blutbahn, wo sie Erythrozyten befallen. Hier durchlaufen sie den asexuellen Blutkreislauf, angefangen im Ringstadium (18 h), über den Trophozoiten (16 h) bis zum Schizonten (14 h). Nach insgesamt ca. 48 h brechen bis zu 32 Merozoiten aus dem Erythrozyten aus und können neue Blutzellen befallen. Alternativ kann sich ein Ring in einen Gametozyten entwickeln, welcher durch einen Stich der Anophelesmücke von dieser aufgenommen wird und sich dort sexuell fortpflanzen kann. Modifiziert nach CDC, 2020 [12]

Während der Blutstadien nimmt der Parasit Proteine aus der Wirtszelle auf, welche ihm als Nährstoffquelle dienen [7]. Ein Großteil hiervon ist Hämoglobin. Obwohl dieses in Form von Hämozin kristallisiert und somit entgiftet wird, entstehen zytotoxische Nebenprodukte wie freies Häm und H_2O_2 [13]. Um so entstandene Peroxide zu entgiften, besitzt der Erreger eine Maschinerie, bestehend aus Proteinen und Cofaktoren wie z. B. Glutathion, Glutaredoxinen und Peroxiredoxinen, die das Redoxmilieu der Zelle regulieren sollen [14].

1.1. Peroxiredoxine

Peroxiredoxine gehören zu den am meisten produzierten Proteinen in einer Zelle (bis zu über 1 % des zellulären Proteins) und kommen in fast allen Formen des Lebens vor, vom Bakterium bis zum Menschen [15, 16]. Sie besitzen eine Thioredoxin-Faltung mit einem reaktiven Cysteinrest im aktiven Zentrum, dessen Hauptaufgabe die Entgiftung von Hydroperoxiden und Peroxinitrit darstellt [17-20]. Peroxiredoxine werden aufgrund ihrer Primärstruktur in sechs Familien eingeteilt: Prx1/AhpC, Prx6, Prx5, Tpx (Thiol Peroxidase), PrxQ/BCP (*bacterioferritin comigratory protein*) und AhpE [18, 21]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Tertiär- und Quartärstrukturen sagt diese Gruppierung jedoch nur wenig über die Funktion oder Aktivität eines Prx aus. Neben ihrer Rolle als Peroxidase können Peroxiredoxine in gestapelten (Do-)Dekamerstrukturen auch als Chaperone fungieren [22-25] oder eine Funktion in der Signaltransduktion übernehmen [26-31].

Der katalytische Zyklus [17-19, 32, 33] des Peroxiredoxins (Abb. 3) beginnt mit der Peroxidation (1). Das Prx reduziert ein Hydroperoxid ROOH, indem es mit seinem peroxidierenden Cystein C_p angreift, das im aktiven Zentrum als nukleophiles Thiolat vorliegt, wobei es zu einer Sulfensäure (SOH) oxidiert wird und ROH freisetzt. Hiernach durchläuft das Prx eine Konformationsänderung von der vollständig gefalteten (*fully folded*, FF) zu der teilweise entfalteten (*locally unfolded*, LU) Konformation. Die LU Konformation verringert die Affinität des Prx zu Peroxiden und kann die Quartärstruktur von höheren Prx-Oligomeren beeinflussen [18].

Zur Auflösung (*resolving step*) (2) muss das als Sulfensäure vorliegende C_p von einem anderen Thiol reduziert werden. Es gibt drei Arten von Mechanismen:

a) Typisches 2-Cys-Prx: Hierbei liegt das Protein als Homodimer vor. Die Reduktion des C_p

erfolgt durch ein am C-Terminus befindliches weiteres Cystein C_r (*resolving cystein*, auflösendes Cystein) der anderen Prx-Untereinheit, indem eine Disulfidbrücke ausgebildet wird.

b) Atypisches 2-Cys-Prx: Bei dieser Variante erfolgt die Reduktion des C_p durch ein C_r , das im selben Protein liegt.

c) 1-Cys-Prx: Peroxiredoxine dieser Reaktionsart besitzen nur ein reaktives Cystein C_p und kein C_r . Sie müssen also durch externe Substrate wie Glutathion (GSH) reduziert werden.

Das so entstandene Disulfid muss anschließend zur Regeneration (3) weiter von externen Thiolen wie GSH, Grx oder Trx reduziert werden. Liegt das C_p erneut in reduzierter Form vor, ändert das Protein seine Konformation wieder von LU zu FF und kann den Zyklus erneut durchlaufen.

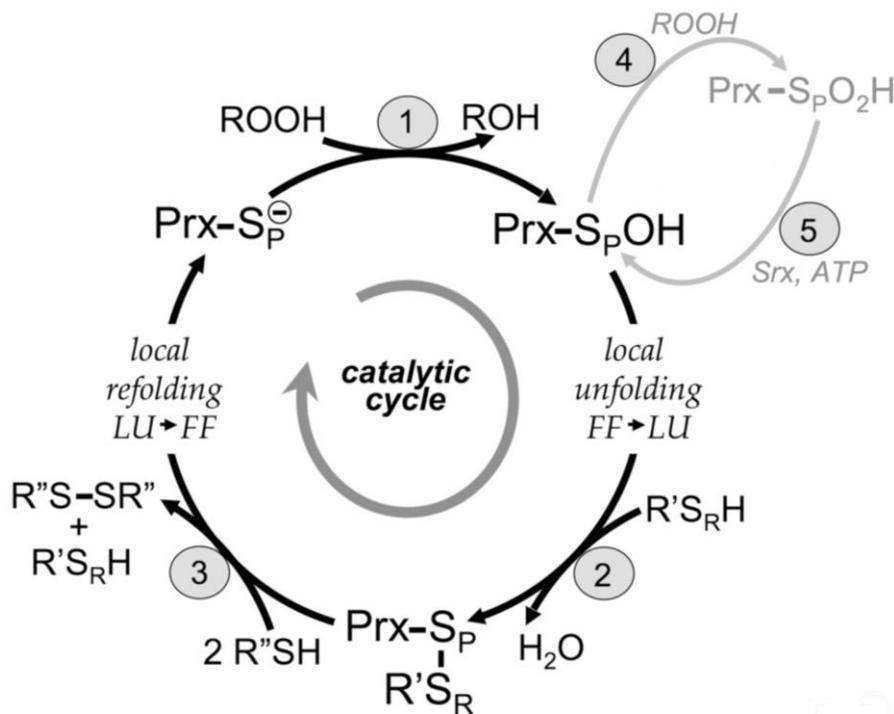


Abbildung 3 Der katalytische Zyklus eines Peroxiredoxins.

Die Reduktion eines Hydroperoxidsubstrats erfolgt in drei wichtigen Schritten, (1) Peroxidation, (2) Auflösung, (3) Regeneration. Nach der Peroxidation ändert das Prx seine Konformation von FF zu LU. Dieser Schritt ist notwendig für die Auflösung im nächsten Schritt. Schritt (4) und (5) beschreiben die Hyperoxidation und Inaktivierung eines Prx. Am Ende des Zyklus muss das Prx wieder von der LU zu der FF Konformation wechseln, um sein aktives Zentrum und somit seine Affinität zu Hydroperoxidsubstraten wiederherzustellen. Quelle: Hall *et al.* 2011

Bei einer hohen lokalen Peroxidkonzentration kann das Prx, nachdem es zu einer Sulfensäure oxidiert wurde, mit einem weiteren Peroxid reagieren, noch bevor es eine LU Konformation einnimmt. Hierdurch wird das C_p zu einer Sulfinensäure (SO_2H) hyperoxidiert [34]. Diese Spezies

kann nur in einer ATP-abhängigen Reaktion mit Sulfiredoxin wieder zu einer Sulfensäure reduziert werden. Wird die Sulfinsäure zuvor ein drittes Mal oxidiert, zu einer Sulfonsäure (SO_3H , nicht in der Abbildung), ist das Enzym dauerhaft inaktiviert. Nach der Theorie des *Floodgate*-Modells scheinen einige Prx diese Inaktivierung zu bevorzugen und sollen somit eine regulatorische Rolle in der Signaltransduktion in der Zelle einnehmen [35-37]. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass eine Signaltransduktion durch Peroxiredoxine über gemischte Disulfide mit ihren Substraten stattfindet (*Disulfide-Relay*-Modell) [38]. Beispiele für solche Interaktionen sind Ahp1 und Cad1 [28], Prx1/2 aus Säugerzellen und Ask1 [29], Prx1 aus Hefe und Trx3 [39] und Prx2 aus Säugerzellen und STAT3 [30].

Obwohl der katalytische Zyklus gut erforscht ist, sind noch nicht alle Reduktionspartner von Peroxiredoxinen bekannt. In dieser Arbeit wird das Peroxiredoxin 6 aus *Plasmodium falciparum* (PfPrx6) genauer untersucht, indem sein Reduktionspartner identifiziert werden soll. Es gehört zur Prx6 Familie, welche der Prx1 Familie sehr ähnlich ist, sich jedoch durch ihren langen C-terminalen Schwanz und einen konservierten Histidin-Rest im aktiven Zentrum von ihnen unterscheidet [17, 18, 40-42]. Ausgenommen von wenigen Beispielen [41, 43, 44] ist PfPrx6, wie die meisten Homologe seiner Familie, ein 1-Cys-Prx [17, 18, 45-48]. Ebenfalls ähnlich den meisten Proteinen der Prx6-Familie, zeigt auch PfPrx6 nur eine sehr geringe Aktivität in klassischen *Steady-State Assays* mit einer Vielzahl an Hydroperoxiden und Reduktionsmitteln (z. B. Trx, Grx, GSH) [41, 43, 45, 48, 49].

1.2. Glutaredoxine

Glutaredoxine sind ebenfalls hoch konservierte Proteine, die Homologe in fast allen Spezies besitzen [32]. Auch Glutaredoxine besitzen die Thioredoxin-Faltung und gehören somit zu der Thioredoxin Superfamilie [32, 50-53]. Aufgrund ihrer Aktivität und ihren Aufgaben in der Zelle lassen sich die meisten Glutaredoxine in zwei Gruppen aufteilen. Zu den Klasse 1 Glutaredoxinen gehören alle Grx, die katalytisch aktiv sind [54]. Durch ihre hohe Affinität und Spezifität für das Tripeptid Glutathion ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$), was ihnen ihren Namen gibt, ist ihre Hauptaufgabe die Deglutathionylierung von Proteinen. Aber auch die Reduktion von nicht-Glutathion Protein-Disulfiden kann von ihnen katalysiert werden, wobei GSH in beiden Fällen als Elektronendonator dient [32, 52, 54-57]. Klasse 2 Glutaredoxine sind redoxkatalytisch nicht

aktiv, bzw. es war noch nicht möglich, die katalytische Aktivität *in vitro* nachzuweisen [58-62]. Ihre Aufgabe ist die Biosynthese, Verteilung und Regulation von Eisen-Schwefel-Clustern, wobei sie GSH als Ligand benötigen [63, 64]. Zusätzlich spielen Glutaredoxine durch ihre physiologische Reduktion der Ribonukleotid Reduktase eine Rolle bei der DNA-Synthese [57, 65-68], haben Einfluss auf Prozesse, die die Apoptose regulieren [69-72] und könnten sogar medizinische Anwendungen finden beim Behandeln von Diabetes, Parkinson, Krebs oder anderen Krankheiten [51, 52, 73].

Klasse 1 Glutaredoxine unterteilen sich weiterhin noch einmal in Proteine mit Monothiolmechanismus, bei denen im aktiven Zentrum lediglich ein einzelnes Cystein in einem CxxS-Motiv liegt, und mit Dithiolmechanismus, welche ein zweites Cystein im aktiven Zentrum in einem CxxC-Motiv besitzen [32, 54, 74-78]. Während glutathionylierte Disulfide nach dem Monothiolmechanismus reduziert werden können, ist die Notwendigkeit des zweiten Cysteinrestes für die Reduktion von anderen Disulfiden noch umstritten. Obwohl die Reduktion der Ribonukleotidreduktase in *E. coli* nur nach einem Dithiolmechanismus erfolgen kann [79, 80], sind Glutaredoxine aus Säugerzellen *in vitro* in der Lage, die Ribonukleotidreduktase nach einem Monothiolmechanismus zu reduzieren [68]. Auch in Hefe ist ein Dithiol-Grx nicht essenziell, solange die Zelle ein Monothiol-Grx besitzt [81].

1.2.1. Glutaredoxine – der Reaktionsmechanismus

Es gibt zwei Arten von Substraten, die mit einem aktiven Grx reagieren können: Glutathionylierte Disulfide oder Moleküle mit nicht-Glutathion Disulfidbrücken.

Bei der ersten Art reagieren Grx nach einem Ping-Pong Mechanismus (Abb. 4), nach welchem das Grx mit zwei Substraten reagiert, die jeweils ein eigenes Interaktionszentrum im Grx besitzen und somit nie direkt miteinander interagieren [54]. Zunächst fügt sich im Ping-Schritt, der oxidativen Halbreaktion, das glutathionylierte Substrat RSSG in das erste Interaktionszentrum ein, die *Glutathion-Scaffold-Site* („Glutathion-Gerüst-Zentrum“). Hierbei wird das Glutathion auf das Grx übertragen und RSH freigesetzt. Zur Reduktion des Grx im Pong-Schritt, der reduktiven Halbreaktion, interagiert das zweite Zentrum des Grx, die *Glutathion-Activator-Site* („Glutathion-Aktivierungs-Zentrum“), mit GSH, regeneriert damit das Grx zu seinem reduzierten Zustand und setzt GSSG frei [52, 82, 83].

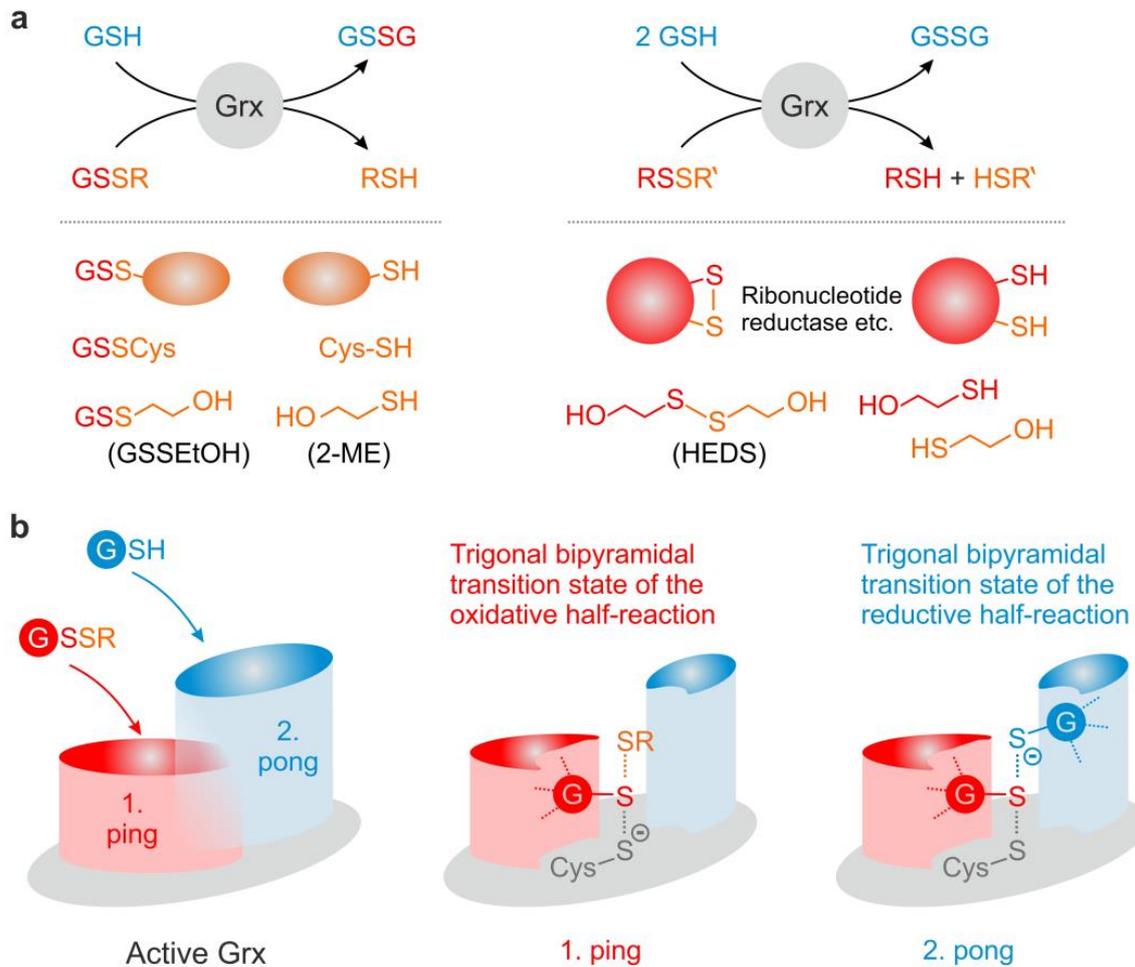


Abbildung 4 Der Reaktionsmechanismus eines Klasse 1 Glutaredoxins nach dem Ping-Pong-Prinzip.

a Glutaredoxine nutzen reduziertes Glutathion (GSH) als Elektronendonator zur Reduktion von Glutathion-Disulfid-Substraten (GSSR) und nicht-Glutathion-Disulfid-Substraten (RSSR'). Als Modellssubstrate werden hierfür oft GSSCys oder HEDS genutzt. **b** Die Reduktion eines GSSR-Substrates ist in eine oxidative (Ping) und reduktive Halbreaktion (Pong) separiert. Die Glutathioneinheit des oxidierten Substrates und das als Elektronendonator dienende GSH haben getrennte Interaktionszentren. Quelle: Liedgens *et al.* 2020

Soll ein nicht-Glutathion Disulfid reduziert werden, so kann dies von einem Dithiol-Grx vorgenommen werden [51, 57, 82, 84, 85]. Hierbei bildet das Grx zunächst ein intermolekulares Disulfid mit seinem Substrat, wonach ein weiteres Elektron zur Auflösung dieser Verbindung vom Grx auf sein Substrat übertragen wird [32]. Das so oxidierte Grx wird anschließend durch zwei Moleküle GSH regeneriert, wobei GSSG entsteht.

Aktuelle Studien in Hefezellen zeigen allerdings, dass die Zelle kein Dithiol-Grx benötigt um überleben zu können [81]. Dies lässt vermuten, dass auch Monothiol-Grx in der Lage sind, nicht-Glutathion Disulfide zu reduzieren, wie es aufgrund von *in vitro* Studien bereits vermutet wurde [83, 86]. Hierfür wurden folgende Mechanismen vorgeschlagen (Abb. 5):

a) Grx greift zuerst an: Das Thiolat des aktiven Cystein im Grx greift das Disulfid direkt an,

wobei sich ein Dimer zwischen Substrat und Grx bildet. GSH wird für diese initiale Reaktion nicht benötigt und greift erst später an, um die intermolekulare Disulfidbrücke zu lösen und das Grx zu glutathionylieren. Ein zweites GSH regeneriert das Grx unter Freisetzung von GSSG.

- b) GSH greift zuerst an: GSH liegt im millimolaren Bereich in der Zelle vor und reagiert daher, thermodynamisch getrieben, Grx-unabhängig mit einem oxidierten Substrat. Das Grx greift somit erst das glutathionylierte Substrat an, wonach eine normale Deglutathionylierungsreaktion, wie zuvor beschrieben, stattfindet.
- c) Grx aktiviert GSH: Reicht der enorme GSH-Überschuss nicht aus, um das Substrat nicht-enzymatisch zu glutathionylieren, besagt dieses Modell, dass das Grx ein Molekül GSH aktiviert und so eine effizientere Glutathionylierung eines Disulfids stattfinden kann. Hat das aktivierte GS⁻ erst das Substrat reduziert, folgt erneut eine Deglutathionylierung.

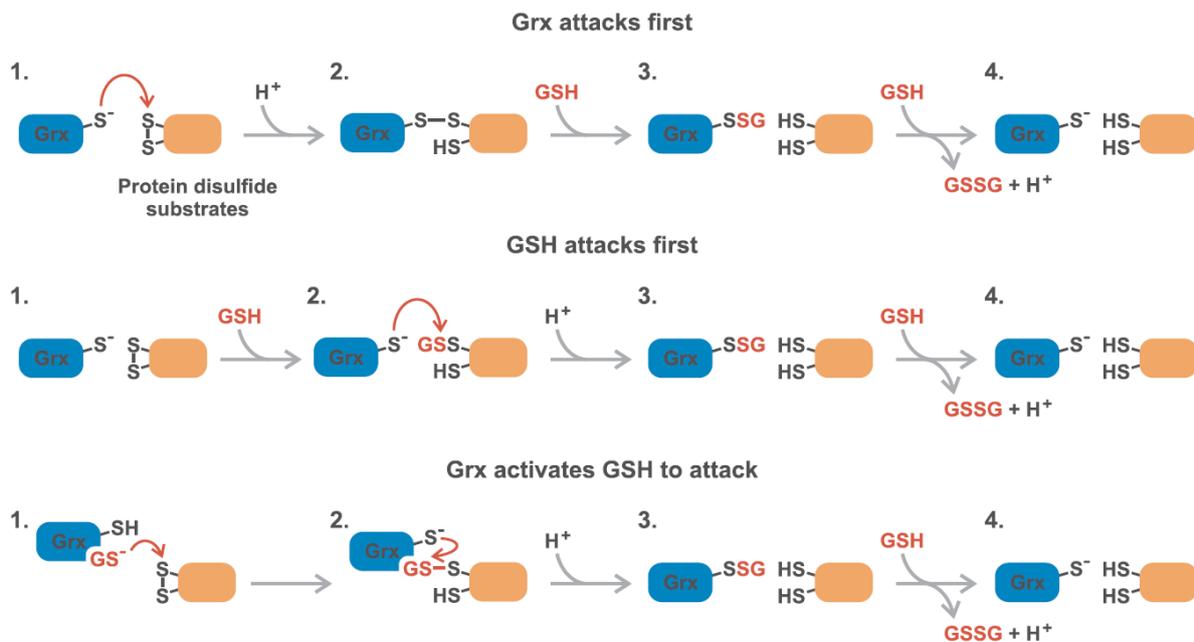


Abbildung 5 Plausible Mechanismen zur Reduktion eines Protein Disulfids durch ein Monothiol-Glutaredoxin. **a** Glutaredoxin greift zuerst an. Das nukleophile aktive Zentrum des Grx greift das Substrat an und bildet ein intermolekulares Disulfid. Ein Molekül GSH löst diese Bindung auf und glutathionyliert das Grx. Ein weiteres Molekül GSH wird benötigt, um das Grx wieder zu reduzieren. **b** GSH greift zuerst an. GSH reagiert in einem nicht-katalytischen Schritt mit dem Substrat und glutathionyliert dieses. Grx kann diese Verbindung auflösen, indem es als Elektronendonator für das Substrat dient und sich selbst glutathionyliert. Ein weiteres Molekül GSH wird benötigt, um das Grx wieder zu reduzieren. **c** Grx aktiviert GSH. Das Grx deprotoniert GSH und erzeugt somit ein reaktives GS⁻-Anion. Diese Spezies kann ein Substrat effizienter angreifen und glutathionylieren. Hiernach erfolgt eine Deglutathionylierungsreaktion durch ein Monothiol-Glutaredoxin wie zuvor beschrieben.

Quelle: Zimmermann *et al.* 2020 [81]

Zum Simulieren der beiden Substratvarianten werden oft GSSCys und HEDS

(bis(2-Hydroxyethyl)-Disulfid), welche aufgrund ihrer geringen Größe nicht immer physiologischen Proteinsubstraten entsprechen, verwendet, gekoppelt an ein GSH-GR-NADPH-System [75, 86]. Nachdem Grx eines dieser Substrate reduziert hat, wird es durch GSH regeneriert, wodurch GSSG entsteht. Die Glutathion-Reduktase (GR) reduziert das GSSG, wobei ihr NADPH als Elektronendonator dient. Die Oxidation von NADPH zu NADP^+ kann spektroskopisch aufgenommen und ausgewertet werden [32, 54, 83, 86]. Einen Nachteil dieser Methode stellt die Kopplung von oxidativer und reduktiver Halbreaktion des Grx dar, wodurch die Einzelschritte nicht isoliert gemessen werden können. In dieser Arbeit soll durch die Verwendung von roGFP2 als Elektronendonator nicht nur die Reaktion mit einem größeren Proteinsubstrat untersucht werden, sondern die oxidative Halbreaktion des Grx entkoppelt direkt an der Fluoreszenz dieses Substrats gemessen werden (siehe Abschnitt 1.3.).

1.2.2. Glutaredoxine – aktiv oder inaktiv?

Doch was macht ein Glutaredoxin katalytisch aktiv oder inaktiv? Strukturell sind sich beide Klassen sehr ähnlich, sodass davon auszugehen ist, dass sie evolutionär einen gemeinsamen Vorfahren haben [53]. Beim Vergleich der Primärsequenzen fallen vier Abschnitte auf, die sich besonders zwischen den beiden Grx-Klassen unterscheiden (Abb. 6):

- i) Das aktive Zentrum der Grx. Gemein haben alle Grx das aktive Cystein C_a , an dem entweder ein Eisen-Schwefel-Cluster binden oder eine Redoxreaktion mit einem anderen Cystein stattfinden kann. Den meisten aktiven Grx folgt hier ein PY Motiv und im Falle eines Dithiol-Grx ein zweites Cystein, das für die Aktivität jedoch meist nicht essenziell ist [74, 75]. Das Prolin verhindert hier die Bindung von Eisen-Schwefel-Clustern [75, 76, 87-89]. In Klasse 2 Grx ist dieses CPYC-Motiv durch ein CGFS ersetzt, wodurch Eisen-Schwefel-Cluster besser an das aktive Zentrum binden können. Die Hydroxygruppe des Tyrosins aus dem CPYC-Motiv fehlt im CGFS-Motiv inaktiver Glutaredoxine. Die Vermutung, dass diese Gruppe eine Rolle in der *Glutathion-Activator-Site* spielt, wurde jedoch widerlegt [83].
- ii) Helix 3 unterscheidet sich allgemein stark zwischen den beiden Grx-Klassen [32, 82, 90, 91]. Ein konservierter Glutamin-Rest in Klasse 1 Glutaredoxinen ist in Klasse 2 Glutaredoxinen durch ein Arginin ersetzt. Da in dieser Helix viele Reste aus der Proteinoberfläche herausragen, wird vermutet, dass sie eine Rolle für die *Glutathion-Activator-Site* spielt [83].
- iii) In der Schleife zwischen Helix 3 und Helix 4 befindet sich in inaktiven Grx ein hoch-

konserviertes WP Motiv [32, 56, 59, 75, 90-93]. Im Gegensatz zu diesen hydrophoben Resten befinden sich in den aktiven Varianten basische und polare Aminosäuren. Diese Schleife ragt über das aktive Zentrum und könnte somit die Bindung von GSH-Molekülen beeinflussen [94].

iv) N-terminal des aktiven Zentrums besitzen inaktive Grx eine aus fünf Aminosäuren bestehende Schleife, die in keinem aktiven Grx zu finden ist [32, 59, 90, 93]. Aufgrund der großen sterischen Hinderung und der Nähe zum aktiven Cystein, sowie der starken Konformationsänderung dieser Region von inaktiven Grx nach der Bindung von Fe-S-Clustern, wird vermutet, dass diese Schleife eine große Rolle spielen kann [90, 93, 95].

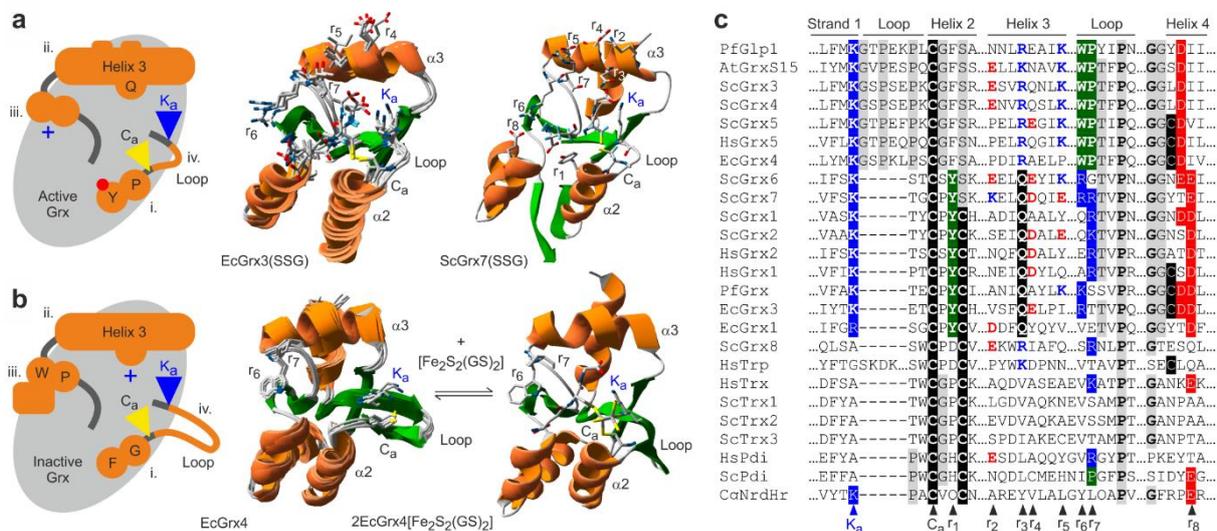


Abbildung 6 Strukturelle Unterschiede zwischen enzymatisch aktiven und inaktiven Glutaredoxinen.

a Struktur eines enzymatisch aktiven Grx. Eine schematische Darstellung zeigt vier (i-iv) auffällige Unterschiede zwischen den beiden Grx Klassen neben NMR-Strukturen der Klasse 1 EcGrx3 (C14S Mutante, PDB Eintrag 3GRX) und ScGrx7 in glutathioniertem Zustand, von links nach rechts. Das konservierte aktive Cystein C_a und Lysin K_a , sowie das Glutathion können mehrere Positionen einnehmen. **b** Struktur eines enzymatisch inaktiven Grx. Eine schematische Darstellung zeigt vier (i-iv) auffällige Unterschiede zwischen den beiden Grx Klassen neben der NMR-Struktur des Klasse 2 EcGrx4 (PDB Eintrag 1YKA) als Apoprotein und der Kristallstruktur von EcGrx4 mit einem gebundenen Eisen-Schwefel-Cluster (PDB Eintrag 2WCI, eine EcGrx4 Untereinheit und ein GS-Ligand wurden zur Übersicht entfernt) von links nach rechts. **c** Sequenzvergleich verschiedener Glutaredoxine und anderer Proteine der Thioredoxin Superfamilie von *A. thaliana* (At), *S. cerevisiae* (Sc), *Homo sapiens* (Hs), *E. coli* (Ec), *P. falciparum* (Pf), and *C. glutamicum* (Cg). Reste r_{1-8} sind als mögliche Glutathion-Interaktionszentren hervorgehoben. Quelle: Liedgens *et al.* 2020 [96]

Punkt i und ii wurden bereits von Linda Liedgens und Patricia Begas untersucht und die Ergebnisse in Begas *et al.* [83] und Liedgens *et al.* [96] veröffentlicht.

i) Eine Mutation Y110F in ScGrx7 zeigte keine ausgeprägte Änderung der Aktivität des Enzyms in einem *Steady-State Assay* mit GSSCys als Substrat, womit dieser Rest vermutlich

nicht für die Inaktivität von Klasse 2 Grx verantwortlich ist. Er könnte dennoch z. B. für posttranslationale Modifikationen oder die Interaktion mit spezifischen physiologischen Substraten wichtig sein.

- ii) Es wurde gezeigt, dass Glu144 und Asp147 in Helix 3 einen geringen Effekt auf die *Glutathion-Scaffold-Site* haben. Eine Mutation von Glu144 zu Alanin zeigte eine kleine Verlangsamung der oxidativen Halbreaktion von ca. 20 %. Ersetzt man die Reste Glu144 und Asp147 allerdings durch Lysin und kehrt damit ihre Ladung um, ist eine starke Beschleunigung der reduktiven Halbreaktion zu erkennen, was eine Beteiligung an der *Glutathion-Activator-Site* nahelegt. Da evolutionär hier die langsamere Variante selektioniert wurde, wird vermutet, dass Glu und Asp für eine spezifische Interaktion mit einem physiologischen Substrat wichtig sein können.

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden sowohl *in vitro* durch GSSCys- und HEDS-Tests erlangt, aber auch durch eine parallel durchgeführte *in cellulo* Messreihe mit roGFP2-Grx-Fusionskonstrukten [96]. Diese können schnelle Screeningalternativen zu langwierigen *in vitro* Messungen darstellen, weshalb eine genaue Charakterisierung der Interaktion von roGFP2 und Grx von großer Wichtigkeit ist und in dieser Arbeit im Detail untersucht wird.

1.3. Das redox-sensitive grün fluoreszierende Protein (roGFP2)

1.3.1. Der Fluoreszenzmechanismus von GFP und die Entwicklung von roGFP2

GFP wurde erstmals in der Qualle *Aequorea victoria* identifiziert [97]. Es ist ein 238 Aminosäuren langes Protein, das mit 11 β -Strängen ein β -Fass formt, in dessen Innerem eine α -Helix liegt [98, 99]. Wird es mit sichtbarem Licht angeregt, leuchtet es in einem kräftigen Grün. Hierfür ist das Chromophor im Inneren des Proteins verantwortlich, bestehend aus den drei Aminosäuren S65/Y66/G67 (Abb. 7), die zu einem konjugierten π -Elektronensystem zyklisieren, das in der Lage ist Licht zu absorbieren und zu emittieren [100]. Es besitzt zwei Anregungsmaxima, abhängig von der Protonierung des Tyrosin-Phenols. Das erste Maximum liegt bei 395 nm und entspricht der protonierten A-Form, das zweite Maximum bei 475 nm und repräsentiert die deprotonierte B-Form [101, 102]. Das emittierte Licht hat in beiden Fällen eine Wellenlänge von 509 nm. Aufrecht erhalten wird das Gleichgewicht dieser Protonierungszustände durch eine Protonen-Transfer-Kette, gebildet durch ein Molekül H₂O

Anwendung und Weiterentwicklung des GFP wurde Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien 2008 der Nobelpreis für Chemie verliehen.

1.3.2. roGFP2 als fusioniertes Reporterprotein für intrazelluläre Redoxforschung

Da roGFP2 alleine keine spezifischen Substrate zur Oxidation besitzt, wurden Fusionskonstrukte zwischen roGFP2 und Redoxproteinen hergestellt, um Tests in zellulärer Umgebung nach der Zugabe verschiedener Oxidationsmittel durchzuführen [123-126]. Zu den ersten gehörten die Konstrukte Orp1-roGFP2 [127, 128] und Grx1-roGFP2 [115]. Orp1 (GPx3) ist eine Thiol Peroxidase aus *Saccharomyces cerevisiae*, die physiologisch den Übertrag der Oxidation von H_2O_2 auf den Transkriptionsfaktor Yap1 katalysiert [129]. Im Falle des Fusionskonstrukts überträgt das Orp1 die Oxidation jedoch auf das roGFP2, womit effektiv Änderungen lokaler Wasserstoffperoxidkonzentrationen bestimmt werden konnten. Eine Fusion von roGFP2 mit verschiedenen Grx-Varianten hingegen ermöglichte eine lokale Abschätzung des Redoxpotentials E_{GSH} und konnte sowohl in Prokaryoten wie *E. coli*, als auch in Eukaryoten wie *S. cerevisiae* oder *P. falciparum* angewendet werden [130-132]. Neuere Publikationen zeigen sogar die Möglichkeit, die Aktivität von Grx- und Prx-Varianten und -Mutanten durch die Fusion mit roGFP2 zu screenen und somit Informationen über Struktur-Funktions-Zusammenhänge zu gewinnen [96, 126, 133]. Doch wie bei vielen *in cellulo* Messungen können hier zahlreiche unberechenbare Nebenreaktionen das Ergebnis verändern, sodass keine zuverlässigen quantitativen Aussagen ohne *in vitro* Kontrollen getroffen werden können [96, 126, 133]. Zudem ist der genaue Mechanismus des Übertrags der Oxidation von Fusionspartnern auf das roGFP2 noch nicht bekannt, sodass Reaktionsgleichgewichte, Nebenreaktionen oder sogar geschwindigkeitslimitierende Schritte der Übertragung das Ergebnis verfälschen können. Der Mechanismus der Reaktion von roGFP2 und Glutaredoxinen sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.4. Ziel der Arbeit

Obwohl die oxidative Halbreaktion von PfPrx6 inzwischen gut untersucht ist [49], ist noch nicht bekannt, ob es eine physiologische Reduktion gibt und wenn ja, durch welches Protein diese vorgenommen wird. Hierfür sollte ein *GFP-HIS₈*-getaggttes *PFPRX6-SLI*-Konstrukt in das Genom

des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* integriert werden und durch einen *Pulldown* versucht werden, einen Interaktionspartner zu identifizieren.

Neben Peroxiredoxinen sind auch Glutaredoxine ein wichtiger Bestandteil zur Erhaltung des Redoxmilieus einer Zelle. Doch bleibt noch immer ungeklärt, warum strukturell sehr ähnliche Grx-Varianten verschiedene Aktivitäten besitzen und unterschiedliche Aufgaben in der Zelle erfüllen. Durch gezielte Mutationen im aktiven ScGrx7 und im inaktiven HsGrx5, sollte das aktive Grx inaktiviert und das inaktive Grx aktiviert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Funktion des Grx durch einen kleinen Aminosäureabschnitt bestimmt wird, oder eine Kombination aus verschiedensten Schlüsselstellen zu einer Aktivitätsumkehr führen kann.

Neben den hier vorgenommenen *in vitro* Messungen wurden parallel von der Arbeitsgruppe von Bruce Morgan die selben Mutationen durch roGFP2-Grx-Fusionskonstrukte in Hefezellen untersucht. Da der Mechanismus des Übertrags von Oxidationsäquivalenten von Grx auf roGFP2 noch nicht genau untersucht wurde, sollte dieser in der vorliegenden Arbeit anhand der Reaktion von PfGrx mit roGFP2 aufgeklärt werden. Hierfür wurden Monothiol-Variante PfGrx^{C32/88S} und Dithiol-Variante PfGrx^{C88S}, sowie roGFP2^{WT}, roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} genutzt.

Zusätzlich eignet sich roGFP2 als Protein-Disulfidsubstrat zur Untersuchung der oxidativen Halbreaktion von Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxinen. Weiterhin sollte geklärt werden, welcher der drei in Abbildung 5 beschriebenen hypothetischen Reduktionswege der physiologisch relevante ist.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Geräte

Tabelle 1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Kern
Autoklav (VX-95)	Systemec
Digitale Inkubatoren (INCU-Line)	VWR
DNA-Elektrophorese-Gerät	Biostep
Gel- und Blot-Dokumentiersystem (Fusion SL)	Vilber Lourmat
Heizblock (Thermomixer R/C)	Eppendorf
Inkubationsschüttler (Innova 44/44R)	New Brunswick
Inkubationsschüttler (MaxQ 4450)	Thermo Scientific
Laminar flow Sterilwerkbank (MSC-Adcantage)	Thermo Scientific
Laminar flow Sterilwerkbank für <i>P. falciparum</i> Safe 2000	Thermo Scientific
Magnetrührer	Heidolph
Metallheizblock MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Mikrozentrifuge (Mikro 220R, Mikro 200)	Hettich
Mikrozentrifuge (SU1550)	Sunlab
Mikroplattenleser (CLARIOstar)	BMG Labtech
Mikrowelle	Severin
Multifuge 1 S-R	Heraeus
NanoDrop 1000 Spectrometer	Thermo Scientific
Netzteil (PowerPac Basic)	Bio-Rad
PCR-Cycler (Nexus Gradient)	Eppendorf
Peristaltische Pumpe P-1	GE-Healthcare
pH-Meter (Basic Meter PB-11)	Sartorius
pH-Elektrode (Blueline 56 Electrode)	SI Analytics
Pipetten (Pipeteman P10-1000)	Gilson
Pipettencontroller (Accu-jet pro)	Brand

Rocking Platform (Duomax 1030)	Heidolph
Rotlichtlampe	Electric Petra
SDS-PAGE-System (Mini-PROTEAN Tetra Cell)	Bio-Rad
<i>Stopped-flow</i> Spektrofluorometer SX-20	Applied Photophysics
Tragbares Spektrophotometer (Ultrospec 10)	Amersham Biosciences
Transfektionsgerät Nucleofector II/2b	Lonza
Ultrasonic laboratory homogenizer (Sonopuls HD 2070)	Bandelin electronic
UV-Tisch zur Agarosegeldokumentation	Fröbel
UV/Vis-Photometer (V-650 spectrophotometer)	JASCO
Vortex-Mixer	Heidolph Instruments
Wasserbad (F12-ED)	JULABO
Zentrifuge (J-6B, Rotor JA-10, JA-20)	Beckmann
Zentrifuge Rotina 380 R	Hettich

2.1.2. Verbrauchsgegenstände

Tabelle 2 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Quelle
96-Well-Platten (schwarz)	Greiner bio-one
Einmal-Küvetten	Sarstedt
Hochdruck Stickstoffflasche (99,999 %)	Alphagaz
Kanüle (100 Sterican)	Braun
Parafilm	Sigma Aldrich
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt
PD-10 Säule	GE-Healthcare
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Steinbrenner
Poly-Prep Chromatographie Säulen	Bio-Rad
PVDF-Membran	Merck
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Greiner bio-one
Skalpell	Braun

Serologische Pipetten (1, 5, 10 und 25 ml)	Sarstedt
Spritze (Injekt, 2 ml, Luer-Lock)	Braun
Sterile Spritzen	BD Plastipak
Sterile Spritzenfilter (0,2 µM)	Millipore
Whatman Papier	GE Healthcare

Tabelle 3 Kits

Kit	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAprep Midiprep Kit	QIAGEN
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2.1.3. Chemikalien

Tabelle 4 Chemikalien

Chemikalie	Quelle
Aceton	Honeywell
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 37,5:1 (30 % w/v)	Serva
Adenin	Sigma Aldrich
Agar	Sigma Aldrich
Agarose	Serva
AlbuMAXII	Gibco
Ammoniumsulfat (APS)	Sigma Aldrich
Ampicillin	AppliChem
Beta-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Blasticidin S	Invivogen
Bradford Reagenz	Bio-Rad
Bromphenol Blau	Waldeck
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva
Calciumchlorid Dihydrat	Merck
Chloramphenicol	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue G 250	AppliChem

D-Sorbitol	Sigma Aldrich
Diamid	Sigma Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	VWR
DNA Ladder (100bp, 1kb)	New England Biolabs
DNase I	Roche
DMSO	Sigma Aldrich
dNTPs	Thermo Scientific
DTPA	Sigma Aldrich
DTT	Sigma Aldrich
EDTA	Sigma Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol (absolut)	VWR
Gel Ladepuffer, Lila 6x	New England Biolabs
Gentamycin	Gibco
Glukose-Monohydrat (D-Glukose)	Merck
Glycerol	AppliChem
GSH	Sigma Aldrich
GSSG	Sigma Aldrich
GSNO	Sigma Aldrich
HCl	VWR
Hypoxanthine	c.c.pro
Imidazol	Merck
IPTG	Serva
Isopropanol	Sigma Aldrich
Kanamycin	AppliChem
LB-Agar	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
Lysozym	Serva
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Manganchlorid-Dihydrat	Merck
Midori Green Advance	Nippon Genetics
Milchpulver	Carl Roth

mmPEG	Iris Biotech
MOPS (3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure)	Gerbu Biotechnik
Natriumdihydrogenphosphat-Monophosphat	Merck
Natriumchlorid	Fisher Chemical
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
PEG 3350	Sigma Aldrich
PonceauS	Serva
Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Proteinase K	Roche
RNAse A	Sigma Aldrich
RPMI 1640 (HEPES, Glutamin)	Gibco
Rubidiumchlorid	AppliChem
Saponin	Sigma Aldrich
SDS	Serva
TEMED	Serva
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	Sigma Aldrich
Tris	Carl Roth
Triton X-100	Merck
Tween-20	Sigma Aldrich
UltraPure Salmon Sperm DNA Lösung	Invitrogen
Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich, Merck
WR99210	Jacobus Pharmaceutical

2.1.4. Programme

Tabelle 5 Programme

Programm	Quelle
CorelDraw X7	Corel Corporation
ExpASy	https://www.expasy.org/
JustBIO	http://www.justbio.com
MARS	BMG Labtech

pQE30/ <i>SCGRX7^{WP}</i>	Expression von <i>SCGRX7^{WP}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE30/ <i>SCGRX7^{loop}</i>	Expression von <i>SCGRX7^{loop}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE30/ <i>SCGRX7^{WP+loop}</i>	Expression von <i>SCGRX7^{WP+loop}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE30/ <i>HSGRX5^{WT}</i>	Expression von <i>HSGRX5^{WT}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE30/ <i>HSGRX5^{RR}</i>	Expression von <i>HSGRX5^{RR}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE30/ <i>HSGRX5^{loop}</i>	Expression von <i>HSGRX5^{loop}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE30/ <i>HSGRX5^{RR+loop}</i>	Expression von <i>HSGRX5^{RR+loop}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pET28b/ <i>ROGFP2^{WT}</i>	Expression von <i>ROGFP2^{WT}</i> in <i>E. coli</i> , 3' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pET28b/ <i>ROGFP2^{C151S}</i>	Expression von <i>ROGFP2^{C151S}</i> in <i>E. coli</i> , 3' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pET28b/ <i>ROGFP2^{C208S}</i>	Expression von <i>ROGFP2^{C208S}</i> in <i>E. coli</i> , 3' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pQE30/ <i>PFGRX^{C88S}</i>	Expression von <i>PFGRX^{C88S}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Djuika <i>et al.</i> 2013
pQE30/ <i>PFGRX^{C32/88S}</i>	Expression von <i>PFGRX^{C32/88S}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Djuika <i>et al.</i> 2013
pET45b/ <i>ROGFP2^{WT}-PFGRX^{WT}</i>	Expression von <i>ROGFP2^{WT}-PFGRX^{WT}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pET45b/ <i>ROGFP2^{WT}-PFGRX^{C88S}</i>	Expression von <i>ROGFP2^{WT}-PFGRX^{C88S}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pET45b/ <i>ROGFP2^{WT}-PFGRX^{C32/88S}</i>	Expression von <i>ROGFP2^{WT}-PFGRX^{C32/88S}</i> in <i>E. coli</i> , 5' HIS ₆ -Tag	Diese Arbeit
pSLI	Template für pSLI-Studien	Birnbaum <i>et al.</i> 2017
pSLI/ <i>PFPRX6-HIS₈</i>	Genomisches Tagging von PfPrx6	Diese Arbeit
pSLI/ <i>PFPRX6-HIS₈-GFP</i>	Genomisches Tagging von PfPrx6	Diese Arbeit
pSLI/ <i>PFPRX6-TS</i>	Genomisches Tagging von PfPrx6	Diese Arbeit
pSLI/ <i>PFPRX6-KO</i>	Genomisches Tagging von PfPrx6	Diese Arbeit
pSLI/ <i>PFPRX6-ΔAOP-KO</i>	Genomisches Tagging von PfPrx6	Diese Arbeit

2.1.9. Bakterienstämme

Tabelle 10 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Nutzung
XL1-blue	Klonen und vervielfältigen von Plasmiden, Herstellung von rekombinanten Proteinen
BL21	Herstellung von rekombinanten Proteinen

2.1.10. Plasmodiumstämme

Tabelle 11 Plasmodiumstämme

<i>P. falciparum</i> Stamm	Charakteristik
3D7	Laborstamm Wildtyp
3D7_PFPX6-HIS ₈ -GFP	C-terminal getaggtetes PfPrx6

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann ein gewünschter DNA-Abschnitt amplifiziert werden, von einem kleinen Fragment bis hin zu ganzen Plasmiden.

PCR-Ansatz:

10x Puffer	5 µl
DNA	0,5 µl (ca. 80 ng)
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer forward (10 µM)	4 µl
Primer reverse (10 µM)	4 µl
DNA-Polymerase* ¹	0,5 µl

PCR-Programm:

Initiales Erhitzen	97 °C	30 s	x 35* ²
Denaturierung	97 °C	30 s	
Anlagerung	50-70 °C	30 s	
Amplifizierung	68 °C (Taq) oder 72 °C (Phu)	20-150 s	
Finale Amplifizierung	68 °C (Taq) oder 72 °C (Phu)	300 s	
Standby	4 °C	-	

*¹ Taq Polymerase (5000 U/ml) oder Phusion Polymerase (2000 U/ml)

*² Bei Mutagenese-PCRs nur x 18

2.2.2. Agarose Gel-Elektrophorese

DNA-Fragmente können durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt

werden. Hierzu wurde 1-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. GelRed (10000x in Wasser) wurde zugegeben und das Gel in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel ausgekühlt und fest geworden war, wurde es in einen horizontalen Gel-Elektrophorese-Apparat gegeben und mit TAE-Puffer befüllt. Den zu untersuchenden Proben wurde 6x *loading dye* zugegeben und jeweils ca. 10 µl in eine Geltasche pipettiert. Als Referenz wurden 1 kbp oder 100 Bp DNA-Marker aufgetragen. Gele wurden bei 90-120 V für 45-60 min laufen gelassen. Die DNA konnte unter UV-Licht sichtbar gemacht und detektiert werden.

TAE-Puffer 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH = 8,0

2.2.3. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde entweder dazu verwendet, DNA-Fragmente mit entsprechenden Überhängen zu erzeugen, die später durch eine Ligation (siehe Abschnitt 2.2.5.) verknüpft werden sollten, oder um durch einen Kontrollverdau Einbau und Größe eines Inserts zu überprüfen. Ein Restriktionsverdau wurde stets für eine Stunde bei 37 °C durchgeführt.

Restriktionsverdau Ansatz:

10x Puffer	5 µl
Plasmid-DNA / PCR-DNA	5 µl / 20 µl
Restriktionsenzym(e)*	je 1 µl
ddH ₂ O	auffüllen auf 50 µl

*Für die Aktivität der einzelnen Restriktionsenzyme siehe New England Biolabs

2.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte können entweder direkt aufgereinigt werden, oder zunächst auf ein Agarose-Gel aufgetragen, durch eine Elektrophorese aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten werden. Die DNA wurde mithilfe des Wizard SV Gel and PCR *Clean-Up* System aufgereinigt und bei -20 °C gelagert.

2.2.5. Ligation

Wurden ein Plasmid und ein PCR-Fragment mit jeweils den gleichen Schnittstellen gespalten, so konnte im Anschluss das Fragment in das Plasmid mithilfe der T4 DNA-Ligase eingefügt werden. Alle Ligationen wurden bei 16 °C über Nacht durchgeführt.

Ligation-Ansatz:

10x DNA-Ligase-Puffer	2 µl
Plasmid	5 µl
PCR-Produkt	5 µl
T4-DNA-Ligase (4 x 10 ⁵ U/ml)	1 µl
ddH ₂ O	auffüllen auf 20 µl

2.2.6. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli ist ein sehr einfach und sehr schnell genetisch zu manipulierender Organismus und wird deshalb weltweit genutzt, um Plasmid-DNA zu vervielfältigen. Hierzu muss die *E. coli*-Zelle zunächst das Plasmid aufnehmen. Eine spezielle Vorbehandlung der Zellen macht diese Aufnahme möglich:

10 ml LB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 170 RPM inkubiert, bis die stationäre Phase ihres Wachstums erreicht war. Von dieser Vorkultur wurden 4 ml in 500 ml frisches LB-Medium transferiert und bei 20 °C für 24 h inkubiert. Sobald eine OD_{600nm} von 0,5 erreicht war, wurde die Zellsuspension zentrifugiert (2600 x g, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 150 ml eiskaltem TF1-Puffer resuspendiert und für 15 min in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin erneut zentrifugiert (2600 x g, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Hierauf wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem TF2-Puffer resuspendiert und in 100 µl Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, welche sofort mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die chemisch kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Transformationspuffer 1 (TF1-Puffer):

30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerol, mit Essigsäure auf pH 5,8 bei RT einstellen, sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)

Transformationspuffer 2 (TF2-Puffer):

10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerol, mit KOH (1 M) auf pH 6,5

bei RT einstellen, sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)

2.2.7. Transformation in *E. coli*

Das Integrieren eines Plasmids in eine *E. coli*-Zelle wurde genutzt, um dieses zu vervielfältigen, oder um ein darauf kodiertes Protein rekombinant herzustellen. Zunächst wurden 1-10 µl Plasmid auf 15-50 µl chemisch kompetente Zellen (XL1 Blue für Klonierungen, BL21/T7 Shuffle Express für Expression) gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 20 s (BL21), 60 s (T7 Shuffle Express) oder 90 s (XL1 Blue) und eine erneute Abkühlung im Eisbad für 5 min. Anschließend wurden 10 Volumina LB-Medium dazugegeben und die Zellen bei 37 °C (XL1 Blue, BL21) oder 30 °C (T7 Shuffle Express) für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 20-200 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten enthielten zur Selektion ein Antibiotikum, hier Kanamycin (50 µg/ml) für Zellen mit aufgenommenem pET28, oder Ampicillin (100 µg/ml) für Zellen mit pQE30, pET45 und pSLI. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C (XL1 Blue, BL21) oder 30 °C (T7 Shuffle Express) inkubiert, bis nach ca. 16 h Kolonien der geeigneten Größe gewachsen waren.

2.2.8. Plasmid-DNA-Isolierung

Um das Plasmid aus den transformierten *E. coli*-Zellen zu isolieren, wurde eine Plasmid-Mini-Präparation durchgeführt. Hierfür wurde eine einzelne Kolonie von den zuvor erhaltenen Platten gepickt und 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit dieser Kolonie angeimpft. Die Flüssigkultur wuchs über Nacht (37 °C, 230 rpm) in einem Schüttelinkubator und konnte am nächsten Morgen verwendet werden.

Von der Zellsuspension wurden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (13000 x g, 30 s, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 100 µl eiskaltem Puffer P1 resuspendiert, mit 200 µl Puffer P2 verdünnt und durch vorsichtiges Invertieren vermischt, sodass es zur Zellyse kommen konnte. Anschließendes Zugabe von eiskaltem Puffer P3, gefolgt von erneutem vorsichtigem Invertieren, neutralisierte den pH-Wert und führte zur Präzipitation der genomischen DNA und der Proteine. Eine erneute Zentrifugation (13000 x g, 10 min, 4 °C) führte zum Absetzen dieser Bestandteile, sodass lediglich Plasmid-DNA im Überstand blieb. Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Zugabe von 600 µl Isopropanol und eine anschließende

Zentrifugation (13000 x g, 5 min, 4 °C) bewirkten die Präzipitation der Plasmid-DNA. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Plasmid-Pellet wurde mit 600 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen. Mit einer Rotlichtlampe wurde die DNA für ca. 15 min getrocknet und anschließend in 30 µl ddH₂O gelöst. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Puffer P1 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNase A, pH 8,0

Puffer P2 0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS

Puffer P3 1,8 M KAc, pH 5,2

Wurde eine größere Menge Plasmid-DNA benötigt, so wurde eine Midi-Präparation entsprechend des QIAprep Midiprep Kits durchgeführt.

2.2.9. Expression und Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Transformierte *E. coli*-Zellen (XL1 Blue für Expression von Genen in dem Vektor pQE30; BL21 oder T7 Shuffle Express für Expression von Genen in den Vektoren pET28 und pET45) lagen zu Beginn auf einer Agarplatte vor. Vier Kolonien wurden gepickt und in 10 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Kan für pET28; + 100 µg/ml Amp für pQE30 und pET45) über Nacht unter Schütteln inkubiert (37 °C, 170 rpm). Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen 500 ml LB-Medium, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, angeimpft, sodass die Zelldichte einer OD_{600nm} von 0,05 entsprach. Die Zellen wurden ca. 3 h inkubiert (37 °C, 140 rpm), bis die Kultur eine OD_{600nm} von 0,5 erreicht hatten. Durch Zugabe von IPTG zu einer Konzentration von 0,5 mM wurde die Expression induziert. Die Zellen wurden weitere 4 h inkubiert, um eine ausreichende Menge hergestellter Proteine sicherzustellen. Für *ROGFP2*-Konstrukte wurde die Kultur vor der Zugabe von IPTG auf 16 °C abgekühlt und die Expression bei 16 °C über Nacht vorgenommen. Darauf wurden die Zellkulturen in 500 ml Zentrifugationsbecher überführt und 10 min in einem Eis-Wasserbad abgekühlt. Eine anschließende Zentrifugation (4000 x g, 15 min, 4 °C) trennte das Zellpellet vom Medium, welches verworfen wurde. Das Zellpellet wurde in 15 ml Äquilibrierpuffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Äquilibrierpuffer 10 mM Imidazol, 50 mM Na_xH_yPO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0 bei 4 °C

2.2.10. Kultivierung und Manipulation von *Plasmodium falciparum*

P. falciparum Parasiten wurden in ihren asexuellen Blutstadien in Erythrozyten aus dem Menschen kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.10.1. Auftauen von *P. falciparum* Blutkulturen

Ein in flüssigem Stickstoff gelagertes Cryo-Reaktionsgefäß mit ca. 1 ml Plasmodienkultur wurde in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Zunächst wurden 0,2 Volumenanteile Auftaulösung 1 tröpfchenweise hinzugegeben, die entstandene Suspension dann in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 min auf Eis inkubiert. Nach einer ebenfalls tröpfchenweisen Zugabe von 10 Volumenanteilen Auftaulösung 2 wurden die Zellen zentrifugiert (300 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Hiernach wurde das Zellpellet in 10 Volumen Auftaulösung 3 resuspendiert und erneut zentrifugiert (300 x g, 5 min). Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, wurde das Volumen der Erythrozyten geschätzt und auf 500 µl aufgefüllt. Nachdem das Pellet mit 10 ml vollständigem RPMI-Medium gewaschen wurde (300 x g, 5 min), wurde es in 13 ml vollständigem RPMI-Medium aufgenommen und in eine frische Petrischale überführt.

Auftaulösung 1	12 % (w/v) NaCl
Auftaulösung 2	1,6 % (w/v) NaCl
Auftaulösung 3	0,9 % (w/v) NaCl, 0,2 % (w/v) Glukose
Vollständiges RPMI-Medium (vRPMI)	RPMI 1640 (25 mM HEPES, L-Glutamin), 4,5 % Albumax II, 200 µM Hypoxanthin, 2,7 µg/ml Gentamycin

2.2.10.2. Kultivierung von *P. falciparum* Parasiten im Blutstadium

Zum Wachsen wurden die Kulturen in einem Brutschrank inkubiert, in dem eine Atmosphäre von 5 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit herrschte. Jeden bis jeden zweiten Tag wurde den Kulturen 10 ml altes Medium abgenommen und 10,5 ml frisches vRPMI-Medium zugegeben. Jeden zweiten Tag wurden Ausstriche gemacht (siehe Abschnitt 2.2.10.3.) und die Parasitämie geschätzt. Durch Verdünnen der Kultur wurde die Parasitämie stets zwischen 0,1 % und 10 % gehalten. Medium und Blut wurden dabei so zugegeben, dass immer 0,5 ml Erythrozyten und 13 ml vRPMI-Medium in einer Petrischale waren. Für mit dem Plasmid pSLI

transfizierte Parasiten wurde ebenfalls 4 µg/ml Blastocidin und für integrierte pSLI-Konstrukte 400 µg/ml Neomycin G418 zugegeben.

2.2.10.3. *Ausstriche, Giemsa-Färbung und Abschätzung der Parasitämie*

Um eine Plasmodienkultur mikroskopisch untersuchen zu können, wurde zunächst ein Blutropfen auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen, sodass sich eine dünne Blutschicht bildete. Nach dreiminütigem Trocknen wurde der Objektträger für 10 Sekunden in ein Methanolbad zur Fixierung der Zellen gestellt und erneut getrocknet. Zum Anfärben der DNA wurde der Objektträger für 30 min in einer 10 % (v/v in ddH₂O) Giemsalösung inkubiert, anschließend gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Zum Abschätzen der Parasitämie wurden nicht infizierte (RBC, *red blood cells*) und infizierte Erythrozyten (iRBC, *infected red blood cells*) gezählt und das Verhältnis bestimmt.

2.2.10.4. *Einfrieren von P. falciparum Blutkulturen*

Kulturen, die eine Parasitämie von 1-5 % Parasiten im Ringstadium aufwiesen, konnten zur Konservierung eingefroren werden. Die Kultur wurde hierfür in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (300 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Ein Volumenäquivalent Einfrierlösung wurde tröpfchenweise unter Schwenken zugegeben. Die Kultur wurde in ein Cryo-Reaktionsgefäß überführt und so schnell wie möglich in flüssigem Stickstoff schockgefrostet.

Einfrierlösung 28 % (v/v) Glycerol, 0,65 % (w/v) NaCl, 3 % (w/v) Sorbitol

2.2.10.5. *Synchronisierung von P. falciparum Blutkulturen*

Um synchron wachsende Parasiten zu erhalten, wurde die Kultur zunächst in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (300 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Blutpellet wurde in einer vorgewärmten 5 % D-Sorbitol Lösung resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Suspension zentrifugiert (300 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Nach zwei Waschschritten mit 10 ml vRPMI-Medium wurde die Kultur wieder in 13 ml vRPMI-Medium aufgenommen und zur Kultivierung im Inkubator gelagert.

Promotor zum Transkribieren des Selektionsmarkers genutzt. Das Plasmid wurde wie in Abbildung 8 beschrieben aufgebaut. Die Selektion auf Parasiten mit integriertem Plasmid wurde mit der Zugabe von 400 µg/ml Neomycin-G418 gestartet. Für die folgenden Wochen wurde jeden bis jeden zweiten Tag das Medium gewechselt, frische Droge gegeben und jede Woche 50 µl Blut zugegeben. Die Parasiten mit integriertem Plasmid tauchten nach 3-8 Wochen auf.

2.2.10.8. *DNA-Isolierung von P. falciparum Blutkulturen und Genotypisierung*

Zur Überprüfung, ob die Parasitenkultur den gewünschten Genotyp aufzeigt, wurde zunächst die genomische DNA isoliert. Hierfür wurde die zu überprüfende Kultur in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (300 x g, 5 min). Ein Teil der iRBC (100 µl) wurden entnommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1,9 ml ddH₂O mit 500 µM EDTA hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension durch Vortexen gründlich durchmischt. Nach 10 min Inkubationszeit auf Eis folgte eine Zentrifugation (16000 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in TE-Puffer mit Proteinase K (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 7,6 (HCl), 5 mg/ml Proteinase K) aufgenommen und eine Stunde bei 65 °C inkubiert. Hiernach wurde die Proteinase 10 min bei 80 °C inaktiviert. Es folgte eine weitere Zentrifugation (16000 x g, 5 min, 4 °C). Der hier erhaltene Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und enthielt die zu isolierende DNA. Zur Überprüfung der korrekten Integration wurden PCRs durchgeführt, wie sie in Abbildung 8 beschrieben sind.

2.2.10.9. *Lyse der Erythrozyten durch Saponin in P. falciparum Blutkulturen*

Um Parasiten aus iRBCs zu isolieren, wurde die Methode von Benting *et al.* 1994 [136] leicht modifiziert angewendet, bei der die Erythrozyten durch Saponin lysiert werden. Ein bis zwei Tage vor der Lyse wurde eine Petrischale mit 2-3 % Parasitämie auf zwei große Petrischalen überführt und dort jeweils auf 1,5 ml Blut und 35 ml vRPMI-Medium aufgefüllt. Am Folgetag wurde die Parasitämie überprüft. Lag sie unter 6 %, wurden 25 ml altes Medium abgenommen, die selbe Menge frisches Medium zugegeben und die Lyse auf den folgenden Tag verlegt. Lag sie bei über 6 %, wurde direkt mit der Lyse begonnen. Hierbei wurden zunächst je 20 ml Medium von den Kulturen abgenommen und verworfen und anschließend beide Kulturen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Auf das Pellet wurden 30 ml PBS mit 0,03 % (w/v) Saponin gegeben und für

15 min auf Eis unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1800 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 20 ml eiskaltem PBS gewaschen (1800 x g, 10 min, 4 °C), in 500 µl PBS aufgenommen, in ein Tiefkühlreaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

PBS (phosphate buffered saline) 1,84 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH = 7,4 (HCl)

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Aufreinigung von Proteinen über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

a) Rekombinante Proteine aus *E. Coli*

Das gemäß Abschnitt 2.2.9. gewonnene und gelagerte Zellpellet wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Es wurden 10 mg Lysozym + DNase I zugegeben und eine Stunde auf Eis gerührt. Zusätzlich wurden die Zellen durch Ultraschallpulse aufgeschlossen (5 x 10 s, Zyklus 5, 70 % Leistung, 10 s Pause zwischen jeder Pulssequenz) und danach zentrifugiert (1000 x g, 30 min, 4 °C). Während dieser Zeit wurde eine Poly-Prep Chromatographie-Säule mit 1 ml 50 % Ni-NTA geladen, mit einer peristaltischen Pumpe verbunden und mit 15 ml Äquilibrierpuffer äquilibriert. Die Flussrate lag für alle Schritte bei 1 ml/min. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Säule nicht trocken läuft. Der Überstand von 15 ml wurde auf die Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen wurde sie mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Zur Elution wurden zunächst 300 µl Elutionspuffer auf die Säule appliziert. Nachdem dieser Puffer eingesickert war, wurde die Verbindung zur Pumpe getrennt, 1 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Eluat direkt unter der Säule in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis aufgefangen.

Waschpuffer 20 mM Imidazol, 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, 300 mM NaCl, pH 8,0 bei 4 °C

Elutionspuffer 200 mM Imidazol, 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, 300 mM NaCl, pH 8,0 bei 4 °C

b) Proteine aus *P. falciparum*

Das gemäß Abschnitt 2.2.10.9. gewonnene und gelagerte Zellpellet wurde in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald das Lysat komplett flüssig war, wurde es zur Zelllyse in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Dieser Vorgang wurde 4-mal wiederholt. Auf die so lysierte Zellsuspension (ca. 500 ml) wurden 80 µl mit Äquilibrierpuffer äquilibrierte Ni-NTA gegeben und 1 h bei 4 °C gerührt. Nach einer Zentrifugation (200 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (200 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand wieder abgenommen und die Proteine durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer 2 eluiert. Hierfür wurde die Suspension erneut 10 min auf Eis geschwenkt und anschließend zentrifugiert (200 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und enthielt das Protein-Eluat. Von folgenden Fraktionen wurden während der Reinigung Proben genommen: Überstand (Ü), Pellet (P), Durchfluss (D), Waschschrift (W), Eluat (E), Säulenmaterial nach der Elution (N).

Elutionspuffer 2 250 mM Imidazol, 50 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 300 mM NaCl, pH 8,0 bei 4 °C

2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde entweder die Methode nach Bradford [137] oder die Proteinbestimmung durch den errechneten Extinktionskoeffizienten bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ genutzt.

a) Bradford

Mithilfe einer Standardkurve von BSA, das in bekannter Konzentration vorliegt, kann hier die Proteinkonzentration durch das Binden von Coomassie Brilliant Blue G-250 an ein Protein bestimmt werden. Durch diesen Vorgang verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Anhand der gemessenen Absorption bei 595 nm kann somit die Konzentration einer unbekanntem Proteinlösung abgeschätzt werden.

Für die Standardkurve wurden 7 verschiedene Mengen BSA zwischen 0 und 14 µg in 800 µl ddH₂O angesetzt. Zur Bestimmung der Konzentration der unbekanntem Lösung wurde üblicherweise eine Menge von 1-10 µl in 799-790 µl ddH₂O verdünnt. Es wurden Triplikate angesetzt. Hiernach wurden 200 µl Bradfordreagenz zugegeben, die Küvetten invertiert und für 15 min inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Eine

hyperbolische Standardkurve mit der Gleichung $y = \frac{a \cdot x}{b + x}$ wurde durch die Punkte der bekannten BSA-Lösungen gelegt. Die Proteinmenge der unbekanntes Lösung konnte mithilfe dieser Standardkurve abgeschätzt werden.

b) Extinktion bei 280 nm

Einige Aminosäuren absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Absorptionskoeffizient ϵ_{280} kann anhand der Primärstruktur eines Proteins bestimmt werden. Hierzu wurde das Program ExPASy ProtParam genutzt (<http://web.expasy.org/protparam>). Mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann durch Messen der Absorption die Proteinkonzentration c abgeschätzt werden: $c = \frac{Abs}{\epsilon_{280} \cdot d}$ mit $d = 1 \text{ cm}$

Extinktionskoeffizienten der hier verwendeten Proteine:

<u>Protein</u>	<u>Extinktionskoeffizient ϵ_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]</u>
ScGrx7 ^{WT, loop}	14440
ScGrx7 ^{WP, WP+loop}	19940
HsGrx5 ^{WT, loop}	11460
HsGrx5 ^{RR, RR+loop}	5960
PfGrx ^{WT, C88S, C32/88S}	9970 (red) / 10095 (ox)
roGFP2 ^{WT, C151S, C208S}	21890 (red) / 22015 (ox)
roGFP2 ^{WT} -PfGrx ^{WT, C88S, C32/88S}	31860

2.3.3. Herstellung von Polyacrylamidgelen und Gelelektrophorese

Bei einer eindimensionalen SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Es wurden hier 16 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele für Arbeiten mit Grx- und roGFP2-Konstrukten genutzt und 12 %ige Gele für Arbeiten mit Prx-Konstrukten. Pro Tasche wurde das Gel mit 2-15 μl Probe beladen, welche zuvor mit 2x Lämmli-Puffer 1:2 oder mit 5x Lämmli-Puffer 1:5 verdünnt wurde. Für Gele unter reduzierenden Bedingungen wurde ebenfalls 6 % (v/v) β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Außer bei Arbeiten mit mmPEG wurden die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt, um eine komplette Denaturierung zu ermöglichen. Vorgefärbter Marker (5 μl) diente bei jedem Gel als Größenreferenz. Die Gele wurden in eine Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt, welche anschließend mit SDS-Laufpuffer befüllt wurde.

Ein Strom von 20 mA pro Gel trennte die Proteine nach ihrer Größe auf (ca. 1 h), wonach die

Gele in eine Plastikschaale überführt wurden, in der sie für 1 h mit Coomassie Brillant Blau (Färber) eingefärbt wurden. Vorsichtiges Entfernen des Coomassie Blau und Hinzufügen eines Entfärbers bleichte die Teile des Gels, die keine Proteine enthielten (1 h). Nach Entfernen des Entfärbers wurde das Gel über Nacht mit ddH₂O gewaschen.

2x Lämmli-Puffer	125 mM Tris/HCl, pH = 6,8, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
5x Lämmli-Puffer	250 mM Tris/HCl, pH = 6,8, 10 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
Färber	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Blau G250
Entfärber	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Trenngel 15 % (10 ml)	2,3 ml ddH ₂ O, 5 ml 30 % Acrylamid mix, 2,5 ml Sammelgelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8), 0,1 ml 10 % SDS, 0,1 ml 10 % APS, 0,004 ml TEMED
Sammelgel 5 % (2 ml)	1,4 ml ddH ₂ O, 0,33 ml 30 % Acrylamid mix, 0,25 ml Trenngelpuffer (1 M Tris, pH 6,8), 0,02 ml 10 % SDS, 0,02 ml 10 % APS, 0,002 ml TEMED

2.3.4. Western Blot Analyse

Die zu untersuchenden Proben wurden wie vorher beschrieben in einer SDS-PAGE aufgetrennt, jedoch nicht mit Coomassie eingefärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz in Wasser ausgeschwenkt und anschließend in einem *Wet-Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurde zunächst die Membran 30 sec in Methanol getaucht, anschließend wurden Membran, Gel und Whatmanpapiere in Blotting-Puffer äquilibriert und in folgender Reihenfolge gestapelt: Anode – 2x Whatmanpaper – Membran – Acrylamidgel – 2x Whatmanpaper – Kathode. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden.

Das Blotting wurde über Nacht bei 15 V, 4 °C durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde die Membran kurz mit ddH₂O gewaschen und anschließend 2 min in einer Ponceau-Lösung gefärbt. Um den Hintergrund zu entfärben, wurde die Membran 10 min mit Wasser gewaschen, bevor ein Bild aufgenommen wurde. Hiernach wurde die Membran eine weitere

Stunde in TBS entfärbt. Einer anschließenden Inkubation für eine Stunde mit dem Primären Antikörper (1:2000 verdünnter α His₆ in 50 ml TBS mit 2,5 g Milchpulver) folgte eine Serie an Waschschritten in TBS, 2 x TBS-T, TBS (je 10 min). Der sekundäre Antikörper (1:10000 verdünnter α Maus in 50 ml TBS mit 2,5 g Milchpulver) wurde hiernach ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Es folgten drei weitere Waschschrritte für je 10 min mit TBS. Die Chemilumineszenz wurde durch die Entwicklerlösungen Roti-Lumin plus (ROTH) eingeleitet und die Signale mit einem CCD-Kamera Dokumentiersystem (Vilber) aufgenommen.

Blotting Puffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
Ponceau Lösung	0,1 % (w/v) Ponceau S, 1 % (v/v) acetic acid
TBS	10 mM Tris, 0,9 % (w/v) NaCl, pH = 7.4 (HCl)
TBS-T	10 mM Tris, 0,9 % (w/v) NaCl, 0,05 % Tween20, pH = 7.4 (HCl)

2.3.5. Vorbereitung der Proteine durch Reduktion oder Oxidation

Um den Redoxstatus der Proteine zu Beginn eines Experiments genau zu kennen, wurden diese vorbehandelt.

Reduktion: Das gereinigte Protein wurde mit 5 mM DTT für eine Stunde auf Eis inkubiert. Hiernach wurde das überschüssige DTT mithilfe einer PD-10 Säule entfernt und das Protein in den gewünschten Puffer (Äquibrierpuffer bei einer anschließenden Oxidation, Messpuffer bei keiner anschließenden Oxidation) überführt.

Oxidation: Das zuvor reduzierte Protein wurde in 5 mM Diamid (zur Ausbildung von Disulfidbrücken) oder in 5 mM GSSG (zum Glutathionylieren) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Das überschüssige Oxidationsmittel wurde entfernt, indem das Protein zunächst über eine Ni-NTA gewaschen wurde und anschließend über eine PD-10 Säule entsalzt und in Messpuffer überführt wurde.

2.3.6. Redox Electrophoretic Mobility Shift (EMSA)

Um die Übertragung der Oxidation von roGFP2 auf PfGrx zu beobachten, wurden *Mobility Shifts* mit mmPEG durchgeführt. Dieses ca 1,2 kDa große Molekül bindet kovalent an freie Thiole und verursacht somit bei reduziert vorliegenden Proteinen einen Shift in einem SDS-

Gel. Hierfür wurden zunächst roGFP2^{WT} und roGFP2^{C151S} aufgereinigt und reduziert, sowie PfGrx^{C32/88S} aufgereinigt und mit GSSG oxidiert und weiterhin PfGrx^{C88S} aufgereinigt und mit Diamid oxidiert wie zuvor beschrieben.

Es wurde roGFP^{WT} mit PfGrx^{C88S} gemischt, um die Übertragung eines nicht-Glutathion-Disulfids zu beobachten. Es wurden nahezu zeitgleich 7 Reaktionsgefäße mit 300 µl Lösung angesetzt, in denen sich jeweils 1 µM roGFP2 und 2 µM PfGrx in Messpuffer befanden. Nach 0,5 bis 60 min (25 °C) wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl mmPEG-Lösung (160 µM) gestoppt und die Lösung 15 min auf Eis inkubiert. Die Proteinlösung wurde nach Ablauf der 15 min mit 1600 µl eiskaltem Aceton präzipitiert. Nach dem Ausfällen der letzten Probe folgte eine Zentrifugation (21000 x g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 µl Lämmli-Puffer aufgenommen.

Zur Untersuchung der Übertragung einer Glutathioneinheit von PfGrx^{C32/88S} auf roGFP2^{C151S} wurden die Proteine so gemischt, dass eine 100 µl Lösung mit einer Konzentration von 5 µM roGFP2 und 2,5-80 µM PfGrx vorlag. Beide Proteine lagen in Messpuffer vor. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 5x-Lämmli, in dem 2 mM mmPEG gelöst war, gestoppt und 15 min auf Eis inkubiert.

Die Proben wurden hiernach ohne Aufkochen auf ein 16 %-iges SDS-Gel appliziert und wie zuvor beschrieben aufgetrennt und gefärbt.

Messpuffer 100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0 @RT

2.4. Kinetikmessungen

2.4.1. Glutathion-Reduktase Aktivitätsbestimmung

Die im nächsten Abschnitt beschriebene Kinetikmessung basiert auf einem an die Glutathion-Reduktase gekoppelten Assay. GSH reduziert hierbei das zu untersuchende, oxidierte Enzym und wird wiederum von der GR als GSSG reduziert. Die Reduktion von GR erfolgt durch NADPH, welches zu NADP⁺ oxidiert wird und seine spektrometrischen Eigenschaften ändert. Um sicherzustellen, dass GR nicht der geschwindigkeitslimitierende Faktor ist, wurde zunächst die Aktivität des GR bestimmt.

Hierfür wurde eine grüne 1 ml Quartzküvette vorbereitet, sowie Stocklösungen von 20 mM

GSSG, 4 mM NADPH und eine 1:100 Verdünnung von ScGR, jeweils in Messpuffer. Die Küvette wurde mit Messpuffer befüllt, 5 µl der verdünnten GR und NADPH zugegeben, sodass dessen Endkonzentration 100 µM betrug. Eine Messung im JASCO Spektrophotometer wurde bei 340 nm gestartet, wobei stets eine Referenzküvette, die keine GR enthielt, zeitgleich gemessen und von der Messküvette subtrahiert wurde. Nachdem 30 Sekunden eine Basislinie aufgenommen wurde, wurde GSSG zu einer finalen Konzentration von 1 mM zeitgleich in beide Küvetten gegeben, durchmischt und die Absorptionsänderung für weitere 3 min aufgenommen. Es wurde die Steigung der aufgenommenen Kurve bestimmt und die Basislinie davon abgezogen, was eine $\Delta\text{Abs}_{\text{korrr}}/\text{min}$ ergibt. Die Messung wurde dreimal repliziert ($n = 3$) und der Mittelwert der $\Delta\text{Abs}_{\text{korrr}}/\text{min}$ bestimmt. Mithilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ von NADPH wurde der Umsatz von NADPH-Molekülen pro Minute wie folgt errechnet: $\Delta[\text{NADPH}]/\text{min} = \Delta\text{Abs}_{\text{korrr}} \times 1 \text{ cm} / \epsilon_{340}$. Um die Aktivität in Units zu berechnen, wurde folgende Formel benutzt: $\text{Units im Test} = \Delta[\text{NADPH}] \times V/\text{min}$. Um die Aktivität der GR in der Stammlösung zu bestimmen, wurden die Verdünnungen herausgerechnet: $\text{Units in Stammlösung} = (\text{Units im Test} \times \text{Verdünnung}) / \text{Volumen}$.

2.4.2. GSSCys *Steady-state* Enzymkinetiken

Um die Oxidations- und Reduktionsgeschwindigkeit von zuvor aufgereinigten ScGrx7 und HsGrx5 Mutanten zu bestimmen wurde eine gekoppelte *Steady-state* Messung mit GSSCys als Oxidationsmittel durchgeführt. Das zu messende Grx deglutathionyliert enzymatisch das GSSCys und bindet das Glutathion kovalent. Die Reduktion des Grx erfolgt durch ein weiteres Molekül GSH, wobei freies GSSG entsteht. Dieses wird von der GR reduziert, welches NADPH als Elektronendonator nutzt. Die Absorptionsänderung bei dem Umsatz von NADPH zu NADP^+ kann mit dem JASCO Spektrometer bei 340 nm gemessen werden. Wie in Mesecke *et al.* [75] beschrieben wurden alle Messungen in grünen Quartzküvetten bei 25 °C in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Es wurde stets zeitgleich eine Referenzküvette vermessen, die alle Komponenten außer dem zu messenden Grx enthielt, und von der Messküvette subtrahiert. Alle Grx lagen in Elutionspuffer vor und wurden vor der Messung weder oxidiert noch reduziert. In jeder Messung wurden 0,1 mM NADPH und 1 U/ml ScGR als finale Konzentration genutzt. Die Grx-Konzentration hing von der Aktivität der Mutante ab: ScGrx7^{WT} und ScGrx7 (20 nM), ScGrx7^{loop} (bis zu 1,4 µM), ScGrx7^{WP+loop} (bis zu 2,6 µM), HsGrx5^{C122S} (bis zu 15 µM), HsGrx5^{RR} (bis zu 12 µM), HsGrx5^{loop} (bis zu 1,6 µM) und

HsGrx5^{RR+loop} (bis zu 4,0 μM).

Es wurde zu konstanten GSSCys-Konzentrationen (25, 50, 100 und 150 μM) die GSH-Konzentration zwischen 50 μM und 1,5 mM variiert. Zunächst wurden NADPH, GSH, GR und Grx in die Küvette gegeben und für 30 s die Absorption bei 340 nm als Basislinie gemessen. Hiernach wurde GSSCys hinzugegeben und weitere 2 min gemessen.

Es wurde die Steigung der aufgenommenen Kurve bestimmt und die Basislinie davon abgezogen, was eine $\Delta\text{Abs}_{\text{korrr}}/\text{min}$ ergibt. Die Messung wurde dreimal repliziert ($n = 3$) und der Mittelwert der $\Delta\text{Abs}_{\text{korrr}}/\text{min}$ bestimmt. Mithilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ von NADPH wurde der Umsatz von NADPH-Molekülen pro Minute errechnet: $\Delta[\text{NADPH}]/\text{min} = \Delta\text{Abs}_{\text{korrr}} \times 1 \text{ cm} / \epsilon_{340}$. Da für jedes Molekül NADPH, das oxidiert wird, genau ein Molekül GSSCys reduziert wird, kann durch $\Delta[\text{NADPH}]/\text{min} = \Delta[\text{GSSCys}]/\text{min}$ die Aktivität des Grx bestimmt werden. Durch nichtlineare Regression nach Michaelis-Menten und lineare Regression nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee und Hanes wurden die kinetischen Parameter $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ und $k_{\text{m}}^{\text{app}}$ bestimmt [75, 82, 86].

2.4.3. Stopped-flow Enzymkinetiken

Mithilfe des *Stopped-flow* SX-20 Spektrofluorometers von Applied Photophysics können Absorptions- oder Fluoreszenzänderungen nach dem Mischen zweier Lösungen im Millisekundenbereich gemessen werden. Hierfür wurden entweder 2 μM reduziertes roGFP2 in Spritze A und 2-80 μM mit GSSG oder Diamid oxidiertes PfGrx in Spritze B gegeben, oder 2 μM mit GSSG oder Diamid oxidiertes roGFP2 in Spritze A und 2-80 μM reduziertes PfGrx zusammen mit 2-10 mM GSH in Spritze B (siehe Tabelle 12). Für Messungen mit GSNO wurden 2 μM reduziertes roGFP2 und 2 μM reduziertes PfGrx in Spritze A und variable Konzentrationen (2-100 μM) GSNO in Spritze B gegeben. Nach dem Mischen wurde die Änderung der gesamten Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von entweder 400 oder 484 nm für 1-1000 s in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Reaktion gemessen. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt und alle Proteine und Reaktionspartner waren in Messpuffer gelöst. Zum Fitten der durchschnittlichen Fluoreszenz von 1-10 Messungen für jedes der zwei bis drei biologischen Replikate wurde die Applied Photophysics Pro-Data SX Software genutzt. Abweichungen unter den einzelnen biologischen Replikaten wurden mithilfe von Gleichung (I) errechnet:

$$\Delta k = \sqrt{\frac{\sum (k - \bar{k})^2}{(n - 1)}} \quad (I)$$

Hierbei ist \bar{k} der Mittelwert der einzelnen k -Werte. Für jede Grx-Konzentration wurde entweder eine einfache Exponentialfunktion

$$AU(t) = AU_0 + a * e^{-kt}$$

oder eine zweifache Exponentialfunktion

$$AU(t) = AU_0 + a_1 * e^{-k_1 t} + a_2 * e^{-k_2 t}$$

als Fit genutzt und der Kinetik so ein k_{obs} -Wert zugeordnet, welcher anschließend gegen die Grx-Konzentration in einem Sekundärdiagramm aufgetragen wurde. Im Falle einer zweifachen Exponentialfunktion wurde lediglich k_1 weiter untersucht, da k_2 zu klein war und keine erkennbare Tendenz und Konstanz über mehrere Replikate aufwies. k_2 wurde auf ungewollte Nebenreaktionen zurückgeführt, die durch Verunreinigungen in der Proteinisolierung und Rückstände von Oxidations- und Reduktionsmitteln, sowie durch Rückreaktionen von der Produkt- zu der Eduktseite entstehen können.

Die Steigung eines linearen Fits durch diese Punkte ergab die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der jeweiligen Reaktionen (siehe Ergebnisse). Zeigten die k_{obs} -Werte im Sekundärdiagramm ein Sättigungsverhalten, so wurde die Fitgerade nur durch die ersten 3 Messpunkte gelegt, um die ungesättigte Reaktion bei niedrigen Substratkonzentrationen abzuschätzen. Zusätzlich wurde ein hyperbolischer Fit

$$k(c) = k_0 + \frac{a * c}{b + c}$$

durch alle Punkte hinzugefügt, wobei c die jeweilige Substratkonzentration (Spritze B) darstellt und a als Maximalgeschwindigkeit k_{cat} interpretiert wurde.

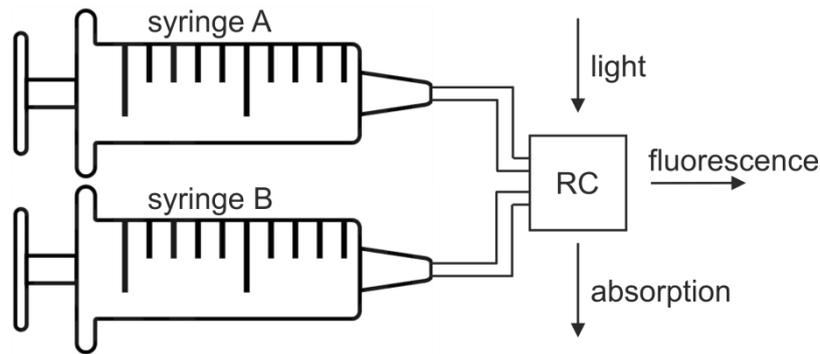


Abbildung 8 Schematische Darstellung einer *Stopped-flow* Apparatur.

In die Spritzen A und B werden die Lösungen gegeben, die miteinander reagieren sollen. Sie werden durch Hochdruck in der Reaktionskammer (*reaction chamber*, RC) rapide durchmischt. Hier können Spektren oder die Änderung der Fluoreszenz oder Absorption über die Zeit aufgenommen werden.

Tabelle 12 Versuchsaufbau der *Stopped-flow* Messungen.

Versuch	Spritze A	Spritze B
GSNO-Tests	2 μM red. roGFP2 ^{WT} (+ 2 μM red. PfGrx ^{C88S} / PfGrx ^{C32/88S})	2-200 μM GSNO
Oxidative Halbreaktion des Fusionskonstrukts	2 μM red. roGFP2 ^{WT} -PfGrx ^{WT} / roGFP2 ^{WT} -PfGrx ^{C88S} / roGFP2 ^{WT} -PfGrx ^{C32/88S}	2-80 μM GSSG
Oxidative Halbreaktion von roGFP2	2 μM red. roGFP2 ^{WT} / roGFP2 ^{C151S} / roGFP2 ^{C208S}	2-80 μM ox. PfGrx ^{C88S} -S ₂ / PfGrx ^{C88S} -SSG / PfGrx ^{C32/88S} -Dia / PfGrx ^{C32/88S} -SSG
Reduktive Halbreaktion von roGFP2	2 μM ox. roGFP2 ^{WT} -S ₂ / roGFP2 ^{C151S} -SSG / roGFP2 ^{C208S} -SSG	2-80 μM red. PfGrx ^{C88S} / PfGrx ^{C32/88S} + 0-10 mM GSH, 250 μM NADPH, 0,4 U/ml GR

3. Ergebnisse

3.1. Die genomische Integration des *PFPRX6*

Die Reduktion von PfPrx6 gibt schon lange Rätsel auf. Während für die meisten Peroxiredoxine der effiziente Reduktionspartner bekannt ist, ist unbekannt, wie genau und ob das PfPrx6 reduziert wird. Um genauere Informationen hierüber zu erhalten, sollte PfPrx6 in physiologischem Umfeld mit zwei Tags versehen werden: einem GFP-Tag für Lokalisationsstudien *in vivo* und einem His₈-Tag zur Aufreinigung über eine Ni-NTA-Agarosesäule. Zur genomischen Integration wurde die SLI-Methode gewählt, wie in Abschnitt 2.2.10.7. beschrieben.

3.1.1. DNA-Analyse zeigt eine korrekte Integration des *PFPRX6*-Konstrukts in das Genom von *P. falciparum*

Zunächst wurde ein Wildtypstamm 3D7 mit dem pSLI-*GFP-HIS₈-PFPRX6* transfiziert und gewartet, bis sich nach etwa 4 Wochen eine unter Blastocidin-Behandlung stabil wachsende Kultur entwickelt hat. Die Blastocidin-Resistenz befindet sich hinter einem auf dem pSLI gelegenen Promotor, sodass diese auch ohne Integration des Plasmids abgelesen werden kann (Abb. 9). Die Kultur wurde anschließend mit Neomycin behandelt. Da sich auf dem Plasmid kein Promotor zur Expression des Neomycin-Resistenzgens befindet, kann eine Resistenz zu Neomycin nur erhalten werden, wenn der endogene *PFPRX6*-Promotor genutzt wird, was bedeutet, dass das Plasmid in das Genom integrieren muss. Nachdem sich auch unter Neomycin-Behandlung nach ca. drei Wochen wieder eine stabil wachsende Kultur entwickelt hat, wurde die genomische DNA der Kultur isoliert und drei PCRs vorgenommen, wie in Abbildung 9 beschrieben, um die Integration zu überprüfen.

Als Negativkontrolle wurde parallel ein untransfiziertes Wildtypgenom isoliert und es wurden die gleichen drei PCRs vorgenommen. Der SLI-Stamm zeigt Banden bei ca. 1300 und 500 Basenpaaren für die 5' und 3'-PCR. Die erwarteten Größen dieser Banden liegen bei 1496 und 569 Basenpaaren. Beide PCRs laufen somit etwas schneller als erwartet, was die Folge von zu viel aufgetragener Probe sein kann. Die Wildtypbande ist nicht zu sehen, was auf eine Integration an der korrekten Stelle im Genom hindeutet.

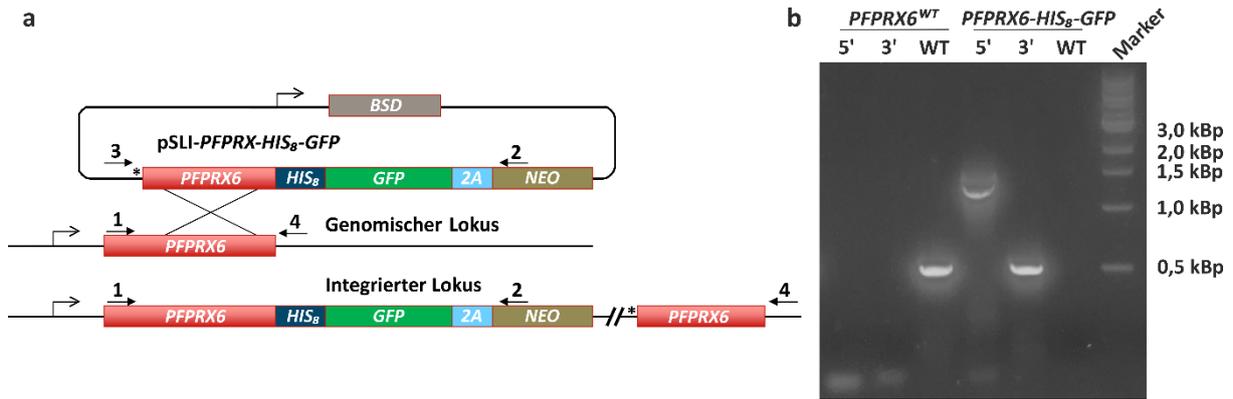


Abbildung 9 Eine Genotypisierung bestätigt die korrekte Integration des pSLI-Plasmids.

a Aufbau des SLI-Plasmids und schematische Darstellung der Integration. Das pSLI besitzt eine Homologieregion zum Ziellokus (ca. 500 Bp), gefolgt von einem His₈- und einem GFP-Tag. 2A ist ein Skippeptid, NEO kodiert für die Neomycin Phosphotransferase. BSD kodiert für die Blastocidin-S-Desaminase. Ein Stern steht für ein Stoppkodon. Die geknickten Pfeile zeigen die Position von Promotoren; die nummerierten, geraden Pfeile zeigen Primerbindungsstellen. Primer 2 und 3 binden ausschließlich auf dem Plasmid und Primer 1 und 4 ausschließlich im Genom. PCRs zur Überprüfung der Integration am 5'-Ende wurden mit Primer 1 und 2, am 3'-Ende mit Primer 3 und 4 und für den Wildtyploкус mit Primer 1 und 4 durchgeführt. **b** Auf den drei Spuren links ist das Ergebnis des Wildtypgenoms zu sehen. Es gibt kein Signal zur Integration von 5' und 3'-Ende, lediglich das Signal des Wildtypgens, erwartet bei 569 Bp. Rechts ist das Ergebnis des *PFPRX6-HIS₈-GFP*-Stamms zu sehen. Erwartete Banden für das integrierte Konstrukt waren 1496 Bp für die 5'-PCR und 572 Bp für die 3'-PCR.

Die Kontrollprobe zeigt keine Banden für die 5' und 3'-PCRs, sondern lediglich ein Signal bei 500 bp für die PCR auf den Wildtyplocus. Um die Abweichung der 5'-PCR zu erklären und um sicherzustellen, dass keine Mutationen oder *Frameshifts* vorliegen, wurde die 5'-PCR zum Sequenzieren an Eurofins Genomic gesendet. Die erhaltene Sequenzierung bestätigte zwar die korrekte Integration der Region zwischen Primer 1 und Primer 2 (Anhang 1), sie reichte jedoch nicht über die Homologieregion hinaus und zeigte somit nicht die komplette 5'-Region des *PFPRX6*.

3.1.2. PfPrx6-His₈-GFP konnte nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden

Die Kultur 3D7_*PFPRX6-HIS₈-GFP* wurde wie in Material und Methoden beschrieben auf zwei große Platten skaliert, geerntet und lysiert. Es folgte eine Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose, wobei bei jedem Schritt eine Probe entnommen wurde. Durch eine anschließende SDS-PAGE, gefolgt von einem Western-Blot, sollte das aufgereinigte Konstrukt sichtbar gemacht und eventuelle Interaktionspartner identifiziert werden (Abb. 10).

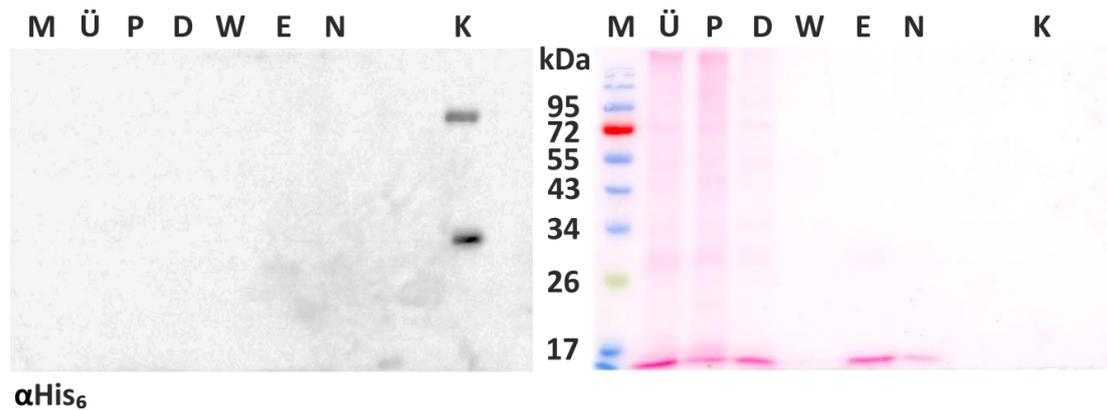


Abbildung 10 Ein Western-Blot zeigt keine Expression des PFPRX6-HIS₈-GFP-Konstrukts.

Insgesamt 3 ml Blut mit einer Parasitämie von 7-8 % wurden lysiert und mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Ponceau-Reagenz angefärbt (rechts) oder mit einem α His₆ primären und α Maus sekundären Antikörper (links) behandelt. Die Banden von links nach rechts sind M (Marker), Ü (Überstand), P (Pellet), D (Durchfluss), W (Waschschritt), E (Eluat), N (Ni-NTA-Säulenmaterial) und K (Kontrolle). Die erwartete Proteingröße des PfPrx6-His₈-GFP-Konstrukts beträgt ca. 57 kDa und die Größe der beiden Kontrollbanden beträgt für roGFP2^{C208S} ca. 28 kDa und für roGFP2^{C208S}-Dimer ca. 56 kDa.

Die Ponceau-Färbung zeigt eine Fülle an Proteinen im Überstand, im Pellet und im Durchfluss, was bedeutet, dass die Lyse der Parasiten und auch der Übertrag der Proteine auf die Membran erfolgreich war. Der Western Blot zeigt keine Bande in den aus der Zelle isolierten Fraktionen, lediglich das Signal der Positivkontrollen, das in *E. coli* rekombinant hergestellte Protein roGFP2 und sein Dimer, sind deutlich zu sehen.

Es wurde ebenfalls ein präliminärer Versuch unternommen, das Protein durch Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Hierfür wurden Ausstriche wie in Abschnitt 2.2.10.3. beschrieben mit Methanol fixiert, nicht aber mit Giemsa angefärbt. Es konnte jedoch kein Signal beobachtet werden.

Das potentielle Reduktionsmittel von PfPrx6 konnte somit nicht näher untersucht werden.

3.2. Interkonversationsstudie von ScGrx7 und HsGrx5

(Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten wurden bereits in Liedgens et al. 2020 [96] publiziert.)

Um festzustellen, welche Aminosäurereste oder -Sequenzen einen besonders großen Einfluss auf die katalytische Aktivität aktiver Glutaredoxine haben, wurden in dieser Arbeit zwei der in der Einleitung vier vorgestellten Bereiche genauer untersucht:

iii) Die Reste Arg152 und Arg153 in ScGrx7, die direkt am C-terminalen Ende der Helix 3 liegen.

Es wurde eine Mutante ScGrx7^{WP} erstellt, bei der die Mutationen R152W und R153P

eingefügt wurden. Diese Reste wurden aus dem inaktiven HsGrx5 übernommen, in welches wiederum die Mutationen W83R und P84R eingefügt wurden (HsGrx5^{RR}). Durch das Austauschen dieser Reste sollte ein aktives Grx in ein inaktives und ein inaktives Grx in ein aktives gewandelt werden.

- iv) Die verlängerte Schleife direkt am N-terminalen Ende des aktiven Zentrums. Während das inaktive HsGrx5 hier eine lange Schleife bestehend aus GTPEQPQ besitzt, hat das aktive ScGrx7 lediglich ein TG Motiv. Diese lange Schleife wurden in das aktive Grx eingefügt und eine Mutante ScGrx7^{loop} erstellt. Entgegengesetzt wurde wiederum für das inaktive Grx eine Variante HsGrx5^{loop} erstellt, in der die Schleife durch ein TG Motiv ersetzt wurde.

Zusätzlich wurden kombinierte Varianten ScGrx7^{WP+loop} und HsGrx5^{RR+loop} erstellt, in denen jeweils beide Sequenzen mutiert wurden. Ebenfalls wurde das Cystein 99 aus dem teilweise konservierten GGC-Motiv in allen genutzten HsGrx5-Varianten zu einem Serin mutiert, um ungewollte Nebenreaktionen zu vermeiden.

Alle Aktivitätsmessungen wurden mit GSSCys-Messungen wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt und bestanden aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Alle erhaltenen K_m^{app} , k_{cat}^{app} und k_{cat}^{app}/K_m^{app} Werte wurden graphisch aus Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burk-, Eadie-Hofstee- und Hanes-Diagrammen ermittelt und zeigten untereinander in der Regel Abweichungen von unter 10 % (Anhang 2 und 5). Zur weiteren Analyse wurden in einem Sekundärdiagramm jeweils der reziproke K_m^{app} und reziproke k_{cat}^{app} gegen die jeweilige reziproke GSH- oder GSSCys-Konzentration aufgetragen (Anhang 3 und 6). Der x-Achsenabschnitt des sekundären k_{cat}^{app} -Diagramms konnte abgelesen werden und stellt den negativen reziproken echten K_m Wert $-1/K_m$ dar. Der y-Achsenabschnitt konnte ebenfalls abgelesen werden und stellt den reziproken echten k_{cat} Wert $1/k_{cat}$ dar.

Da eine Ping-Pong Reaktion stets als zwei Teile einer ganzen Reaktion dargestellt werden kann, kann sie aufgeteilt werden in $[E]/V = \Phi_1/[GSSCys] + \Phi_2/[GSH]$. Φ_1 und Φ_2 sind die Dalzielkoeffizienten der jeweiligen Halbreaktionen. Φ_1 ist hier die Steigung des zuvor erzeugten Sekundärdiagramms für k_{cat}^{app} (GSSCys) und Φ_2 die Steigung des Sekundärdiagramms k_{cat}^{app} (GSH). Der reziproke Dalzielkoeffizient $1/\Phi_1$ kann nun als die apparente Geschwindigkeitskonstante für die oxidative Halbreaktion k_{ox}^{app} und $1/\Phi_2$ als die der reduktiven Halbreaktion k_{red}^{app} interpretiert werden.

Alle errechneten Werte können in Tabelle 13, sowie Anhang 4 und 7 nachgelesen werden.

3.2.1. Mutationen in ScGrx7 können zu proteolytischem Abbau des Proteins in *E. coli* führen

Alle hier verwendeten Grx-Konstrukte wurden in *E. coli* rekombinant hergestellt und besaßen einen *N*-terminalen His₆-Tag, mit dem sie über Ni-NTA-Agarose isoliert wurden. Nach der Aufreinigung der Proteine war zu beobachten, dass HsGrx5^{WT} eine starke Braunfärbung aufwies, die durch die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters hervorgerufen wird. Bei allen Mutanten des HsGrx5 fehlte diese Braunfärbung, was auf eine wichtige Rolle der Reste WP und der Schleife für eine stabile Bindung von Fe-S-Clustern hinweist. Für die Aktivitätsmessungen wurden Fe-S-Cluster durch die Zugabe von EDTA und anschließender Entsalzung über eine PD10-Säule entfernt. Nach dem Auftrennen durch eine SDS-PAGE werden Banden erwartet bei 21 kDa für das größere ScGrx7 und seine Mutanten und Signale bei 14-15 kDa für das kleinere HsGrx5 und Mutanten.

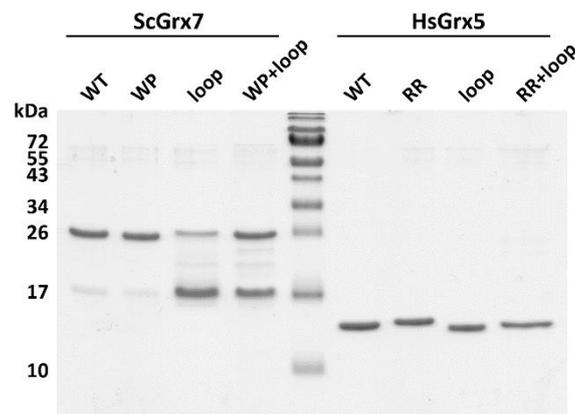


Abbildung 11 ScGrx7 und HsGrx5 konnten in großer Reinheit isoliert werden.

Proteineluat wurden zur Überprüfung ihrer Reinheit auf ein 15 % Polyacrylamidgel aufgetragen und in einer SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Links sind ScGrx7^{WT} und seine Mutanten ScGrx7^{WP}, ScGrx7^{loop} und ScGrx7^{WP+loop} zu sehen. Auf der rechten Seite sind HsGrx5^{WT} und seine Mutanten HsGrx5^{RR}, HsGrx5^{loop} und HsGrx5^{RR+loop} dargestellt. Siehe auch Anhang Liedgens *et al.* 2020 [96]

Alle HsGrx5-Varianten konnten in großer Reinheit isoliert werden und zeigen keine Anzeichen von Abbau oder sonstigen Verunreinigungen. Das Entfernen der Schleife ist im Gel zu sehen und führt zu einem leicht schneller laufenden Protein, wie in den Banden Loop und RR+Loop zu sehen ist.

ScGrx7 und seine Mutanten konnten ebenfalls in großer Reinheit isoliert werden. Der Wildtyp und die WP-Mutante zeigen eine klar definierte Bande bei 26 kDa und erscheinen somit 5 kDa zu groß. Dieser *Shift* scheint proteinspezifisch zu sein und wurde schon in früheren Publikationen beobachtet [75, 83]. Das Einfügen der Schleife führt allerdings zu einer zweiten starken Bande bei ca. 17 kDa, was auf eine destabilisierende Wirkung dieser Sequenz und

einen anschließenden proteolytischen Abbau des Proteins hindeuten kann.

3.2.2. Zwei konservierte Argininreste in ScGrx7 gehören zur *Glutathion-Scaffold-Site*

Eine Mutation des aktiven ScGrx7 zu ScGrx7^{WP} führt zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität des Enzyms in der oxidativen Halbreaktion zu nur noch ca. einem Viertel von der des Wildtypenzym, mit reziproken Dalzielkoeffizienten von $7,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das Wildtypenzym und $1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Mutante. Auffällig ist auch der stark angestiegene K_m -Wert für GSSCys, der beispielsweise bei einer GSH-Konzentration von 500 μM um fast 200 % größer ist als der des Wildtyps.

Die reduktive Halbreaktion ist von dieser Mutation weniger betroffen und behält ca. 85 % ihrer Aktivität bei. Auffällig ist auch bei dieser Teilreaktion der K_m -Wert für GSH, der hier aber deutlich unter dem des Wildtyps liegt. Beide Ergebnisse zusammen legen die Vermutung nahe, dass das RR-Motiv einen wichtigen, jedoch nicht essenziellen Beitrag zur katalytischen Deglutathionylierung eines Substrats leistet. Weiterhin kann hier bestätigt werden, dass das Grx in einem Ping-Pong Mechanismus reagiert, was durch die parallelen Linien im Lineweaver-Burk-Diagramm gut veranschaulicht werden kann (Anhang 2).

Das Einfügen der Reste RR in HsGrx5^{WT} führte zu keiner Steigerung der katalytischen Aktivität. Wie beim Wildtyp war diese zu gering um sie zuverlässig bestimmen zu können ($\leq 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

3.2.3. Das inaktive HsGrx5 lässt sich durch das Entfernen einer konservierten Schleife aktivieren

Im Vergleich mit der WP Mutation zeigt das Einfügen der Schleife in ScGrx7^{WT} eine starke Abnahme der Aktivität, sowohl in der oxidativen als auch in der reduktiven Halbreaktion. Dies spiegeln die Dalzielkoeffizienten wieder, die mit $5,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $1,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um mehr als das hundertfache unter denen des Wildtypenzym liegen. Eine Abnahme in dieser Größenordnung lässt sich nicht nur durch den oben gezeigten Abbau erklären, sondern muss an einer starken mechanistischen Einschränkung liegen. Während der K_m -Wert sich für beide Teilreaktionen innerhalb eines Faktors zwei bewegt, liegt der k_{cat} der Mutante ScGrx7^{loop} zwischen 0,4 % und 0,8 % des Wildtyps.

Wird die Schleife in HsGrx5^{WT} entfernt, so weist die so erzeugte Mutante HsGrx5^{loop} eine deutliche Steigerung an Aktivität auf mit reziproken Dalzielkoeffizienten von etwa

$1,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die oxidative und $4,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die reduktive Halbreaktion. Der K_m -Wert von HsGrx5^{loop} für die Reaktion mit GSSCys liegt jedoch noch deutlich über dem des ScGrx7^{WT} und dem seiner Mutanten. Ob das Austauschen weiterer Aminosäuren wie beispielsweise des WP Motivs, das eben diesen K_m -Wert im ScGrx7^{WP} gegenüber dem ScGrx7^{WT} verringerte, die Aktivität noch weiter erhöhen kann, soll im nächsten Abschnitt untersucht werden. Der K_m -Wert der reduktiven Halbreaktion mit GSH ist für HsGrx5^{loop} hingegen deutlich geringer als der von ScGrx7^{WT}. Auch diese Tendenz konnte durch das Einfügen des WP-Motivs in ScGrx7^{WT} imitiert werden.

HsGrx5^{WT} lässt sich also von einem komplett inaktiven Wildtypen zu einem leicht aktiven HsGrx5^{loop} umwandeln, mit einer reduktiven Halbreaktion, die sogar schneller als die der ScGrx7^{loop}-Mutante ist. Die oxidative Halbreaktion von HsGrx5^{loop} ist für diese Mutante der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Auch HsGrx5^{loop} scheint nach dieser Mutation nach dem Ping-Pong-Prinzip zu reagieren, wie es anhand des Lineweaver-Burk-Diagramms zu sehen ist (Anhang 5).

3.2.4. Die Aktivität von HsGrx5^{loop} lässt sich durch das Einfügen von zwei Argininresten nicht weiter steigern

Um den Effekt beider mutierter Aminosäuremotive zu untersuchen, wurden ebenfalls Konstrukte mit beiden Mutationen erstellt.

Wie zu erwarten, verringert sich die Aktivität des ScGrx7^{WP+loop} mit beiden Mutationen weiter. Die entsprechenden reziproken Dalzielkoeffizienten für Oxidation und Reduktion betragen jeweils $1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und sind somit kleiner als die der jeweiligen Einzelmutanten ScGrx7^{WP} und ScGrx7^{loop}. Vergleicht man ScGrx7^{WP+loop} mit ScGrx7^{loop}, fällt auf, dass das zusätzliche Einfügen der Reste Tryptophan und Prolin einen ähnlichen Effekt hat wie das Einfügen dieser Reste in das Wildtypenzym ScGrx7^{WT} zu ScGrx7^{WP}: eine vier- bis fünffach langsamere oxidative Halbreaktion und nur einen kleinen Effekt auf die reduktive Halbreaktion. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich der Reaktionsmechanismus von ScGrx7^{loop} und ScGrx7^{WP+loop} durch das Einfügen der Schleife nicht grundlegend ändert und die Katalyse nur langsamer stattfindet. Diese Annahme bestätigt sich auch bei der Betrachtung der K_m -Werte wieder. Die Reste WP vergrößern diesen sowohl beim Einfügen in den Wildtyp, als auch nach dem Einfügen in die ScGrx7^{loop}-Mutation für GSSCys um das zwei- bis dreifache und verringern ihn für die Bindung mit GSH um das zwei- bis vierfache. Auch ScGrx7^{loop+WP}

katalysiert die Reduktion von GSSCys im Ping-Pong-Mechanismus.

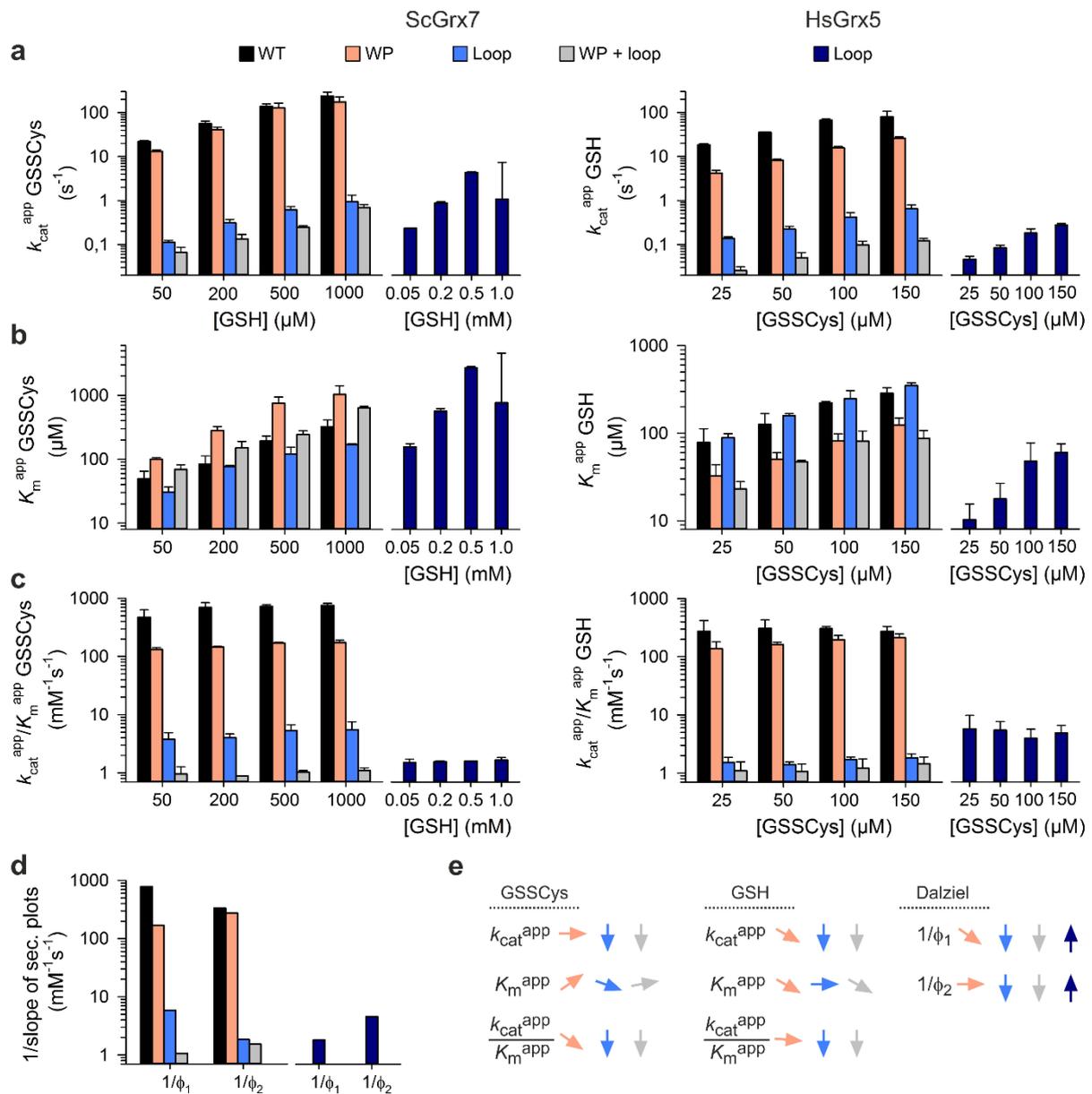


Abbildung 12 Die Schleife am aktiven Zentrum ist ein wichtiger struktureller Unterschied zwischen enzymatisch aktiven und inaktiven Glutaredoxinen.

a, b Ausgewählte k_{cat}^{app} und K_m^{app} Werte von ScGrx7^{WT}, ScGrx7^{WP}, ScGrx7^{loop}, ScGrx7^{WP+loop} und HsGrx5^{loop}. **c** Errechnete katalytische Effizienz aus Graphen a und b. **d** Reziproke Dalzielkoeffizienten können als Geschwindigkeitskonstante für die oxidative Halbreaktion mit GSSCys ($1/\phi_1$) und die reduktive Halbreaktion mit GSH ($1/\phi_2$) interpretiert werden. **e** Zusammenfassung der Veränderungen der Kinetikparameter. Zahlenwerte befinden sich in Tabelle 13. Fehlerbalken wurden in SigmaPlot13 errechnet und geben die Standardabweichung der drei biologischen Replikate wieder. Siehe auch Liedgens *et al.* 2020 [96]

Während sich bei ScGrx7^{WP} und ScGrx7^{loop} die Effekte der beiden Mutationen beim Zusammenfügen zu einer Doppelmutante nahezu addiert haben, ist dies für HsGrx5^{RR} und HsGrx5^{loop} nicht der Fall. Fügt man der HsGrx5^{loop} Mutante eine zusätzliche RR Mutation

hinzu, so verliert HsGrx5^{RR+loop} seine zuvor gewonnene Aktivität wieder. Eine Erklärung kann eine mögliche Instabilität des Enzyms sein. Auffällig war für diese Mutante, dass sich nach bereits einem Tag im Kühlschrank bei 4 °C deutliches Präzipitat und Trübheit feststellen lies, während für andere Grx-Konstrukte nach bis zu einer Woche keine sichtbaren Veränderungen zu erkennen waren.

Tabelle 13 Vergleich der ungefähren k_{cat} und K_m Werte und Dalziel-Koeffizienten Φ_1 und Φ_2 von ScGrx7 und HsGrx5 und deren Mutanten.

	$1/\Phi_1^a$	$1/\Phi_2^a$	$k_{cat} \text{ (GSSCys)}^a$	$k_{cat} \text{ (GSH)}^a$	$K_m \text{ (GSSCys)}^a$	$K_m \text{ (GSH)}^a$
ScGrx7	($M^{-1}s^{-1}$)	($M^{-1}s^{-1}$)	(s^{-1})	(s^{-1})	(μM)	(μM)
WT	7.8×10^5	3.3×10^5	492	334	427	1479
WP	1.7×10^5	2.8×10^5	312	496	2953	1134
loop	5.8×10^3	1.9×10^3	1.9	1.5	262	1013
WP+loop	1.1×10^3	1.5×10^3	0.4	0.7	694	265
	$1/\Phi_1^b$	$1/\Phi_2^b$	$k_{cat} \text{ (GSSCys)}^b$	$k_{cat} \text{ (GSH)}^b$	$K_m \text{ (GSSCys)}^b$	$K_m \text{ (GSH)}^b$
HsGrx5^c	($M^{-1}s^{-1}$)	($M^{-1}s^{-1}$)	(s^{-1})	(s^{-1})	(μM)	(μM)
WT	/	/	/	/	/	/
RR	/	/	/	/	/	/
loop	1.8×10^3	4.6×10^3	∞	∞	∞	∞
WP+loop	74	/	/	/	/	/

^a Dalzielkoeffizienten, k_{cat} und K_m -Werte wurden aus den Graphen in Anhang 3 errechnet. Die echten k_{cat} und K_m -Werte müssen mit Bedacht interpretiert werden aufgrund der Nähe der Achsenabschnitte zum Ursprung des Graphen.

^b Dalzielkoeffizienten, k_{cat} und K_m -Werte wurden aus den Graphen in Anhang 6 errechnet. Die echten k_{cat} und K_m -Werte müssen mit Bedacht interpretiert werden aufgrund der Nähe der Achsenabschnitte zum Ursprung des Graphen.

^c Abgesehen von HsGrx5^{loop} war die Aktivität der HsGrx5-Konstrukte ähnlich der der Negativkontrolle ohne Grx (Tendenz: HsGrx5^{RR+loop} > HsGrx5^{WT} > HsGrx5^{RR}).

3.3. PfGrx kann GSNO direkt reduzieren

(Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten wurden bereits in Zimmermann et al. 2021 [126] publiziert.)

Da die Rolle von GSNO (S-Nitrosoglutathion) in der Zelle noch weitgehend ungeklärt ist [138], sollte untersucht werden, ob auch GSNO ein Substrat von Grx ist. Dies sollte mithilfe des Reporterproteins roGFP2 nachgewiesen werden. PfGrx ist in der Lage Oxidationsäquivalente

von sich selbst auf roGFP2 zu übertragen, welches bei einer Oxidation eine Änderung in seiner Fluoreszenz zeigt und somit spektrometrisch ausgelesen werden kann. Vorangegangene Experimente aus der Arbeitsgruppe von Bruce Morgan zeigten, dass eine Hefekultur mit einem roGFP2-Grx-Fusionskonstrukt, die mit GSNO behandelt wird, eine starke Antwort in diesem Sensor-Reporter Komplex zeigt [126]. Unklar jedoch war, ob es sich hierbei um eine direkte Reaktion des Grx mit GSNO handelt, oder ob diese Reaktion zuvor von einem anderen Zellbestandteil katalysiert wurde, z. B. unter Bildung von GSSG. Hiefür wurden isoliertes und reduziertes roGFP2 und PfGrx mit GSNO in der *Stopped-flow* gemischt und die Fluoreszenzänderung bei 484 nm aufgenommen.

Abbildung 13 a und d zeigen, dass GSNO direkt mit roGFP2 reagiert. In dieser Reaktion ist kein Grx vorhanden, sodass die Oxidation von roGFP2 nur durch direkten Transfer von Oxidationsäquivalenten von GSNO erklärt werden kann. Die Geschwindigkeit ist mit ca. $850 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für eine unspezifische Interaktion relativ groß, was zum einen durch das negative Redoxpotential von roGFP2 hervorgerufen wird, aber andererseits auch auf eine große Reaktivität von GSNO hinweist.

Im Vergleich mit der Negativkontrolle, die kein Grx enthielt, läuft die Oxidation von roGFP2 in Anwesenheit von Grx deutlich schneller ab. Durch Monothiol PfGrx^{C32/88S} wird die Oxidation des roGFP2 bei kleinen GSNO-Konzentrationen um das etwa 20-fache auf $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beschleunigt, das Dithiol PfGrx^{C88S} beschleunigt die Reaktion um etwa das 10-fache auf $7,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Abb. 13 b, c, d). Dies bedeutet, dass Grx direkt GSNO reduziert und die *in cellulo* beobachteten Vorgänge vermutlich auf eine direkte Reaktion mit Grx hinweisen. Bei größeren Substratkonzentrationen flacht die Kurve ab und zeigt eine Steigung, die wieder der Reaktion von roGFP2 alleine mit GSNO entspricht. Dies weist auf eine Sättigung des durch PfGrx katalysierten Übertrags der Oxidationsäquivalente auf roGFP2 hin. Keines der Sekundärdiagramme konnte durch einen hyperbolischen Fit gut angenähert werden.

Die hier gemessenen Reaktionskonstanten deuten jedoch, im Gegensatz zu den Messungen in Hefezellen, lediglich auf eine moderate katalytische Aktivität des Grx hin. Es muss allerdings beachtet werden, dass hier zwei einzelne Proteine vermessen wurden. Im Falle eines Fusionskonstruktes ist eine Steigerung der Geschwindigkeit um mehrere 10er Potenzen zu erwarten.

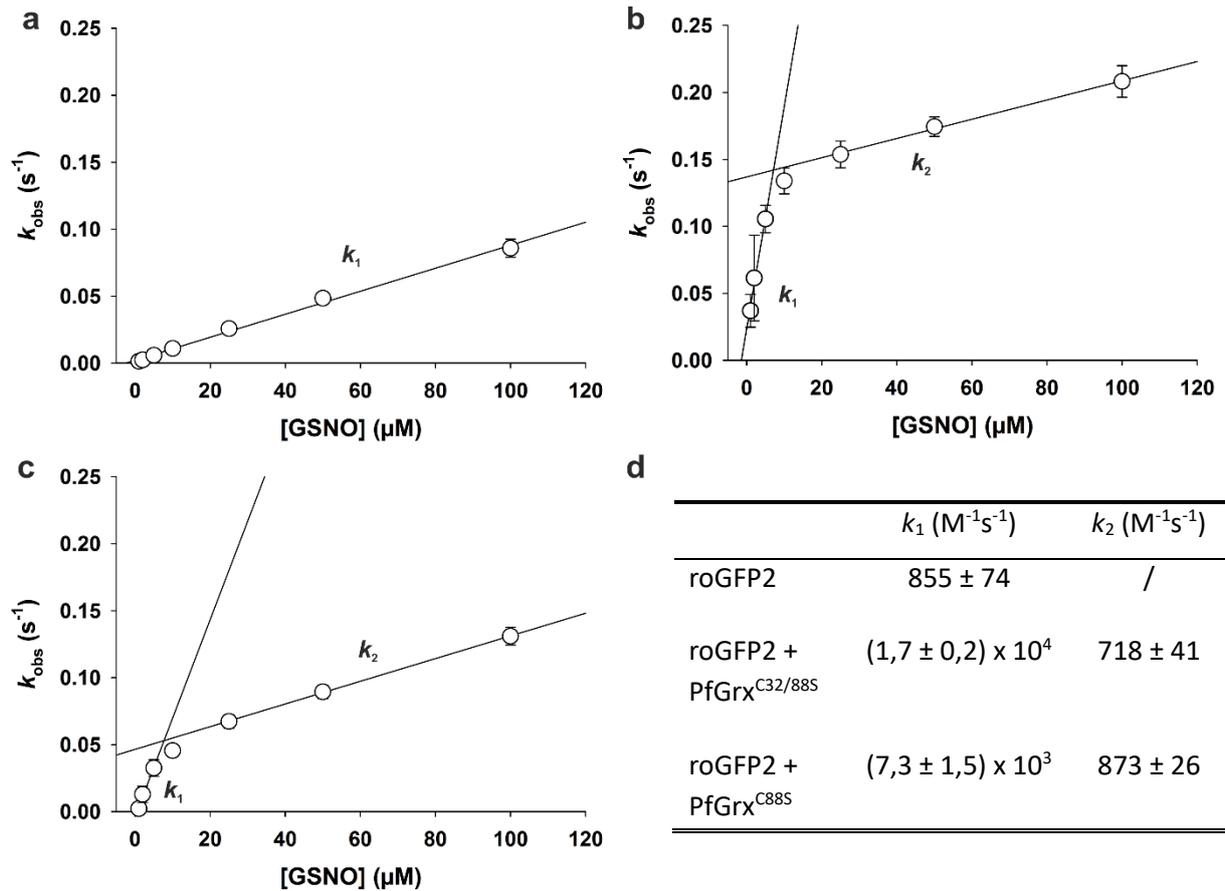


Abbildung 13 Die Oxidation von roGFP2 mit GSNO kann durch PfGrx katalysiert werden.

a Reaktion von roGFP2 mit GSNO in Abwesenheit von PfGrx. **b** Reaktion von roGFP2 mit GSNO in Anwesenheit von PfGrx^{C32/88S}. **c** Reaktion von roGFP2 mit GSNO in Anwesenheit von PfGrx^{C88S}. k_{obs} Werte für die hier gezeigten Sekundärdiagramme wurden durch exponentielle Fits der Primärdiagramme aus Anhang 8 erhalten und gegen die GSNO Konzentration aufgetragen. Die Steigungen der Fitgeraden in den Sekundärdiagrammen ergeben die Reaktionskonstanten k_1 und k_2 für die Reaktion mit GSNO. Die Werte sind in **d** aufgetragen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in SigmaPlot 13 aus 3 biologisch unabhängigen Replikaten errechnet.

3.4. Der Reaktionsmechanismus von roGFP2 und PfGrx

Das roGFP2 wurde zur Untersuchung von verschiedenen Redoxmilieus in Zellen und deren verschiedenen Kompartimenten entwickelt, meist als Fusionskonstrukt mit reaktiven Sensorproteinen. Dabei wurde stets davon ausgegangen, dass die Interaktion zwischen roGFP2 und dem Sensorprotein vernachlässigt werden kann und das roGFP2 verlässliche Signale aufgrund des Redoxstatus seines Fusionspartners weitergibt. Doch gibt es Limitationen dieses Übertrags? Zur Untersuchung dieser Interaktion wurde das PfGrx als Modellenzym gewählt. PfGrx ist ein Dithiol-Glutaredoxin aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und wies in früheren Messungen, in denen GSSCys oder HEDS als Substrat eingesetzt wurden, große

Aktivität auf. In dieser Arbeit sollte allerdings nicht nur der Dithiol-, sondern auch der Monothiol-Mechanismus untersucht werden. Es wurden folgende Konstrukte erstellt:

- a) PfGrx^{C88S} dient als Modell für Dithiol-Glutaredoxine. Es besitzt zwei Cysteine im aktiven Zentrum in einem CPYC-Motiv. Cys29 kann mit oxidierten Substraten reagieren und hiernach ein Disulfid mit Cys32 bilden. Das katalytisch nicht aktive C88 wurde zu einem Serin mutiert, um ungewollte Nebenreaktionen zu vermeiden.
- b) PfGrx^{C32/88S} besitzt nur noch das Cystein29 im aktiven Zentrum, während Cys32 zu einem Serin mutiert und somit inaktiviert wurde. Auch diese Mutante zeigt große Aktivität in früheren *in vitro* Kinetikmessungen und soll als Modell für Monothiol-Glutaredoxine dienen [83, 86, 139].
- c) roGFP2^{WT} ist der Elektronendonator oder, als Proteindisulfidssubstrat, -akzeptor des PfGrx, abhängig vom anfänglichen Oxidationszustand der beiden Reaktanden. Die Veränderung seiner Fluoreszenz bevor, während und nach der Reaktion mit Grx wird ausgelesen und ausgewertet.
- d) roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} sind Mutanten, bei denen jeweils eines der Cysteine, deren Disulfidbrücke die starke Fluoreszenzänderung (Abb. 14) verursacht, zu einem Serin mutiert wurde. Eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Resten ist somit nicht mehr möglich und es soll untersucht werden, ob beide Reste oxidiert oder reduziert werden können, und ob dies eine Änderung des Fluoreszenzspektrums bewirkt.
- e) roGFP2-PfGrx^{WT}, roGFP2-PfGrx^{C88S} und roGFP2-PfGrx^{C32/88S} sind Fusionskonstrukte der beiden Proteine. Es soll untersucht werden, ob das Signal des roGFP2 die gleiche Kinetik aufweist, wie sie in *Steady-state* Kinetikmessungen des Grx ohne roGFP2 bereits bestimmt wurden.

Alle verwendeten Konstrukte wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt und morgens über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Proteine wurden noch am selben Tag, wie in Material und Methoden beschreiben, reduziert oder oxidiert und in der *Stopped-flow* Apparatur vermessen. Die komplett reduzierten und komplett oxidierten Spektren des roGFP2 sind in Abbildung 14 gezeigt. Die Anregungswellenlänge variierte hier zwischen 200 nm und 600 nm und es wurde die Gesamtfluoreszenz gemessen.

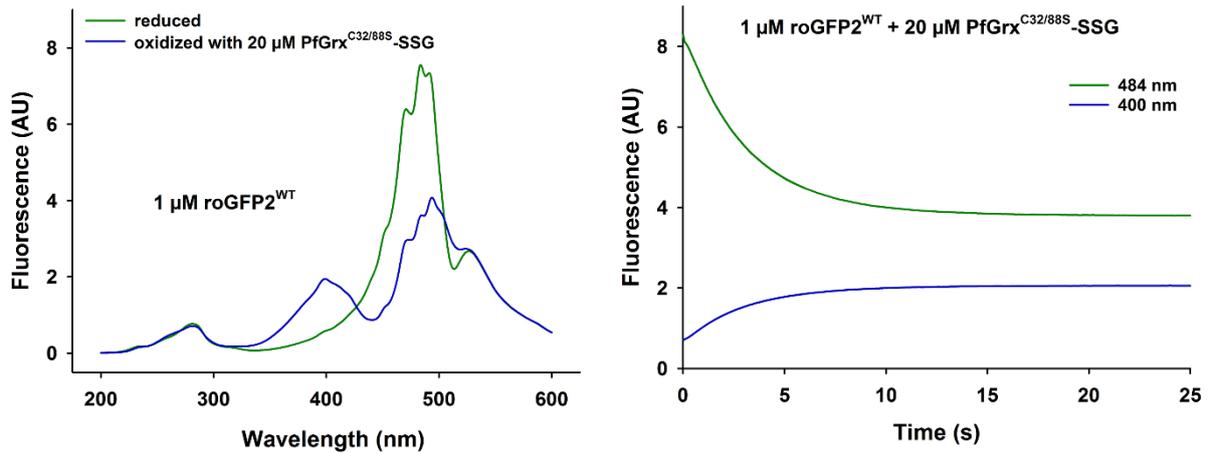


Abbildung 14 Oxidiertes und reduziertes roGFP2 zeigen unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften.

Links: Fluoreszenzspektrum von 1 µM roGFP2 in reduzierter Form (grün) und oxidierte Form (blau), 2 Minuten nach der Reaktion mit 20 µM PfGrx^{C32/88S}-SSG. Rechts: Zeitlich aufgenommene Fluoreszenzänderung von 1 µM reduziertem roGFP2 bei einer Anregungswellenlänge von 484 nm (grün) und 400 nm (blau) am Beispiel der Reaktion mit 20 µM PfGrx^{C32/88S}-SSG.

Wie in der Literatur beschrieben, zeigt das oxidierte Spektrum zwei charakteristische Maxima bei 400 nm und bei 484 nm. Wird das roGFP2 reduziert, verliert es seine Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm, wobei der 484 nm Peak um etwa das Zweifache zunimmt. Die hier bestimmten Maxima wurden als Grundlage für zeitabhängige Messungen bei einer konstanten Wellenlänge genommen. Das bei 280 nm zu sehende dritte Maximum ist proteintypisch und wird hauptsächlich durch Absorption von den Resten Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin hervorgerufen und hat keinen Einfluss auf die hier vorgenommenen Messungen.

Die folgenden Kinetikmessungen wurden meist in biologischen Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Für jede Messung wurde mindestens einmal sowohl die zeitabhängige Veränderung bei 484 nm als auch bei 400 nm aufgenommen. Die gemessenen k_{obs} -Werte (im folgenden Abschnitt erklärt), jeweils bei 484 nm und 400 nm, wichen stets weniger als 10 % voneinander ab, sodass die Reaktionskinetiken für Konstrukte mit roGFP2^{WT} und roGFP2^{C208S} immer lediglich bei 484 nm aufgenommen wurden. Die roGFP2^{C151S} Mutante wurde bei 400 nm gemessen, da die Änderung der Fluoreszenz hier größer war und ein Fit zuverlässiger angesetzt werden konnte.

Die Messung wurde durch Mischen der Reaktanden gestartet, die Fluoreszenz für 1-1000 s aufgenommen und die so erhaltenen Primärgraphen wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben

gefittet.

Es wurde ein Fit für jede variierte Konzentration der roGFP2-Substrate angefertigt und die so erhaltenen k_{obs} -Werte in einem Sekundärdiagramm gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Steigung einer linearen Regression durch diese Punkte ergab den konzentrationsabhängigen echten k -Wert der Reaktion.

3.4.1. roGFP2 und PfGrx – Die Einzelschritte der oxidativen Halbreaktionen

Um den Reaktionsmechanismus zwischen roGFP2 und PfGrx besser zu verstehen, wurde das Fusionskonstrukt zunächst in seine zwei Einzelproteine getrennt. Da die Reaktionsgeschwindigkeit von PfGrx mit seinem oxidierten Substrat in diesem Teil nicht von Bedeutung sein sollte, wurde PfGrx mit GSSG oder Diamid voroxidiert und roGFP2 mit DTT vorreduziert. Die roGFP2-Konzentration wurde konstant bei 1 μM belassen, während die Grx-Konzentration zwischen 1-40 μM variiert wurde. Es sollten die Reaktion von Monothiol- und Dithiol-Grx sowie der Einfluss der Art der Oxidation, also glutathionyliert oder nicht-Glutathion-Disulfid, auf die Reaktion untersucht werden. Hierzu wurden vier verschiedene Vorbehandlungen vorgenommen:

- 1) PfGrx^{C88S}-S₂, oxidiert durch Diamid. Das Diamid wurde nach 1 h Inkubation auf Eis wieder entfernt.
- 2) PfGrx^{C88S}-SSG, oxidiert durch GSSG. Das GSSG wurde nach 1 h Inkubation auf Eis wieder entfernt.
- 3) PfGrx^{C32/88S}-Dia, oxidiert durch Diamid. Das Diamid wurde nach 1 h Inkubation auf Eis wieder entfernt.
- 4) PfGrx^{C32/88S}-SSG, oxidiert durch GSSG. Das GSSG wurde nach 1 h Inkubation auf Eis wieder entfernt.

3.4.1.1. *roGFP2^{WT} lässt sich durch glutathionyliertes PfGrx schnell oxidieren, nicht aber durch das Grx-interne C29-C32-Disulfid*

Zunächst wurde der roGFP2-Wildtyp untersucht, wie er bereits in diversen *in cellulo* Tests etabliert ist. In Abbildung 15 ist die exponentielle Abnahme der Fluoreszenz bei 484 nm am Beispiel von glutathionyliertem Monothiol- und Dithiol-PfGrx-SSG für eines der biologischen Replikatе dargestellt. Die schwarze Linie zeigt hierbei die gemessenen Werte und die gestrichelte grüne die entsprechende Fitfunktion. Die Primärdiagramme zeigen für die

Reaktion von PfGrx^{C32/88S}-SSG mit reduziertem roGFP2 bereits bei der geringsten PfGrx-Konzentration eine nahezu vollständige Oxidation des roGFP2, was daran zu erkennen ist, dass die finale Fluoreszenz von ca. 4 AU erreicht wird. PfGrx^{C88S}-SSG zeigt eine langsamere Reaktion mit roGFP2 und erreicht innerhalb der gezeigten 100 s erst ab einer Konzentration von 5 μ M eine vollständige Oxidation des roGFP2. Es ist jedoch zu erwarten, dass es über einen längeren Zeitraum auch bei geringeren PfGrx^{C88S}-Konzentrationen zu einer kompletten Oxidation von roGFP2 kommt, wie es später durch einen mmPEG-Shift bestätigt wird. Das Reaktionsgleichgewicht liegt somit stark auf der Produktseite, also dem oxidierten roGFP2.

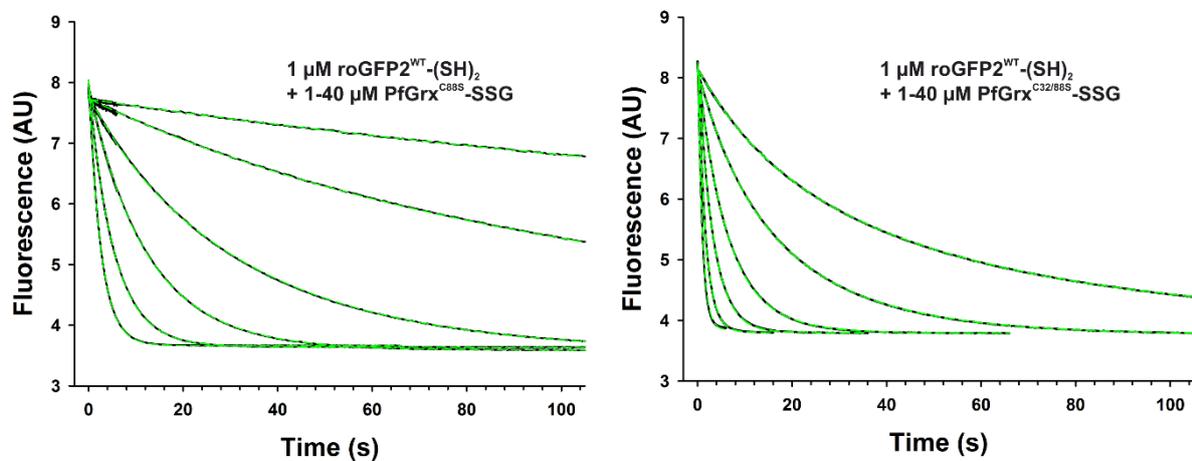


Abbildung 15 Oxidation von reduziertem roGFP2^{WT} durch PfGrx^{C88S}-SSG und PfGrx^{C32/88S}-SSG.

Primärdiagramme der Reaktion von 1 μ M reduziertem roGFP2 mit 1, 2, 5, 10, 20 und 40 μ M glutathionyliertem PfGrx^{C88S} (links) und PfGrx^{C32/88S} (rechts). Die Fluoreszenzänderung wurde bei einer Anregungswellenlänge von 484 nm über 100 s aufgenommen (schwarze Linie). Mit dem Programm SigmaPlot13 wurden exponentielle Fits an die Kurven angelegt, und somit k_{obs} -Werte für jede PfGrx-SSG Konzentration bestimmt. Diese k_{obs} -Werte wurden dann in einem Sekundärdiagramm gegen ihre Grx-Konzentration aufgetragen (Abb. 16).

Die durch den Fit erhaltenen k_{obs} -Werte wurden in Sekundärdiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen und anhand der Steigung der wahre k_{ox} -Wert der Reaktion zweiter Ordnung ermittelt. Die Sekundärdiagramme (Abb. 16) zeigen alle einen linearen Anstieg, was bedeutet, dass es bei dieser Reaktion kein Sättigungsverhalten gibt, bzw. die Geschwindigkeit noch nicht in einem gesättigten Bereich liegt. Außer bei der Reaktion von mit Diamid oxidiertem PfGrx^{C32/88S}-Dia und roGFP2, sind die Ergebnisse gut replizierbar und weisen nur geringe Abweichungen auf.

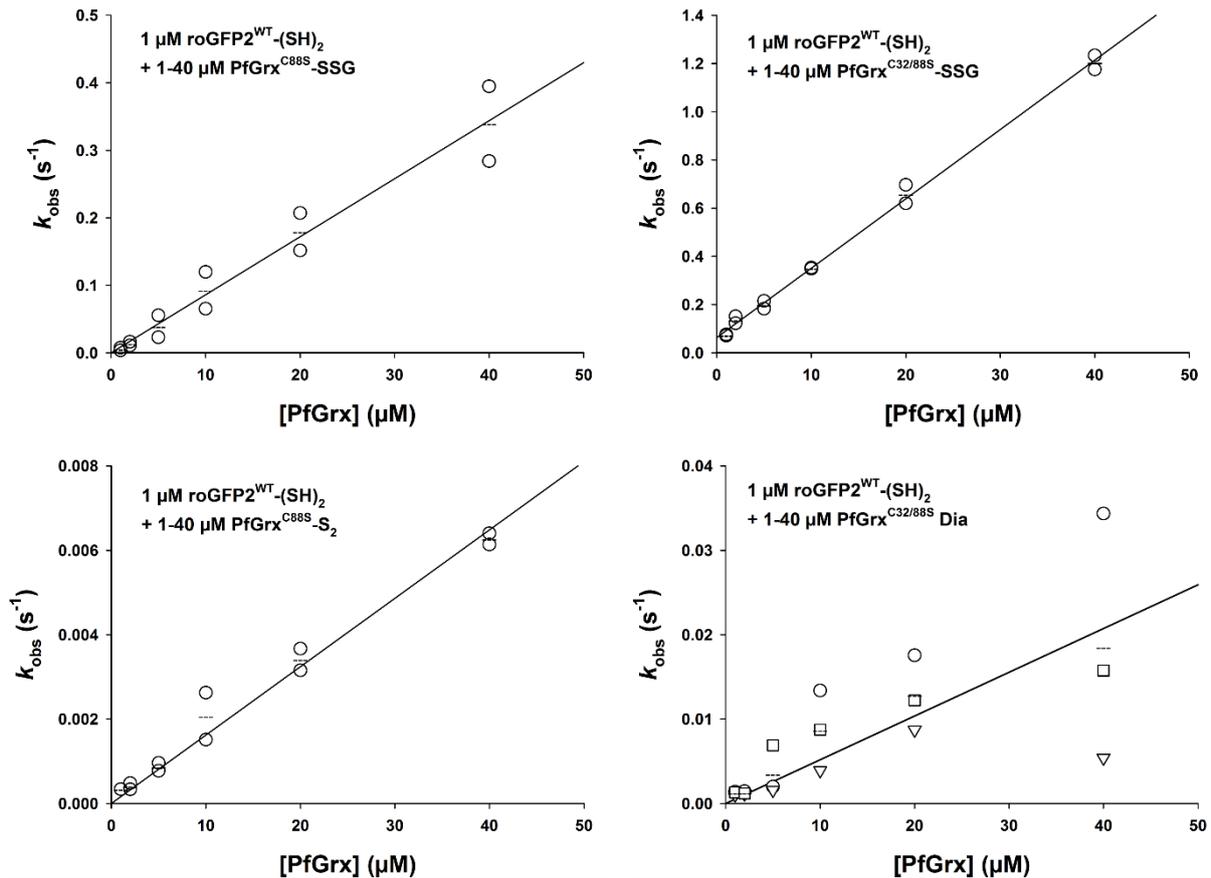


Abbildung 16 Sekundäradiagramme der oxidativen Halbreaktion von reduziertem roGFP2^{WT} durch voroxidiertes PfGrx.

Die aus den Primäradiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von 1 μM reduziertem roGFP2^{WT} mit 1-40 μM voroxidiertem PfGrx^{C88S} (links) und PfGrx^{C32/88S} (rechts) wurden in Sekundäradiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Die Steigung der linearen Fits durch die k_{obs} -Werte ergab den k_{ox} -Wert dieser Reaktion zweiter Ordnung (siehe Tabelle 15).

Die so erhaltenen k_{ox} -Werte sind in Tabelle 14 aufgeführt und in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Auffällig ist bei erster Betrachtung die deutlich langsamere Reaktion von PfGrx, das als Disulfid vorliegt, verglichen mit der der glutathionylierten PfGrx-Varianten. Mit einem k_{ox} von ca. $150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ist die Reaktionsgeschwindigkeit von PfGrx^{C88S}-S₂ ca. 50-fach langsamer als die von glutathionyliertem PfGrx^{C88S}-SSG, welches einen k_{ox} von ca. $8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufweist. Das Entfernen des zweiten Thiois im aktiven Zentrum, wie es bei PfGrx^{C32/88S} der Fall ist, scheint den Übertrag der Oxidation auf das roGFP2 ebenfalls zu beschleunigen. Die schnellste Reaktion wies somit das glutathionylierte PfGrx^{C32/88S}-SSG auf und war mit ca. $2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ noch einmal etwas mehr als dreimal schneller als PfGrx^{C88S}-SSG. Beim Betrachten des mit Diamid behandelten PfGrx^{C32/88S} ist eine deutliche Streuung der Werte zu erkennen (Abb. 16). Auch die Fits (nicht gezeigt) konnten nicht optimal an die aufgenommenen Kurven angelegt werden, weshalb der hier erhaltene Wert lediglich eine grobe Abschätzung der

Größenordnung dieser Reaktion darstellt. Es ist anzumerken, dass Diamid als ein Disulfid-erzeugendes Oxidationsmittel verwendet wird und sich somit zum Oxidieren von Monothiolsubstraten nicht eignet. In Anhang 9 ist zu sehen, dass dies zu der Dimerisierung von PfGrx^{C32/88S} führt, was vermutlich eine physiologisch nicht relevante Spezies darstellt.

Da die Reaktion von PfGrx^{C88S}-S₂ mit roGFP2^{WT} sehr langsam ist, ist es möglich, mithilfe eines mmPEG-Gelshifts weitere Informationen über diese Reaktion zu gewinnen. Hierbei wird ein Molekül mmPEG an reduzierte Thiolreste angefügt, was die Masse des Proteins um ca. 1,2 kDa erhöht. Oxidierte Cysteine können nicht PEGyliert werden und laufen in einer SDS-PAGE somit schneller als in ihrer reduzierten Form.

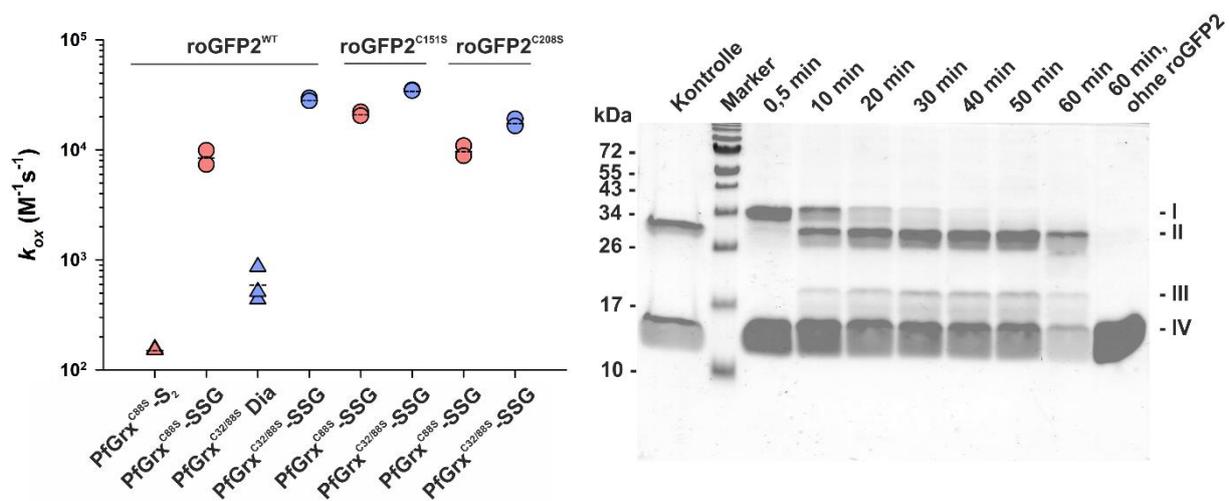


Abbildung 17 roGFP2 lässt sich effizient von glutathionyliertem PfGrx oxidieren, der Übertrag eines internen Disulfids ist jedoch langsam.

Links: Geschwindigkeitskonstanten k_{ox} für die oxidative Halbreaktion von roGFP2. Dieser Werte stellen die Steigung der Regressionsgerade der Sekundärdiagramme in Abbildung 16 dar. Rot steht für PfGrx^{C88S}, blau für PfGrx^{C32/88S}. Dreieck steht für mit Diamid vorbehandelte Grx, Kreis für glutathionylierte Grx. Rechts: mmPEG-Verschiebung während der Reaktion von reduziertem roGFP2 und oxidiertem PfGrx^{C88S}-S₂ im Laufe von 60 min. Ganz links ist eine Kontrolle beider Proteine in reduzierter Form ohne mmPEG, ganz rechts PfGrx^{C88S} in oxidiertem Form, ohne roGFP2. Die Banden können roGFP2-(2x)mmPEG (I), oxidiertem roGFP2-S₂ (II), PfGrxC88S-(2x)mmPEG (III) und oxidiertem PfGrx^{C88S}-S₂ (IV) zugeordnet werden.

Abbildung 17 zeigt rechts die Reaktion von 1 μ M roGFP2^{WT} mit 2 μ M PfGrx^{C88S}-S₂. Die erste Spur zeigt eine Kontrolle beider Proteine, in reduziertem Zustand ohne mmPEG. Rechts des Markers ist zu erkennen, dass das Grx zu Beginn der Reaktion komplett oxidiert und das roGFP2 komplett reduziert vorliegt. Über einen Zeitraum von ca. 40 min findet eine komplette Oxidation des roGFP2 statt, was die Beobachtungen den *Stopped-flow* Messungen bestätigt, dass das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des oxidierten roGFP2 liegt. Da PfGrx nach der vollständigen Oxidation von roGFP2 scheinbar nicht 50 % reduziert und 50 % oxidiert vorliegt,

muss allerdings davon ausgegangen werden, dass etwas mehr als zwei Äquivalente PfGrx^{C88S} in diesem Reaktionsansatz verwendet wurden. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass sich keine Bande im Bereich eines möglichen PfGrx-roGFP2 Dimers bildet, was bedeutet, dass die Interaktion der beiden Proteine nur transient ist und ein Dimer demnach schnell wieder aufgelöst wird. Die Ausbildung des Dimers stellt hier also den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.

Tabelle 14 Geschwindigkeitskonstanten der oxidativen Halbreaktion von roGFP2^{WT}, roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S}

Reduziertes roGFP2 ^{WT} +	Vorbehandlung	k_{ox} (M ⁻¹ s ⁻¹)
PfGrx ^{C88S}	Diamid	154 ± 3
PfGrx ^{C88S}	GSSG	(0,9 ± 0,2) × 10 ⁴
PfGrx ^{C32/88S}	Diamid	653 ± 303
PfGrx ^{C32/88S}	GSSG	(3,0 ± 0,2) × 10 ⁴
Reduziertes roGFP2^{C151S} +		
PfGrx ^{C88S}	GSSG	(2,14 ± 0,09) × 10 ⁴
PfGrx ^{C32/88S}	GSSG	(3,37 ± 0,02) × 10 ⁴
Reduziertes roGFP2^{C208S} +		
PfGrx ^{C88S}	GSSG	(0,99 ± 0,15) × 10 ⁴
PfGrx ^{C32/88S}	GSSG	(1,50 ± 0,16) × 10 ⁴

Die Werte zeigen Mittelwert ± Abweichung (errechnet mit Gleichung (I)) von n = 2 - 3 biologisch unabhängigen Replikaten.

3.4.1.2. *Die Oxidation von roGFP2 kann durch beide Cysteine vermittelt werden, schneller allerdings durch Cys208*

Um einen genaueren Einblick in die Oxidationskinetik des roGFP2 zu erhalten, wurden zwei Mutanten erstellt: roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S}. Cys151 und Cys208 sind die reaktiven Cysteine des roGFP2, deren Ausbildung einer Disulfidbrücke die starke Änderung im Fluoreszenzspektrum verursacht. Ob es eine Fluoreszenzänderung gibt und wie stark sie bei der Oxidation nur eines Cysteinrests ist, sollte hier untersucht werden. Zunächst wurden wie beim Wildtypenzym Spektren aufgenommen, wie sie in Abbildung 18 zu sehen sind. Hierfür wurde reduziertes roGFP2^{C151S} oder roGFP2^{C208S} mit 10 mM GSSG oxidiert und sowohl vor, als auch nach der Oxidation ein Spektrum aufgenommen.

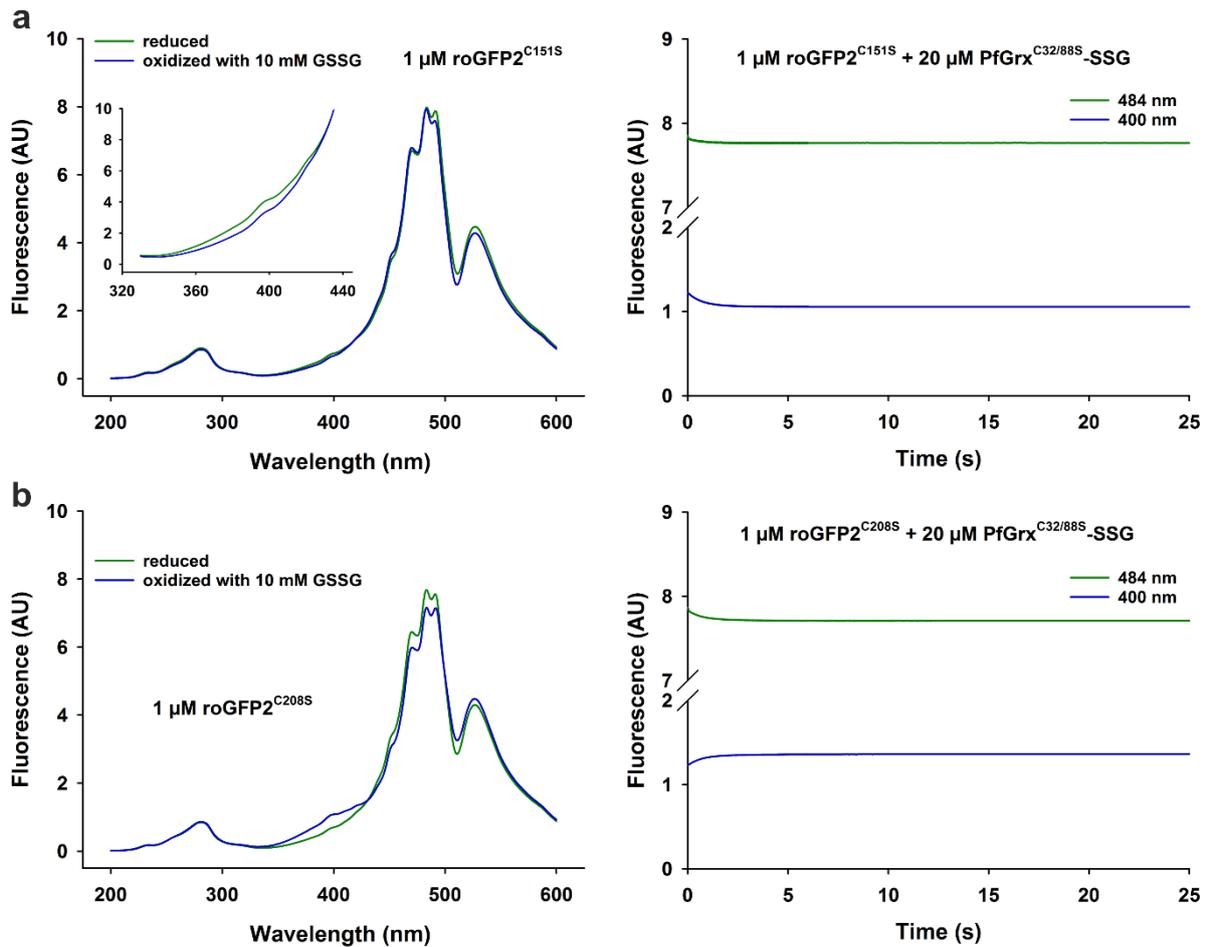


Abbildung 18 Oxidiertes und reduziertes roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} zeigen nur geringe Unterschiede in ihren Fluoreszenzeigenschaften.

Links: Spektrum von 1 μM roGFP2^{C151S} (a) oder roGFP2^{C208S} (b) in reduzierter Form (grün) und mit 10 mM GSSG oxidierten Form (blau). Rechts: Zeitliche Änderung der Fluoreszenz von 1 μM reduziertem roGFP2^{C151S} (a) oder roGFP2^{C208S} (b) bei einer Reaktion mit 20 μM PfGrx^{C32/88S}-SSG bei den Anregungswellenlängen 484 nm (grün) oder 400 nm (blau).

Im Vergleich mit dem roGFP2^{WT} zeigen die Mutanten eine deutlich geringere Änderung ihrer Fluoreszenz durch Oxidation oder Reduktion. Wird das Cys208 durch ein Serin ersetzt, so zeigt sich bei einer Oxidation eine kleine Abnahme des 484 nm Absorptionsmaximums und ein kleiner Anstieg bei 400 nm. Eine Substitution des Cys151 hingegen zeigt fast keine Veränderung bei 484 nm, aber eine messbare Abnahme bei 400 nm. Somit ist roGFP2^{C151S} die einzige Mutante, die bei der Oxidation eine inverse Verschiebung dieses Absorptionsmaximums zeigt.

Beim Betrachten dieser geringen Änderungen der Fluoreszenz kann zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass nur ein geringer Teil des roGFP2-Pools oxidiert wird, während der Großteil noch immer reduziert vorliegt.

Aus diesem Grund wurde ein weiterer Mobilitäts-*Shift*-Test durchgeführt (Abb. 19). Die erste Spur der hieraus resultierenden SDS-PAGE stellt eine nicht mit mmPEG behandelte Kontrollbande dar. Sie läuft zwischen 26 und 34 kDa und entspricht somit der Größe von roGFP2 mit ca. 28 kDa. Das Protein wurde hiernach entweder mit GSSG, oder mit GSSG und Diamid oxidiert. Das Hinzufügen von Diamid sollte die Bildung von GSH unterbinden und somit eventuelle Rückreaktionen vermeiden. Die Banden für reduzierte, mit mmPEG behandelte roGFP2-Mutanten (3 und 6) zeigen eine klare Verschiebung nach oben. Es ist also davon auszugehen, dass das mmPEG hier an reduzierte Thiolreste gebunden hat. Oxidiert man das roGFP2 vor der Behandlung mit mmPEG mit GSSG, so bleibt die Verschiebung aus. Eine Behandlung mit 10 mM GSSG kann das Protein also komplett oxidieren. Die aufgenommenen Spektren zeigen somit die maximale spektrale Veränderung, die die roGFP2-Mutanten annehmen können.

Es sind weitere schwache Banden im Bereich um 80 kDa in Spuren mit roGFP2^{C208S} und Banden um 70 kDa bei roGFP2^{C151S} zu sehen. Da diese Banden zu hoch für Dimere und unterschiedlich für die zwei Mutanten sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei lediglich um kleinere Verunreinigungen handelt.

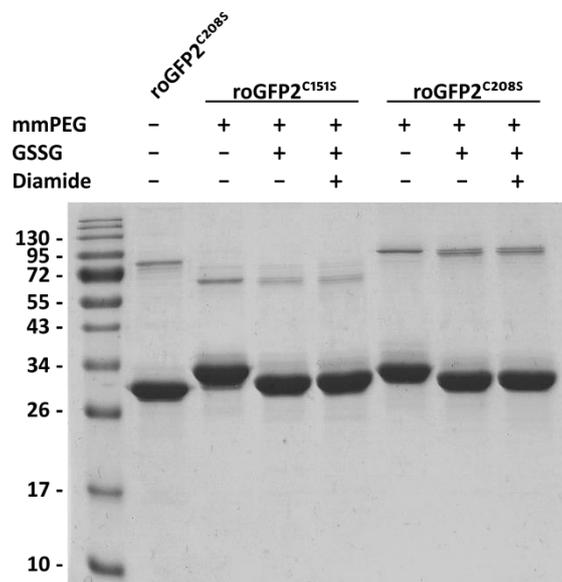


Abbildung 19 roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} lassen sich komplett glutathionylieren.

Die Zugabe von mmPEG verursacht eine Verschiebung von reduziertem roGFP2, nicht aber von oxidiertem. Erwartete Banden: roGFP2 (ca. 28 kDa), roGFP2-mmPEG (29-30 kDa).

Auf der Grundlage dieser Informationen wurden *Stopped-flow* Experimente analog zu 3.4.1.1. durchgeführt, jeweils mit den roGFP2-Mutationen C151S und C208S. Die primären Graphen (Abb. 20 und 21) der Reaktionen mit oxidierten PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} wurden ebenfalls mit

je einer Exponentialfunktion gefittet und in einem Sekundärdiagramm gegen die eingesetzte Grx-Konzentration aufgetragen (Abb. 23).

Es konnten lediglich Kinetiken für die Reaktion mit glutathionylierten Glutaredoxinen aufgenommen werden. Die Reaktion der mit Diamid behandelten Grx führte in Kombination mit beiden roGFP2-Mutanten zu keinerlei Änderung der Fluoreszenz.

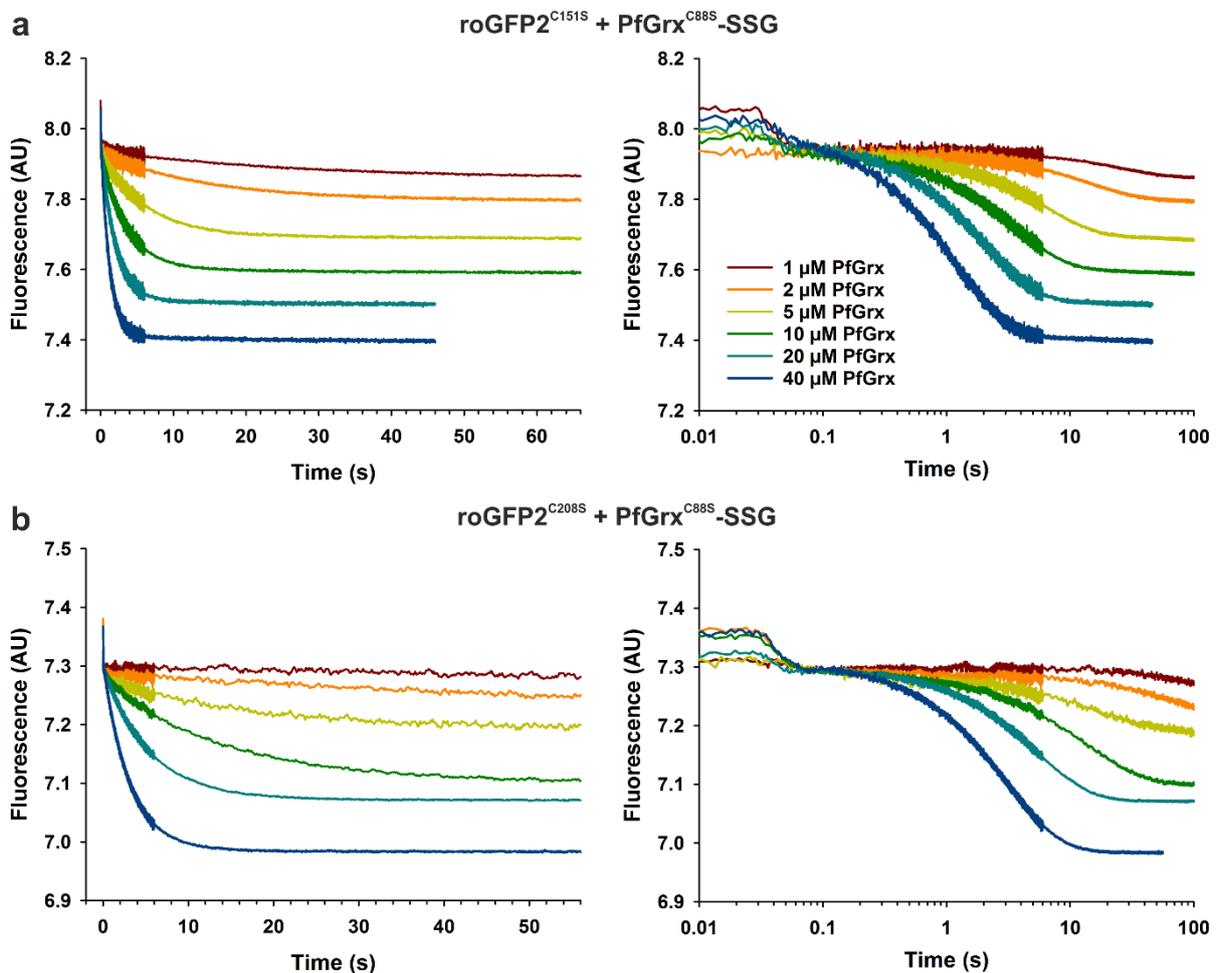


Abbildung 20 Primärdiagramme der oxidativen Halbreaktion von roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} mit PfGrx^{C88S}. Links zeigt eine lineare Zeitskala, rechts eine logarithmische. Zu sehen ist die Reaktion von glutathionyliertem PfGrx^{C88S} mit reduziertem (a) roGFP2^{C151S} mit $\lambda = 400$ nm und (b) roGFP2^{C208S} mit $\lambda = 484$ nm.

Auffällig bei der Betrachtung der Primärdiagramme ist, im Gegensatz zu Reaktionen mit roGFP2^{WT}, dass die Kurven bei geringeren Grx-Konzentrationen auf eine nicht vollständige Oxidation des roGFP2s hinweisen, da der gesamte Fluoreszenzabfall (C208S) bzw. -anstieg (C151S) bei höheren Grx-Konzentrationen deutlich größer ist als bei geringen (Abb. 20 und 21). Während die roGFP2^{C151S}-Variante bereits bei 5 Äquivalenten PfGrx^{C32/88S}-SSG eine komplette Oxidation zeigt, scheint das roGFP2^{C208S} selbst nach der Reaktion mit 20-fachem Überschuss noch nicht vollständig oxidiert vorzuliegen. Bei entsprechender Reaktion der roGFP2-Monothiolvarianten mit dem Dithiol-Grx^{C88S} zeigt sich ein noch flacherer Verlauf der

Primärgraphen. Demnach scheint das zweite Cystein im aktiven Zentrum das Redoxpotential des PfGrx zu senken.

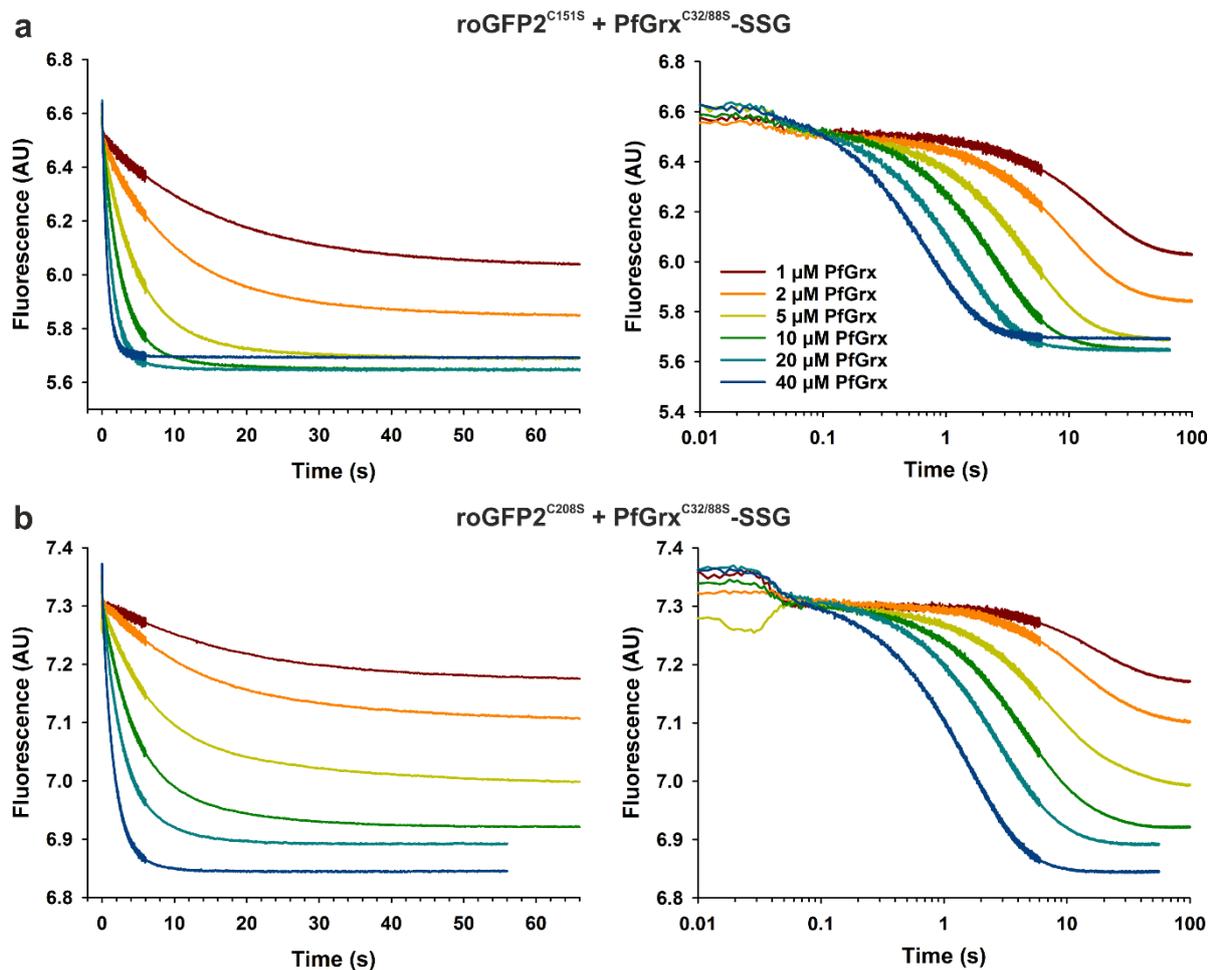


Abbildung 21 Primärdiagramme der oxidativen Halbreaktion von roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} mit PfGrx^{C32/88S}. Links zeigt eine lineare Zeitskala, rechts eine logarithmische. Zu sehen ist die Reaktion von glutathionyliertem PfGrx^{C32/88S} mit reduziertem (a) roGFP2^{C151S} mit $\lambda = 400$ nm und (b) roGFP2^{C208S} mit $\lambda = 484$ nm.

Um zu bestätigen, dass die nicht vollständige Abnahme der Fluoreszenz wirklich auf eine unvollständige Oxidation zurückzuführen ist, wurden SDS-PAGEs mit mmPEG-Shifts der entsprechenden Reaktionen angefertigt. Abbildung 22 zeigt links die Reaktion von roGFP2^{C151S} mit PfGrx^{C32/88S}-SSG. Die Konzentration von roGFP2 wurde hier stets bei 5 μ M gehalten, während PfGrx zwischen 2,5 und 50 μ M variiert wurde.

Eine nach oben verschobene Bande bedeutet wie zuvor erklärt, dass ein Molekül mmPEG an eine reduzierte Thiolgruppe binden konnte. Es ist zu erkennen, dass bei niedrigen Konzentrationen, bis hin zu 4 Äquivalenten PfGrx^{C32/88S}, keine vollständige Oxidation des roGFP2 stattfindet, was die vorherigen Beobachtungen bestätigt. Die rechte Seite von Abbildung 22 zeigt die Reaktion von roGFP2^{C151S} mit PfGrx^{C88S}, welches mit Diamid oxidiert wurde und somit ein internes Disulfid gebildet hat. Es ist zu erkennen, dass roGFP2 bei

steigender Grx-Konzentration reduziert bleibt, es also keine sichtbare Reaktion zwischen den beiden Proteinen gibt und somit kein stabiles Heterodimer erhalten bleibt, was die Beobachtung aus den *Stopped-flow* Messungen bestätigt.

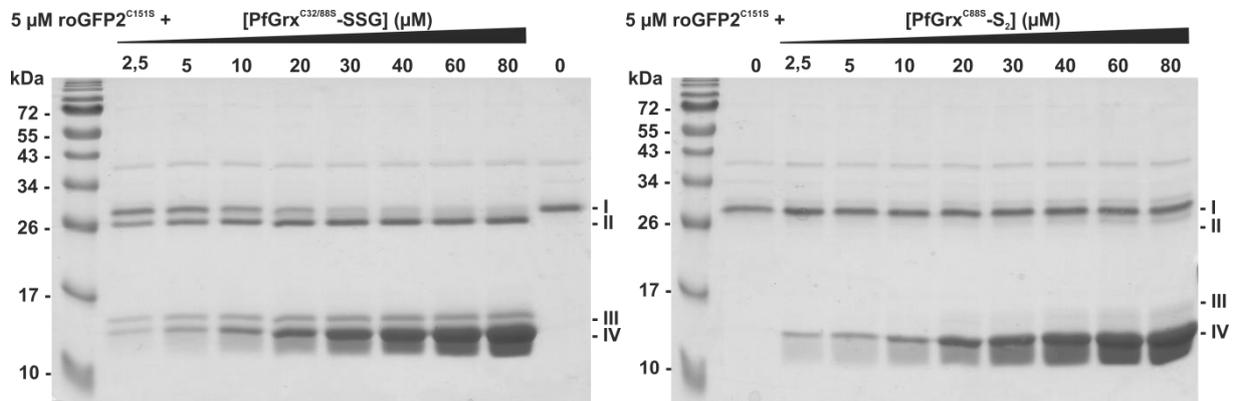


Abbildung 22 roGFP2^{C151S} und PfGrx^{C32/88S} besitzen ein ähnliches Redoxpotential.

Die Gele zeigen den Oxidationsgrad von zunächst 5 μM reduziertem roGFP2^{C151S} nach der Reaktion mit 2,5-50 μM PfGrx^{C32/88S}-SSG (links) und PfGrx^{C88S}-S₂ (rechts). Es sind Banden zu erwarten für PfGrx (IV, 13 kDa) PfGrx-mmPEG (III, 14 kDa), roGFP2C151S (II, 28 kDa) und roGFP2C151S-mmPEG (I, 29 kDa).

Die Primärdiagramme wurden wie vorher beschrieben gefittet und die k_{obs} -Werte in ein Sekundärdiagramm aufgetragen (Abb. 23). Die so erhaltenen Datenpunkte konnten mit einer Regressionsgeraden gefittet werden und ihre Steigung als wahrer k_{ox} -Wert errechnet werden (Abb. 23).

Wie in Abbildung 17 und Tabelle 14 abzulesen ist, reagiert glutathionyliertes Monothiol PfGrx^{C32/88S} am schnellsten mit den beiden roGFP2-Mutanten, mit ca. $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für roGFP2^{C151S} und $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für roGFP2^{C208S}. Damit ist es jeweils etwa 1,5-fach schneller als das glutathionylierte Dithiol PfGrx^{C88S}, mit je $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die beiden roGFP-Mutanten.

Ebenfalls zu erkennen ist, dass eine Reaktion beider Grx mit roGFP2^{C151S} etwa doppelt so schnell abläuft wie die entsprechende Reaktion mit roGFP2^{C208S}, was eine Präferenz von Substraten für das Cys208 hindeutet. Verglichen mit den Reaktionen von PfGrx^{C88S}-SSG und PfGrx^{C32/88S}-SSG mit reduziertem roGFP2^{WT}, liegen die hier gemessenen Teilreaktionen der roGFP2-Mutanten roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} im Bereich der im Wildtyp gemessenen Gesamtreaktionen. Die Ausbildung des roGFP2-internen Disulfid sollte demnach im Falle von zwei separaten Proteinen nicht geschwindigkeitsbestimmend sein, sondern der Übertrag des Oxidationsäquivalents von Grx auf das roGFP2.

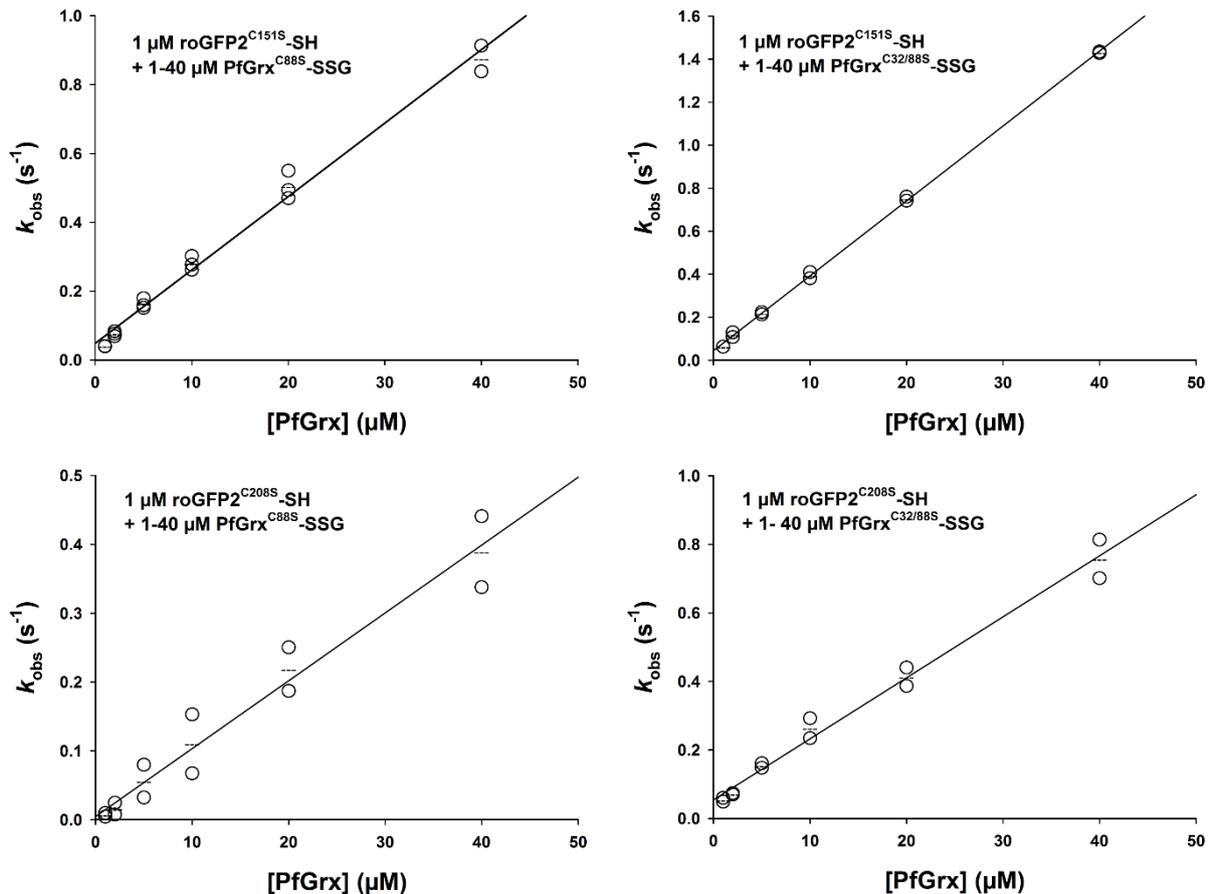


Abbildung 23 Sekundärdiagramme der oxidativen Halbreaktion von reduziertem roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C151S} durch glutathionyliertes PfGrx.

Die aus den Primärdiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von 1 μM reduziertem roGFP2^{C151S} (oben) und roGFP2^{C208S} (unten) mit 1-40 μM glutathionyliertem PfGrx^{C88S} (links) und PfGrx^{C32/88S} (rechts) wurden in Sekundärdiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Die Steigung der linearen Fits durch die k_{obs} -Werte ergab den k_{ox} -Wert dieser Reaktion zweiter Ordnung (siehe Tabelle 15).

3.4.2. roGFP2 und PfGrx – Die Einzelschritte der reduktiven Halbreaktion

Auch für die Untersuchung der reduktiven Halbreaktion wurden die Proteine wieder in getrennter Form eingesetzt. Einerseits sollte hier die Reduktionskinetik des roGFP2 untersucht werden, andererseits können auch interessante Informationen über die Interaktion des PfGrx mit einem Proteinsubstrat gefunden werden. Hierfür wurden 2 μM oxidiertes roGFP2 mit 2-80 μM reduziertem PfGrx^{C88S} oder PfGrx^{C32/88S} gemischt. Da GSH für die Reduktion durch Grx ein wichtiger Bestandteil ist, wurden der Grx-Lösung 0, 2, 5 und 10 mM GSH beigemischt. Es wurden vor der Reaktion ebenfalls 0,4 U/ml Glutathion-Reduktase und 250 μM NADPH zugegeben, um einen komplett reduziert vorliegenden GSH-Vorrat zu garantieren. roGFP2^{WT} wurde mit Diamid voroxidiert, roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} wurden mit GSSG voroxidiert.

3.4.2.1. PfGrx benötigt GSH zum Aufbrechen des roGFP2-Disulfids

Analog zur oxidativen Halbreaktion sollte hier zunächst der roGFP2 Wildtyp untersucht werden. Auffällig war hierbei, dass roGFP2^{WT} in Abwesenheit von GSH von keiner der beiden PfGrx-Varianten reduziert werden konnte. Erst die Zugabe von GSH führte zu einer Veränderung der in der *Stopped-flow* Apparatur detektierten Fluoreszenz. Abbildung 24 zeigt am Beispiel von PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} in Kombination mit 5 mM GSH ein für diese Reaktion aufgenommenes Primärdiagramm (schwarze Linien) und die an diese Kurven angelegten exponentiellen Fitfunktionen (gestrichelte grüne Linien). Die so erhaltenen k_{obs} -Werte wurden wiederum in Sekundärdiagrammen (Abb. 25 und 26) aufgetragen.

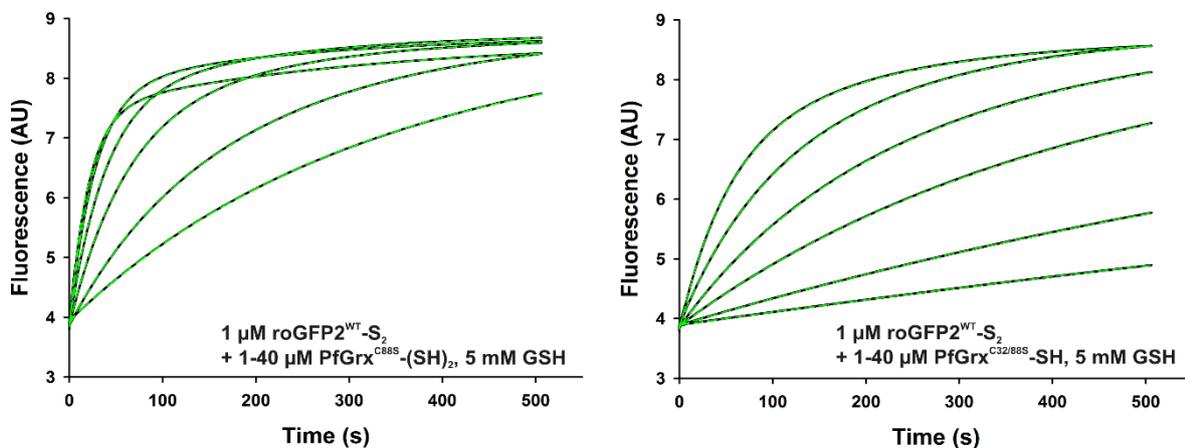


Abbildung 24 Reduktion von oxidiertem roGFP2^{WT} durch PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} in Anwesenheit von GSH.

Primärdiagramme der Reaktion von oxidiertem roGFP2 mit reduziertem PfGrx^{C88S} (links) und PfGrx^{C32/88S} (rechts) in Anwesenheit von 5 mM GSH, 125 µM NADPH und 0,2 U/ml GR. Die Fluoreszenzänderung wurde bei einer Anregungswellenlänge von 484 nm über 500 s aufgenommen (schwarze Linie). Mit dem Programm SigmaPlot13 wurden exponentielle Fits an die Kurven angelegt, und somit k_{obs} -Werte für jede PfGrx-SSG Konzentration bestimmt. Diese k_{obs} -Werte wurden in einem Sekundärdiagramm gegen ihre Grx-Konzentration aufgetragen (Abb. 25 und 26).

Beim Betrachten der Sekundärdiagramme fällt auf, dass für diese Reaktion, vor allem mit dem Dithiol-Grx, kein linearer Anstieg der k_{obs} -Werte zu erkennen ist (Abb. 25 und 26). Bei steigender Grx-Konzentration nähert sich die Kinetik einer gesättigten Maximalgeschwindigkeit an, welche abhängig von der beigemischten GSH-Konzentration ist.

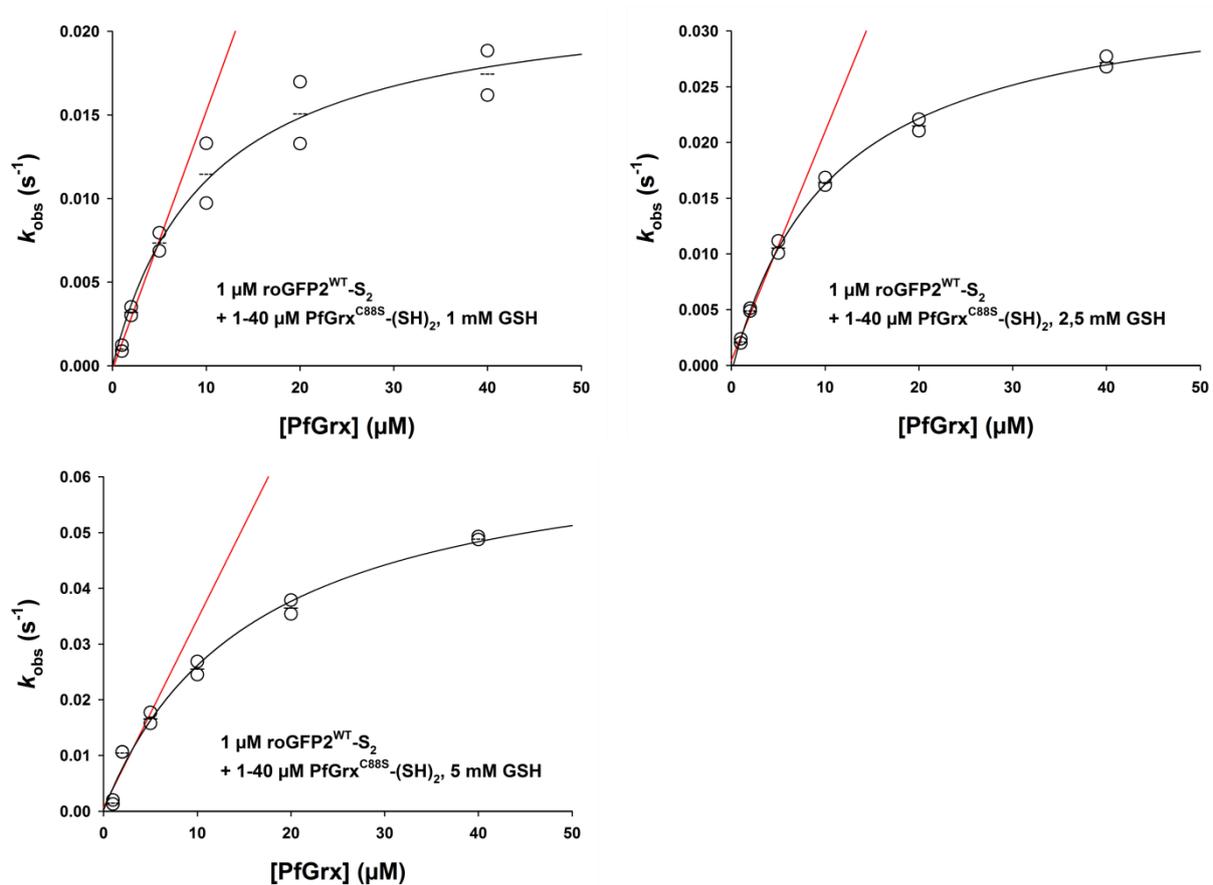


Abbildung 25 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2^{WT} mit reduziertem PfGrx^{C88S}.

Die aus den Primäradiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von 1 μM oxidiertem roGFP2^{WT} mit 1-40 μM PfGrx^{C88S} in Anwesenheit von 1, 2,5 oder 5 mM GSH wurden in Sekundäradiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Den Reaktionen wurde stets 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR zugesetzt. Durch die ersten drei Punkte wurde eine lineare Regression (rot) gefittet, welche als k_{red} interpretiert wurde (Tabelle 15) und die Reaktion zweiter Ordnung des PfGrx-GS-Komplexes mit roGFP2 bei verschiedenen GSH-Konzentrationen darstellt. Es wurde zusätzlich ein hyperbolischer Fit angelegt (schwarz), um das Sättigungsverhalten bei größeren PfGrx-Konzentrationen anzunähern.

Betrachtet man die Sekundäradiagramme von PfGrx^{C32/88S} (Abb. 26), so sieht man ein Verhalten, das zunächst linear erscheint. Lediglich bei der größten GSH-Konzentration von 5 mM ist ein hyperbolischer Verlauf der k_{obs} -Werte zu erkennen. Es ist anzumerken, dass die für PfGrx^{C32/88S} gemessenen k_{obs} -Werte deutlich kleiner als die der Dithiolvariante sind, die im Geschwindigkeitsbereich der C32/88S Variante ebenfalls noch einen nahezu linearen Anstieg zeigen. Dies lässt vermuten, dass auch die Monothiolvariante bei ausreichender Grx-Konzentration dieselbe Sättigung erreichen könnte.

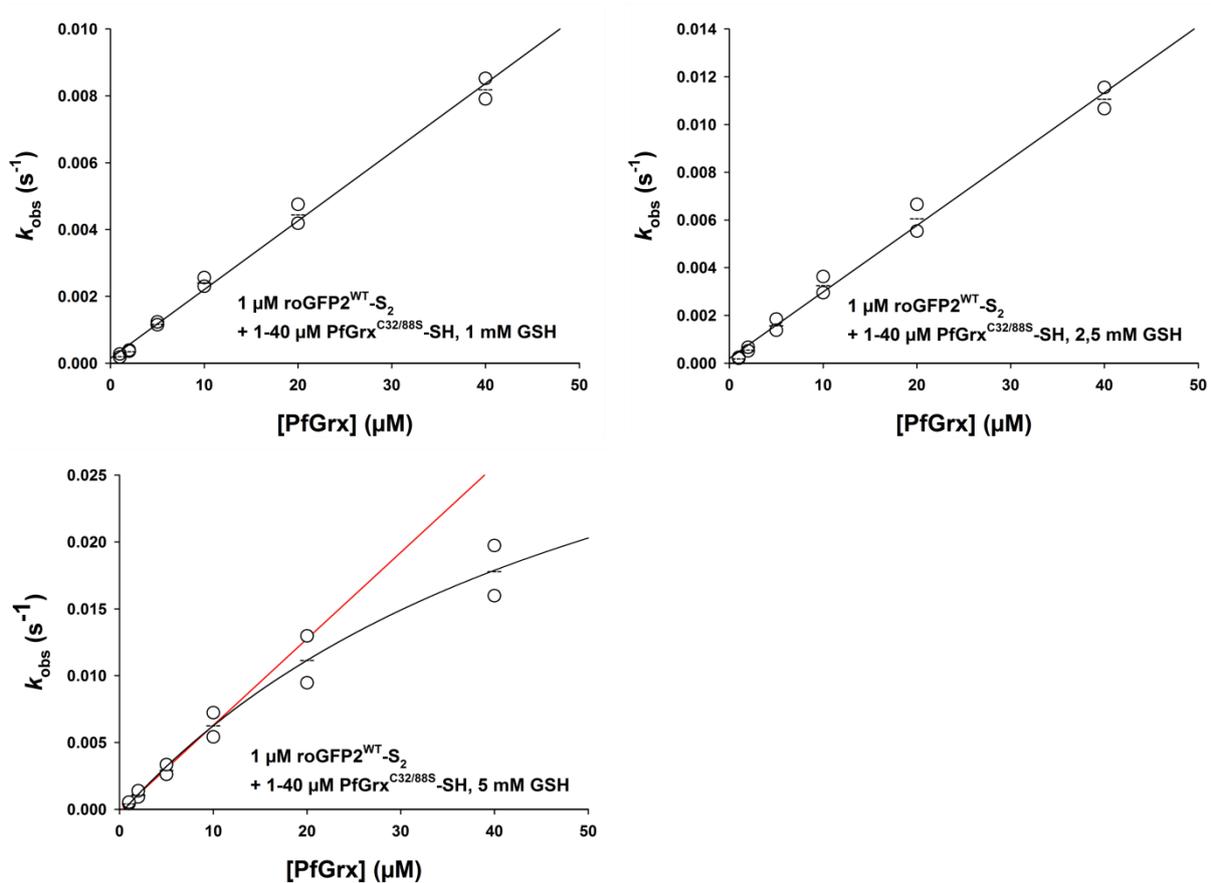


Abbildung 26 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2^{WT} mit reduziertem PfGrx^{C32/88S}.

Die aus den Primärdiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von 1 μM oxidiertem roGFP2^{WT} mit 1-40 μM PfGrx^{C32/88S} in Anwesenheit von 1, 2,5 oder 5 mM GSH wurden in Sekundärdiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Den Reaktionen wurde stets 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR zugesetzt. Es wurde ein linearer Fit durch alle Punkte (1 und 2,5 mM GSH, schwarz), oder durch die ersten vier Punkte (5 mM GSH, rot) gelegt eine lineare Regression gefittet, welche als k_{red} interpretiert wurde (Tabelle 15) und die Reaktion zweiter Ordnung des PfGrx-GS-Komplexes mit roGFP2 bei verschiedenen GSH-Konzentrationen darstellt. Es wurde zusätzlich ein hyperbolischer Fit für 5 mM GSH angelegt (schwarz), um das Sättigungsverhalten bei größeren PfGrx-Konzentrationen anzunähern.

Um das Sättigungsverhalten zu untersuchen, wurden für die Messungen mit PfGrx^{C88S} sowie für die Messung mit PfGrx^{C32/88S} bei höchster GSH-Konzentration (5 mM) hyperbolische Fits $k(c) = k_0 + \frac{a \cdot c}{b + c}$ angelegt, wobei c die PfGrx-Konzentration ist. Der so erhaltene Wert für a wurde als k_{cat} interpretiert und gibt die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion an. Bei niedrigster GSH-Konzentration von 1 mM weist das PfGrx^{C88S} einen k_{cat} von ca. 0,02 s⁻¹ auf, welcher sich durch Erhöhen der GSH-Konzentration bis auf 0,067 s⁻¹ steigern lässt (Anhang 10). Der bei der Reaktion des Monothiol-Grx bestimmte k_{cat} lag für diese GSH-Konzentration etwas niedriger bei 0,046 s⁻¹. Da allerdings bei dieser Reaktion nur der Anfang des hyperbolischen Verlaufs gefittet werden konnte, muss hier mit einer großen Ungenauigkeit gerechnet werden.

Es kann also angenommen werden, dass die für beide Grx erhaltenen k_{cat} -Werte in einem ähnlichen Bereich liegen.

Da die Reduktion des roGFP2 die simultane Anwesenheit von roGFP2, PfGrx und GSH benötigt, kann die Hemmung bei größeren Grx-Konzentrationen auf die sättigbare Ausbildung eines ternären Komplexes dieser drei Reaktanden hinweisen. Den Zahlenwerten k_{cat} selbst konnte keine konkrete Bedeutung zugeordnet werden.

Generell ist die Reduktion des roGFP2 durch PfGrx^{C88S} deutlich schneller als durch PfGrx^{C32/88S}, genau gegenteilig zu der oxidativen Halbreaktion. Mit den linearen Fits der ersten drei k_{obs} -Werte zeigt das Dithiol-Grx mit ca. $1,5 - 3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für GSH-Konzentrationen von 1-5 mM eine etwa zehnmal schnellere Reduktion des roGFP2, verglichen mit der Monothiol-Variante. Die jeweiligen k_{red} -Werte für die einzelnen GSH-Konzentrationen können erneut in einem Tertiärdiagramm gegen ihre GSH-Konzentration aufgetragen werden (Abb. 27) um eine Geschwindigkeitskonstante dritter Ordnung $k_{\text{red}}^{\text{tert}}$ von $7,3 \times 10^5 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ für PfGrx^{C88S} und $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ für PfGrx^{C32/88S} zu erhalten. Diese Werte geben die Reduktionsgeschwindigkeit von oxidiertem roGFP2 durch PfGrx und GSH an.

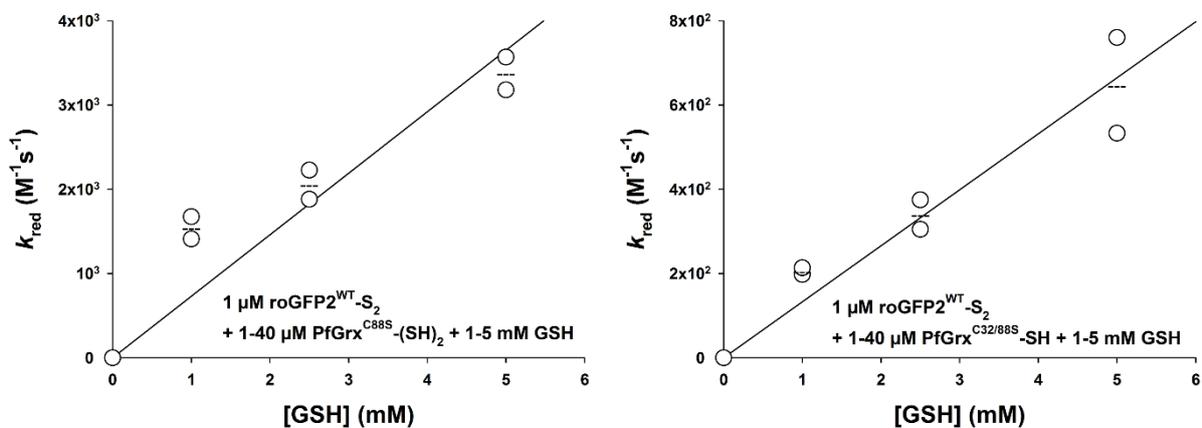


Abbildung 27 Tertiärdiagramme der Reaktion von oxidiertem roGFP2 mit reduziertem PfGrx und GSH.

Die aus Abbildung 25 und 26 erhaltenen k_{red} -Werte für verschiedene GSH Konzentrationen wurden gegen ihre GSH-Konzentration aufgetragen und linear gefittet. Die so erhaltenen $k_{\text{red}}^{\text{tert}}$ beschreiben näherungsweise die Reaktionen dritter Ordnung zwischen oxidiertem roGFP2, reduziertem PfGrx und GSH.

Zur Überprüfung dieser GSH-Abhängigkeit und zur Aufklärung der in Abbildung 5 gezeigten Reaktionsmechanismen, wurde ein weiterer Test unternommen. Es sollte überprüft werden, ob *S*-Methylglutathion (GSMe), ein Glutathionderivat, das eine Methylgruppe am Cystein besitzt und dieses somit inaktiviert, die Reaktion von roGFP2 und PfGrx kompetitiv hemmen kann, indem es die Bindungsstelle für GSH blockiert. Muss sich GSH nicht zunächst an das Grx anlagern und greift ohne eine Aktivierung des roGFP2 an, sollte keine Hemmung auftreten.

Hierfür wurde eine zuvor untersuchte Bedingung (1 μM oxidiertes roGFP2^{WT} mit 1-40 μM PfGrx^{C32/88S}, 1 mM GSH, 0,2 U/ml GR und 125 μM NADPH) zusätzlich mit 5 mM GSMe versetzt. Primär- und Sekundärdiagramm wurden entsprechend ausgewertet, letzteres konnte linear gefittet werden (Anhang 15). Die mit GSMe versetzte Probe zeigt mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{\text{red}}^{\text{comp}} = 138 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine etwa 1,5-fach langsamere Reaktion mit roGFP2 (Abb. 28).

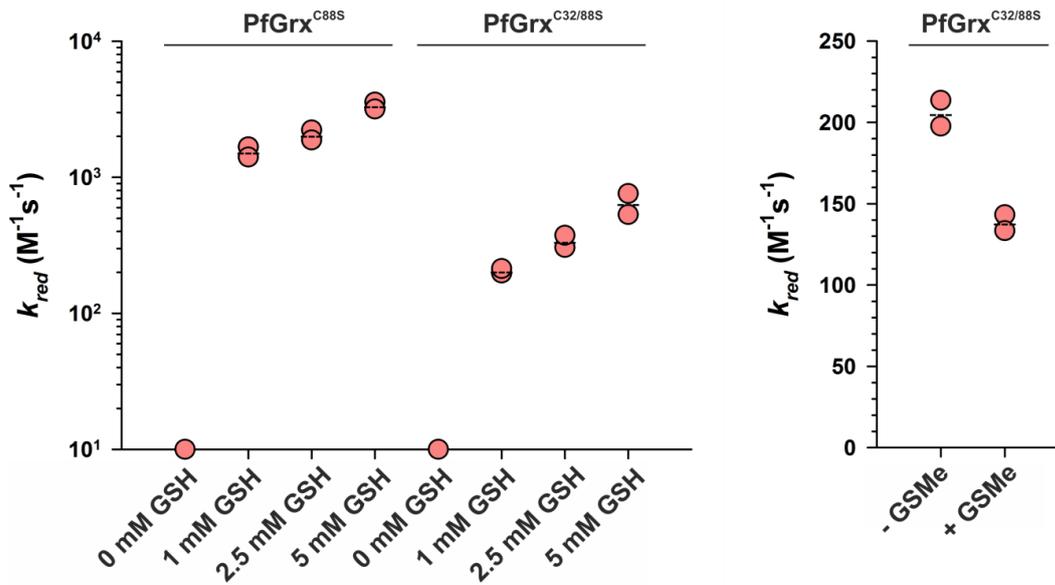


Abbildung 28 Glutathion muss zur Reduktion von roGFP2^{WT}-S₂ von PfGrx aktiviert werden.

Links sind die Geschwindigkeitskonstanten k_{red} für die reduktive Halbreaktion von roGFP2^{WT} mit PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} in Anwesenheit von 0-5 mM GSH, 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR zu sehen. Dieser Werte stellen die Steigung der Regressionsgerade der Sekundärdiagramme in Abbildung 25 und 26 dar und sind in Tabelle 15 aufgelistet. Rechts zeigt die Reduktive Halbreaktion von roGFP2^{WT} mit PfGrx^{C32/88S} in Anwesenheit von 1 mM GSH, 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR ohne GSMe oder in Konkurrenz mit 5 mM GSMe dar.

Tabelle 15 Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion von roGFP2^{WT}

Die hier aufgelisteten Werte stellen die Steigung der Regressionsgeraden der Sekundärdiagramme in Abbildung 25 und 26 dar und sind in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

roGFP2 ^{WT} +	GSH (mM)	k_{red} (M ⁻¹ s ⁻¹)	$k_{\text{red}}^{\text{comp}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
PfGrx ^{C88S}	0	0	/
	1	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^3$	/
	2,5	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^3$	/
	5	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^3$	/
PfGrx ^{C32/88S}	0	0	/
	1	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^2$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^2$
	2,5	$(3,4 \pm 0,5) \times 10^2$	/
	5	$(6,5 \pm 1,6) \times 10^2$	/

Die Werte zeigen Mittelwert \pm Abweichung (errechnet mit Gleichung (I)) von n = 2 biologisch unabhängigen Replikaten.

3.4.2.2. PfGrx deglutathionyliert Monothiol-roGFP2-SSG ohne GSH

Zur weiteren Untersuchung der Reaktionsdynamik wurden wieder die zuvor genutzten roGFP2 Mutanten C151S und C208S verwendet. Da hier keine Disulfide erzeugt werden können, wurde die Oxidation mit GSSG vorgenommen, sodass eine glutathionylierte roGFP2-Spezies entstand. Diese wurden mit 2-80 μM reduziertem PfGrx gemischt, wieder in Anwesenheit von GSH, GR und NADPH. Primärdiagramme wurden wie zuvor beschrieben exponentiell gefittet und Sekundärdiagramme erstellt (Abb. 29-32).

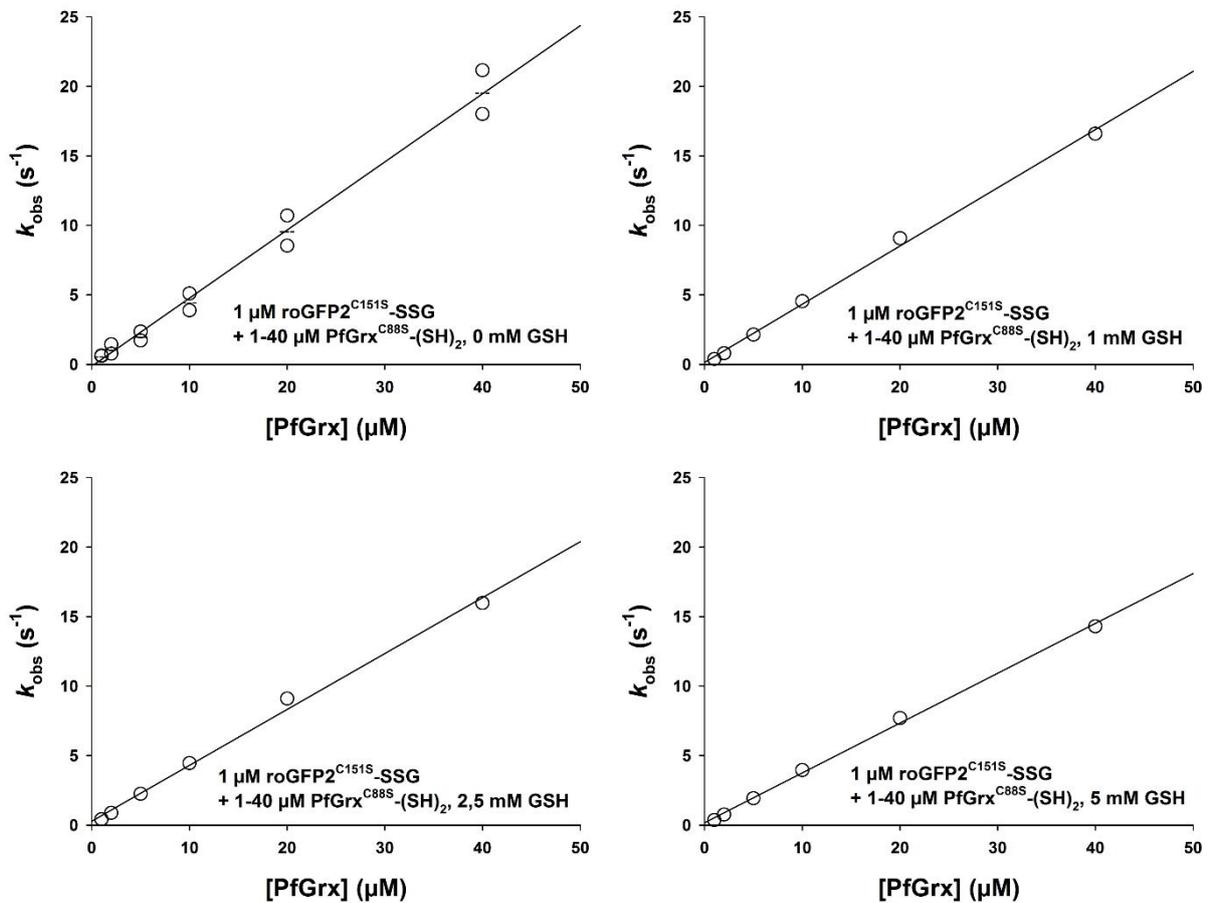


Abbildung 29 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathionyliertem $\text{roGFP2}^{\text{C151S}}$ mit reduziertem $\text{PfGrx}^{\text{C88S}}$ bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.

Die aus den Primärdiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von $1 \mu\text{M}$ oxidiertem $\text{roGFP2}^{\text{C151S}}\text{-SSG}$ mit $1\text{-}40 \mu\text{M}$ $\text{PfGrx}^{\text{C88S}}$ in Anwesenheit von 0, 1, 2,5 oder 5 mM GSH wurden in Sekundärdiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Den Reaktionen wurde stets $125 \mu\text{M}$ NADPH und $0,2 \text{ U/ml}$ GR zugesetzt. Es wurde ein linearer Fit durch alle Punkte gelegt und eine lineare Regression gefittet, welche als k_{red} interpretiert wurde (Tabelle 16) und die Reaktion zweiter Ordnung des $\text{PfGrx}^{\text{C88S}}$ mit $\text{roGFP2}^{\text{C151S}}$ bei verschiedenen GSH-Konzentrationen darstellt.

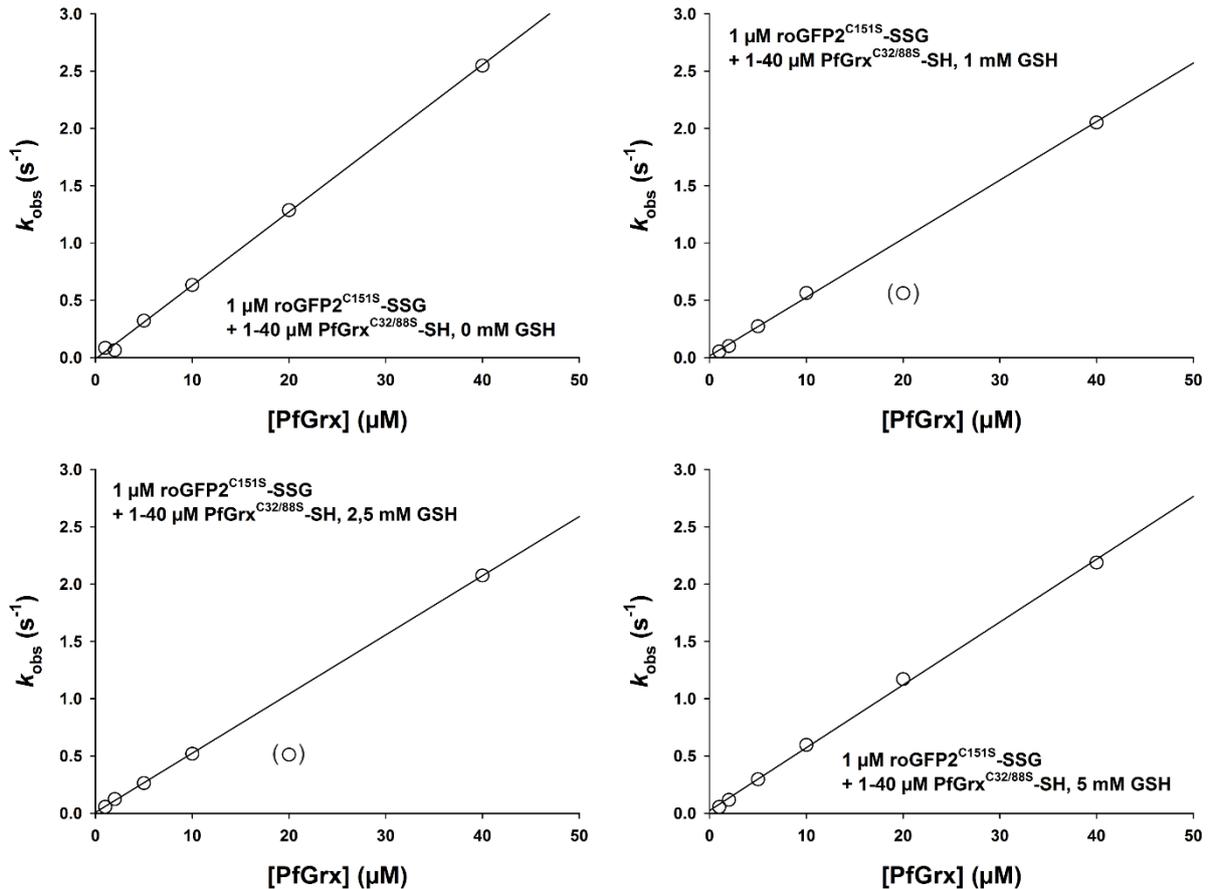


Abbildung 30 Sekundärdiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathonyliertem roGFP2^{C151S} mit reduziertem PfGrx^{C32/88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.

Die aus den Primärdiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von 1 μM oxidiertem roGFP2^{C151S}-SSG mit 1-40 μM PfGrx^{C32/88S} in Anwesenheit von 0, 1, 2,5 oder 5 mM GSH wurden in Sekundärdiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Den Reaktionen wurde stets 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR zugesetzt. Es wurde ein linearer Fit durch alle Punkte gelegt und eine lineare Regression gefittet, welche als k_{red} interpretiert wurde (Tabelle 16) und die Reaktion zweiter Ordnung des PfGrx^{C32/88S} mit roGFP2^{C151S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen darstellt.

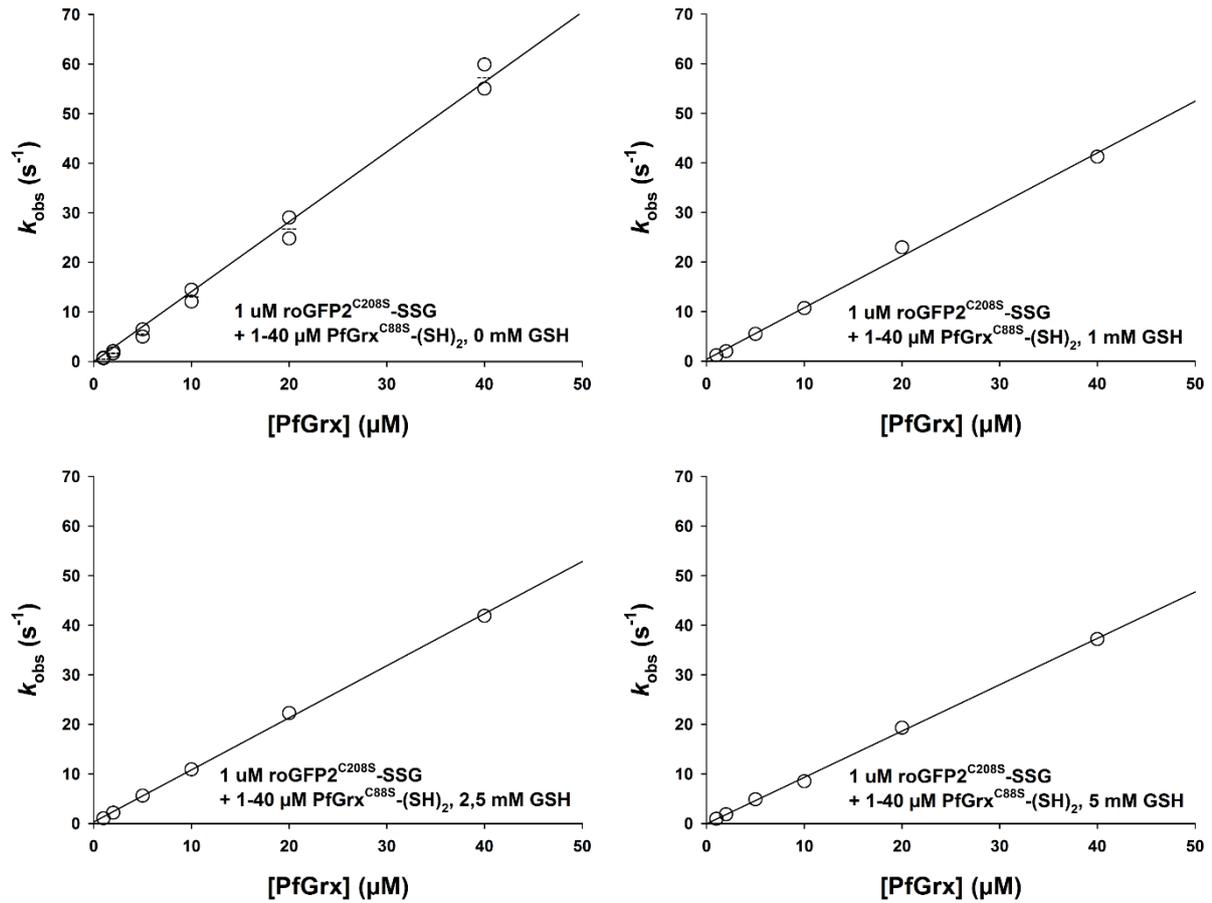


Abbildung 31 Sekundäradiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathonyliertem roGFP2^{C208S} mit reduziertem PfGrx^{C88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.

Die aus den Primäradiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von 1 μM oxidiertem roGFP2^{C208S}-SSG mit 1-40 μM PfGrx^{C88S} in Anwesenheit von 0, 1, 2,5 oder 5 mM GSH wurden in Sekundäradiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Den Reaktionen wurde stets 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR zugesetzt. Es wurde ein linearer Fit durch alle Punkte gelegt und eine lineare Regression gefittet, welche als k_{red} interpretiert wurde (Tabelle 16) und die Reaktion zweiter Ordnung des PfGrx^{C88S} mit roGFP2^{C208S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen darstellt.

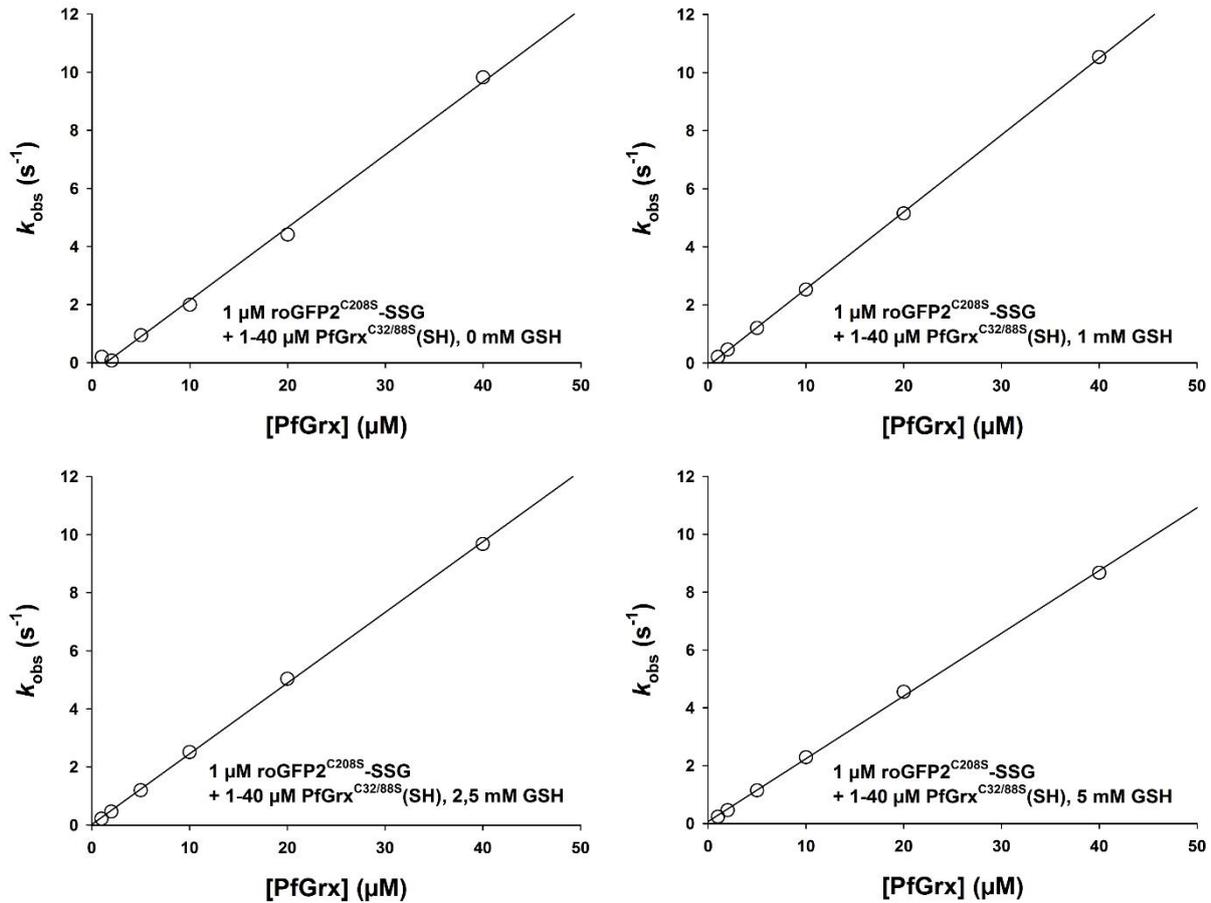


Abbildung 32 Sekundäradiagramme der reduktiven Halbreaktion von glutathonyliertem roGFP2^{C208S} mit reduziertem PfGrx^{C32/88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.

Die aus den Primäradiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte für die Reaktion von 1 μM oxidiertem roGFP2^{C208S}-SSG mit 1-40 μM PfGrx^{C32/88S} in Anwesenheit von 0, 1, 2,5 oder 5 mM GSH wurden in Sekundäradiagrammen gegen die Grx-Konzentration aufgetragen. Den Reaktionen wurde stets 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR zugesetzt. Es wurde ein linearer Fit durch alle Punkte gelegt und eine lineare Regression gefittet, welche als k_{red} interpretiert wurde (Tabelle 16) und die Reaktion zweiter Ordnung des PfGrx^{C32/88S} mit roGFP2^{C208S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen darstellt.

Im Gegensatz zu der Reaktion mit dem roGFP2-Wildtyp, zeigen die Sekundäradiagramme der roGFP2-Mutanten einen linearen Anstieg der k_{obs} -Werte. Es zeigt sich ebenfalls eine Unabhängigkeit von der Glutathionkonzentration, sodass die Deglutathionylierung des roGFP2 auch in Abwesenheit von GSH mit der gleichen Geschwindigkeit stattfinden kann (Abb. 33). Wie in Abbildung 33 und Tabelle 16 zu sehen ist, läuft die Reduktion von roGFP2^{C208S} etwas schneller ab als die von roGFP2^{C151S}, invers zur Oxidation dieser beiden Reste. Weiterhin kann das PfGrx^{C88S} beide roGFP2-Varianten effektiver reduzieren als das Monothiol-Glutaredoxin. Mit Werten um $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ reduziert PfGrx^{C88S} das roGFP2^{C208S} am schnellsten und ist damit etwas mehr als doppelt so schnell wie die Reduktion des roGFP2^{C151S}. Dessen Reduktion durch das Monothiol-Grx ist die langsamste hier getestete Kombination und läuft mit einer

Geschwindigkeit von ca. $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ab, erneut nur ca. halb so schnell wie die Reduktion der C208S-Variante.

Seinem Namen entsprechend, kann das Glutaredoxin also effizient und schnell glutathionyliertes roGFP2 reduzieren. Führt man diese Ergebnisse mit denen aus dem vorherigen Abschnitt zusammen, ist zu erkennen, dass das Aufbrechen der Disulfidbrücke in roGFP2^{WT} der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreduktion sein muss.

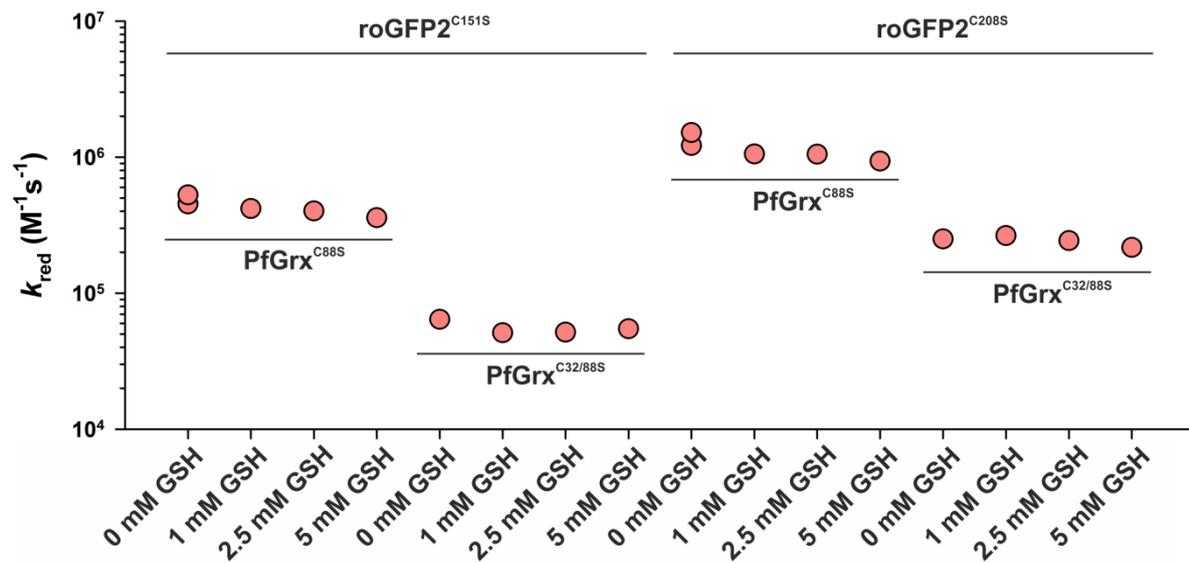


Abbildung 33 Glutathionylierte roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} können effizient von PfGrx ohne GSH reduziert werden.

Zu sehen sind Geschwindigkeitskonstanten k_{red} für die reduktive Halbreaktion von roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} mit PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} in Anwesenheit von 0-5 mM GSH, 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR. Diese Werte stellen die Steigung der Regressionsgeraden der Sekundärdiagramme in Abbildung 29-32 dar.

Tabelle 16 Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion von roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S}

roGFP2 ^{C151S} +	GSH (mM)	k_{red} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	roGFP2 ^{C208S} +	GSH (mM)	k_{red} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
PfGrx ^{C88S}	0	$(4,9 \pm 0,5) \times 10^5$	PfGrx ^{C88S}	0	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^6$
	1	$4,2 \times 10^5$		1	$1,1 \times 10^6$
	2,5	$4,0 \times 10^5$		2,5	$1,1 \times 10^6$
	5	$3,6 \times 10^5$		5	$0,9 \times 10^6$
PfGrx ^{C32/88S}	0	$6,4 \times 10^4$	PfGrx ^{C32/88S}	0	$2,5 \times 10^5$
	1	$5,1 \times 10^4$		1	$2,7 \times 10^5$
	2,5	$5,2 \times 10^4$		2,5	$2,4 \times 10^5$
	5	$5,5 \times 10^4$		5	$2,2 \times 10^5$

Außer bei PfGrx^{C88S} und 0 mM GSH wurden alle Messungen nur einfach durchgeführt. PfGrx^{C88S} mit 0 mM GSH wurden für roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} in $n = 2$ biologisch unabhängigen Replikaten gemessen. Abweichungen wurden mithilfe von Gleichung (I) errechnet.

3.4.3. Die Übertragungsgeschwindigkeit von Oxidationsäquivalenten innerhalb des roGFP2-PfGrx-Fusionskonstruktes ist limitiert

Mithilfe der durch die Einzelproteine erhaltenen Erkenntnisse soll nun das Fusionskonstrukt genauer untersucht werden. Zunächst soll geklärt werden, ob das Signal des roGFP2, wenn es mit einem Grx fusioniert ist, dessen Reaktionsgeschwindigkeit korrekt wiedergibt. Hierfür wurden jeweils 2 μM reduziertes roGFP2-PfGrx^{WT}, roGFP2-PfGrx^{C88S} oder roGFP2-PfGrx^{C32/88S} in Spritze 1 der *Stopped-flow* Apparatur gegeben und 2-80 μM GSSG in Spritze 2. Die Reaktion wurde mit dem Zusammenführen der beiden Lösungen gestartet und die zeitabhängige Fluoreszenzänderung bei einer Anregungswellenlänge von 484 nm aufgenommen.

Tabelle 17 Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation von roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukten durch GSSG

	k_1^{ox} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_2^{ox} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
roGFP2-PfGrx ^{WT}	$(3,4 \pm 0,4) \times 10^7$	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^5$
roGFP2-PfGrx ^{C88S}	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^7$	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^5$
roGFP2-PfGrx ^{C32/88S}	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^6$	$(4,2 \pm 0,3) \times 10^5$
	$k_{1\text{cat}}$ (s^{-1})	$k_{2\text{cat}}$ (s^{-1})
roGFP2-PfGrx ^{WT}	1085 ± 240	$9,3 \pm 0,5$
roGFP2-PfGrx ^{C88S}	479 ± 13	$11,0 \pm 0,0$
roGFP2-PfGrx ^{C32/88S}	125 ± 9	$11,0 \pm 0,9$

Die Werte zeigen Mittelwert \pm Abweichung (errechnet mit Gleichung (I)) von $n = 2$ biologisch unabhängigen Replikaten.

Am gezeigten Beispiel in Abbildung 34 a sind auf den ersten Blick zwei Phasen zu erkennen. Zu Beginn der Reaktion ist ein leichter Anstieg der Fluoreszenz zu sehen, gefolgt von einem langsameren Abfall. Diese zwei Phasen wurden getrennt voneinander gefittet und ergaben jeweils einen eigenen k_{obs} -Wert. Trägt man die k_{obs} -Werte gegen die eingesetzte GSSG-Konzentration auf (Abb. 34 b, Anhang 16), erkennt man, dass weder die k_1^{obs} Werte, noch die k_2^{obs} Werte durch eine einzige Gerade gefittet werden können. Mit steigender GSSG-Konzentration scheint sich die Reaktion einer Sättigungsgeschwindigkeit anzunähern.

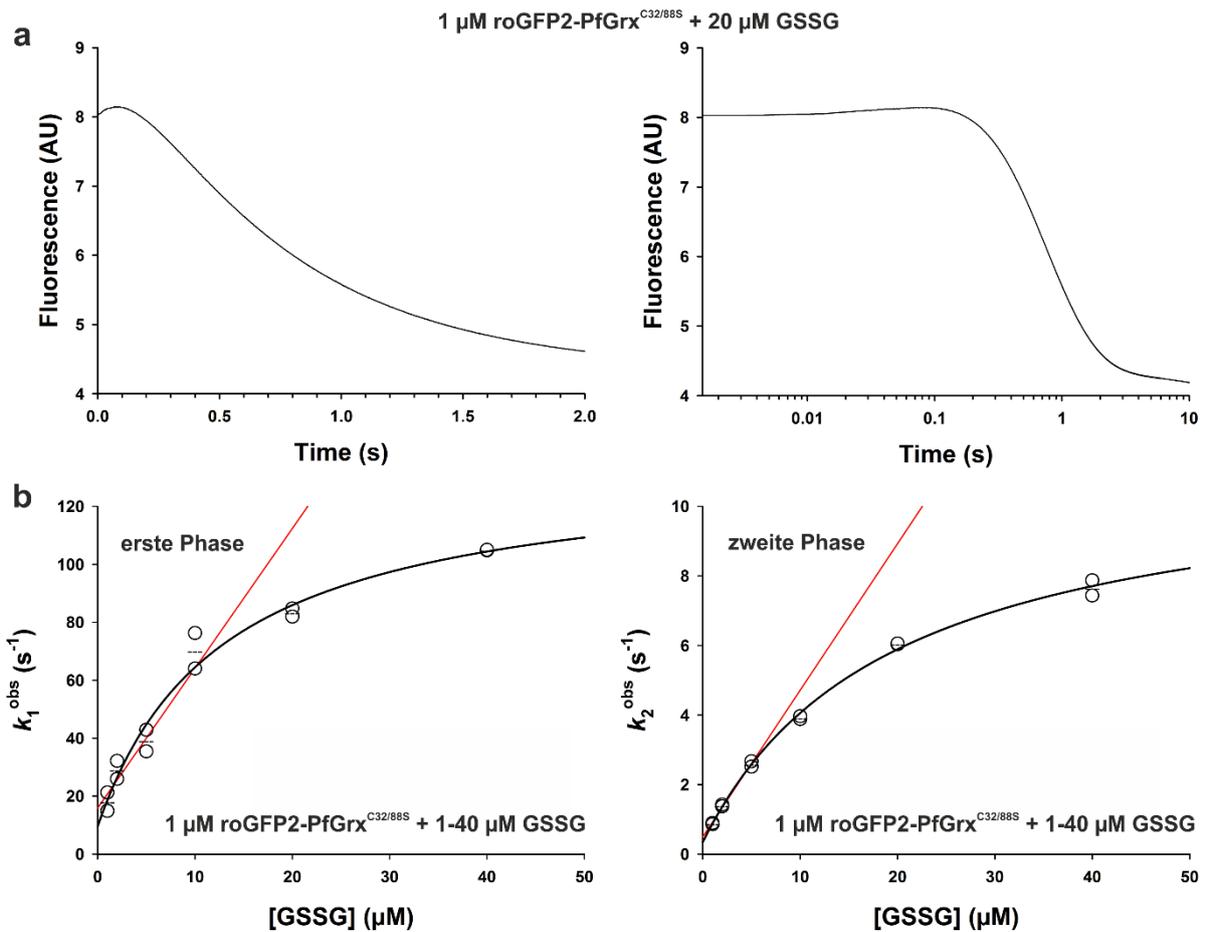


Abbildung 34 Die Oxidationsgeschwindigkeit des roGFP2-PfGrx-Fusionskonstruktes durch GSSG ist sättigbar.

a Ein Primärdiagramm ist am Beispiel der Reaktion von roGFP2-PfGrx^{C32/88S} mit 20 µM GSSG dargestellt in linearer (links) und halblogarithmischer (rechts) Auftragung. In den ersten 0,2 Sekunden ist ein leichter Anstieg der Fluoreszenz zu sehen, gefolgt von einem Abfall über die nächsten 4 Sekunden. Beide Phasen wurden getrennt mit je einer Exponentialfunktion gefittet und ergaben die Werte k_1^{obs} und k_2^{obs} für 20 µM GSSG. **b** Die so erhaltenen k_{obs} -Werte wurden je in ein Sekundärdiagramm aufgetragen für die erste Phase (links) und die zweite Phase (rechts), hier am Beispiel der Reaktion von roGFP2-PfGrx^{C32/88S} und GSSG. Durch die ersten drei k_{obs} -Werte wurde eine Regressionsgerade (rot) gelegt, um die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_{ox} der Reaktion zwischen GSSG und PfGrx abzuschätzen. Das Sättigungsverhalten wurde durch einen hyperbolischen Fit (schwarz) abgeschätzt, wodurch ein k_{cat} -Wert erhalten werden konnte (Sekundärdiagramme für die roGFP2-PfGrx^{C88S} und roGFP2-PfGrx^{WT} befinden sich in Anhang 16).

Um die Geschwindigkeit im ungesättigten Bereich der Reaktion zu bestimmen, wurde eine Regressionsgerade durch die ersten drei Punkte gelegt (Abb. 34 b, Anhang 16, rot), deren Steigung als die Geschwindigkeitskonstante k_{ox} abgelesen wurde. Zur Abschätzung der Maximalgeschwindigkeit dieser Reaktionen wurde ein hyperbolischer Fit $k(c) = k_0 + \frac{a \cdot c}{b+c}$ angelegt, wobei c die GSSG-Konzentration darstellt und a als k_{cat}^{app} interpretiert wurde.

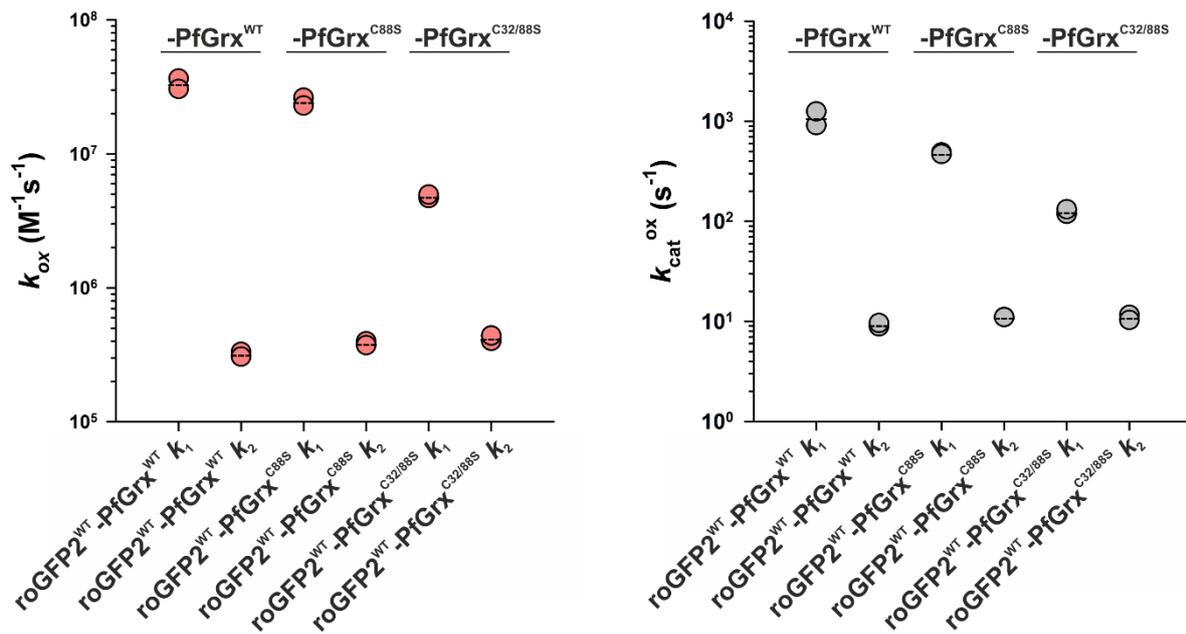


Abbildung 35 Das roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukt lässt sich schnell durch GSSG oxidieren.

Die aus den Sekundärdiagrammen in Abbildung 34 und Anhang 16 erhaltenen Werte wurden graphisch dargestellt. Links sind die k_{ox} -Werte der linearen Fits und rechts die k_{cat}^{ox} -Werte der hyperbolischen Fits der ersten und zweiten Phase aufgetragen.

Sowohl der schnelle als auch der langsamere Schritt der Reaktion sind GSSG-abhängig. Mit Werten von bis zu $3,3 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ bei niedrigen Substratkonzentrationen ist die erste Phase jedoch deutlich schneller als die Literaturwerte für die Glutathionierungsreaktion von PfGrx und kann somit nicht dessen Oxidation widerspiegeln (Abb. 35, Tabelle 17). Sie zeigt außerdem eine Abhängigkeit von der fusionierten PfGrx-Variante, wobei das Monothiol-Grx hierbei die langsamste Kinetik aufweist. Durch diese Abhängigkeit ist davon auszugehen, dass auch die schnelle erste Phase durch das Grx vermittelt wird und keine direkte Interaktion von GSSG mit roGFP2 darstellt. Demzufolge wird vermutet, dass diese Phase die Assoziation des Glutathiondisulfids in die *Glutathion-Scaffold-Site* des PfGrx beschreiben kann. Die Sättigung kommt vermutlich durch eine sterische Hinderung des PfGrx durch roGFP2 zustande, sodass GSSG nicht ungestört in das aktive Zentrum des PfGrx diffundieren kann. Andererseits kann die Sättigung auch durch eine ungünstige Orientierung von PfGrx zu roGFP2 zustande kommen. Da bei diesem Teil der Reaktion das roGFP2 selbst noch nicht reagiert, kann es die Interaktion zwischen Grx und GSSG in seiner Fluoreszenz nur wiedergeben, wenn das aktive Zentrum des Grx dem roGFP2 zugewandt ist. Der Zahlenwert von k_{1cat}^{app} selbst konnte nicht zuverlässig interpretiert werden.

Der langsamere Teil der Reaktion findet mit $4 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ statt und entspricht somit der

Geschwindigkeit einer Reaktion zweiter Ordnung von PfGrx mit seinem Substrat in kleinen Konzentrationen, wobei hier alle Fusionskonstrukte nahezu gleich schnell reagieren. Auch ihre Sättigungsgeschwindigkeit scheinen alle Grx-Varianten bei einem ähnlichen k_{2cat} von ca. 10 s^{-1} zu erreichen. Da in dieser Arbeit zuvor gezeigt wurde, dass Oxidationsäquivalente in Form von Glutathion von PfGrx auf roGFP2 übertragen werden, wird k_{2cat} als die Maximalgeschwindigkeit k_{fus}^{SSG} der Reaktion erster Ordnung des Übertrags der Oxidation innerhalb des Fusionskonstruktes von Grx auf roGFP2 interpretiert.

4. Diskussion

4.1. Ein *PFPRX6-HIS₈-GFP*-Stamm kann genutzt werden, um PfPrx6 *in vivo* genauer zu untersuchen

Die zentrale Frage zum Thema PfPrx6 in dieser Arbeit war, durch welches physiologische Substrat ein oxidiertes PfPrx6 wieder reduziert und für einen erneuten katalytischen Zyklus aktiviert werden kann. Frühere Studien weisen darauf hin, dass das PfPrx6 keinen ganzen Katalysezyklus durchlaufen kann, da der für die Reduktion essenzielle Entfaltungsschritt eventuell nicht stattfindet [49]. Diese Publikation lässt vermuten, dass der FF Zustand durch Ersetzen des His39 durch ein Tyrosin destabilisiert werden kann, wodurch die Aktivität des PfPrx6 leicht gesteigert werden konnte. Allerdings könnte dies auch zu dem Verlust einer physiologischen Aufgabe z. B. in der Signaltransduktion führen. Ein PfPrx6 mit C-terminalem His₈-GFP-Tag könnte für verschiedene Experimente genutzt werden, die Klarheit über die Funktion des PfPrx6 geben können:

- a) Durch Aufreinigen des Proteinlysats und einem folgenden *Pulldown* bleiben Interaktionspartner des PfPrx6 an diesem gebunden und können durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Welche Art der Modifikation gefunden wird, beispielsweise eine Interaktion mit einem Reduktanden, einem Transkriptionsfaktor oder kleineren Molekülen wie GSH, kann hierbei offengelassen werden.
- b) Durch das Anfügen des GFP kann mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation des Proteinkomplexes bestimmt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass das PfPrx6 ein zytosolisches Protein ist, zum einen durch Lokalisationsstudien mit einem episomalen *PFPRX6-GFP*-Konstrukt [140], zum anderen durch Immunopräzipitation von genomisch kodiertem PfPrx6 [141]. Eine eventuelle zweite Lokalisation im Nukleus könnte für eine Rolle als Transkriptionsfaktor sprechen. Wird die Zelle mit Oxidationsmitteln wie H₂O₂ behandelt, könnte dieser Effekt hervorgerufen oder verstärkt werden, während eine Reduktion mit DTT einen gegenteiligen Effekt haben könnte. Für das humane Prx6 wurde neben der Reduktion von H₂O₂ gezeigt, dass dieses Enzym ebenfalls wichtig für die Reduktion oder das Abtrennen von peroxidierten Lipidresten ist [142]. Eine Lokalisation des PfPrx6 an Zellmembranen könnte also auf eine entsprechende Aktivität hinweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein *Plasmodium falciparum*-Stamm mit einem genomisch integrierten *PFPRX6-HIS₈-GFP*-Konstrukt erzeugt werden. Die Integration wurde durch PCRs und kommerzielle Sequenzierung bestätigt (Anhang 1). Auch die Neomycin-Resistenz konnte nur durch eine korrekte Integration ohne Verschiebung der DNA-Triplets von der Zelle hergestellt werden.

Auf Proteinebene konnte das eingefügte Konstrukt noch nicht nachgewiesen werden. Daten von Studien, in deren Rahmen auf Grundlage von RNA-Vorkommen und –Stabilität Transkriptionsprofile für Gene aus *P. falciparum* erstellt wurden [141, 143], zeigen ein Maximum des Transkripts ca. 25 h nachdem ein Merozoit ein rotes Blutkörperchen befallen hat (*hours post infection*). Auf Grundlage dieses Transkriptionsmusters wurde der Western Blot zweimal angesetzt, zunächst mit asynchronen Kulturen (Abb. 10) und ein weiteres Mal mit synchronen Parasiten im Trophozoitenstadium. Obwohl die Ponceau-Färbung zeigt, dass die Lyse der Parasiten erfolgreich war und auch die Positivkontrolle auf dem Western Blot zu sehen ist, konnte kein Signal für das PfPrx6-His₈-GFP Konstrukt gefunden werden. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass ein *P. falciparum* 3D7-Stamm genug PfPrx6 produziert, um es in einem Western Blot detektieren zu können [141, 144].

Für das fehlende Signal kann es mehrere Ursachen geben. Zum einen wurden sowohl Reinigung als auch Western Blot über den His₈-Tag vermittelt. Da dieser jedoch verborgen zwischen zwei Proteinen liegt, kann er eventuell nicht an die Ni-NTA binden und auch nicht von dem hier verwendeten His₆-Antikörper (siehe Abschnitt 2.1.6.) erkannt werden. Dies kann behoben werden, indem über eine anti-GFP-Säule aufgereinigt bzw. ein GFP-Antikörper zum Proteinnachweis verwendet wird. GFP-Antikörper sind bereits etabliert [145, 146] und müssten nicht erst wie ein PfPrx6-Antikörper zur Immunopräzipitation und Färbung im Blot aufwendig hergestellt werden.

Ebenfalls denkbar ist eine zu geringe Menge an Protein. Ein solches Maximum an Proteinmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt, wie es in der zuvor erwähnten Studie gezeigt wurde [143], kann zeitlich leicht verfehlt werden und es müssen eventuell verschiedene Zeitpunkte des Parasitenstadiums getestet sowie zusätzliche Kulturen angesetzt werden, um die Proteinmenge zu erhöhen. Es ist ebenfalls bekannt, dass H₂O₂ in der Zelle als Signalmolekül dient und die Produktion antioxidativer Proteine induziert [147, 148]. Eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid könnte also zu einer vermehrten Produktion und somit zu einem messbaren Signal von PfPrx6 führen.

Auch bei einem präliminären Versuch das GFP durch Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren, konnte die Expression des *PFPRX6-HIS₈-GFP*-Konstrukts nicht nachgewiesen werden. Hierbei könnte ebenfalls eine Behandlung der Zellen durch H₂O₂ sowie das Analysieren von Parasiten in verschiedenen Stadien zu einem messbaren Signal führen. Zusätzlich empfiehlt sich eine Fixierung der Zellen durch Paraformaldehyd statt wie hier durch Methanol, um ein möglichst starkes GFP-Signal zu konservieren [140, 149].

Ein genetischer Defekt des Parasiten könnte ebenfalls zum Fehlen des Proteins führen. Die zuvor angesprochene Sequenzierung reicht nicht über die im Vektor befindliche Homologieregion hinaus, sodass Fehler im Genom, die zur Abwesenheit dieses Proteins führen können, nicht ausgeschlossen werden können. Es wurde bereits gezeigt, dass PfPrx6 nicht essenziell ist und ein Δ *PFPRX6*-Stamm selbst unter oxidativem oder Hitzestress keine Änderung in seinem Wachstumsverhalten zeigt [144]. Somit würde z. B. eine Mutation und somit ein Ausfall des Promotors oder des Startkodons im Parasiten eventuell nicht auffallen. Um diese Fehlerquellen ausschließen zu können, sollten zusätzliche Sequenzierungen dieses Abschnitts sowohl im 3D7_pSLI-*PFPRX6-HIS₈-GFP*-Stamm als auch im 3D7 Wildtyp durchgeführt werden.

Der Mechanismus der Reduktion von Peroxiredoxinen der Prx6-Familie war auch in anderen Organismen nicht immer klar, da klassische Reduktionsmittel wie Thioredoxine oder Glutaredoxine keine effiziente Reaktion ermöglichen [32, 45, 49]. Für einige Homologe wurden mit der Zeit potentielle Kandidaten gefunden, wie z. B. eine humane Glutathiontransferase (GST) [150] oder Ascorbat [151], doch blieb der Reduktionsweg des PfPrx6 weiter ungeklärt. Das Expressionsmaximum von *PFPRX6* im Trophozoitenstadium kann ebenfalls als eine Antwort auf die Veränderung im Parasiten interpretiert werden. Entwickelt sich der Erreger zu einem Trophozoiten, fängt er an Hämoglobin aus der Wirtszelle zu importieren, wodurch über das so aufgenommene Eisen eine große Zahl an Oxidationsäquivalenten in den Parasiten gelangt, was sich in einer steigenden Konzentration an O₂⁻ und H₂O₂ widerspiegeln könnte. Dies könnte eine kurzzeitige hohe Expression des *PFPRX6* induzieren, was auf eine Rolle des PfPrx6 als Peroxidase hinweisen und somit die Existenz eines physiologischen Reduktionspartners nahelegen würde.

4.2. Glutaredoxine

4.2.1. Das Einfügen von Motiven aus HsGrx5 kann ScGrx7 inaktivieren

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Struktur-Funktions-Analyse von Glutaredoxinen gemacht. Doch gaben diese Erkenntnisse nur wenige Informationen darüber, welche strukturellen Elemente die Funktion eines Glutaredoxins bestimmen und sie somit in Klasse 1 oder 2 unterteilen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ersetzen der Reste Arg152 und Arg153 durch Tryptophan und Prolin die oxidative Halbreaktion deutlich stärker beeinträchtigt als die reduktive. Im Gegensatz zu den positiv geladenen Argininen wurden hier zwei unpolare, sehr sperrige Aminosäuren eingefügt. Diese Aminosäuren liegen in einer Schleife vor Helix 3, die in das aktive Zentrum und somit in die *Glutathion-Scaffold-Site* hereinragen. Frühere Versuche haben diese Schleife bereits als einen wichtigen Faktor für die oxidativen Halbreaktion von ScGrx8 bestimmt [94], was in dieser Arbeit an ScGrx7 bestätigt werden konnte. Das eingefügte WP-Motiv kann die Schleife stabilisieren, wodurch eine Glutathionylierung des aktiven Cysteins verlangsamt und eine ungewollte Glutathionylierung in HsGrx5 vermieden wird. Zusätzlich könnte das WP-Motiv die Interaktion mit einem physiologischen Substrat begünstigen oder verhindern. Eine veränderte Konformation dieser Schleife könnte ebenfalls erklären, warum ScGrx7^{WP} in GSSCys-Assays *in vitro* große Aktivität aufweist, aber sperriges roGFP2 in einem Fusionskonstrukt fast vollständig oxidiert vorliegt [96]. Eine geringere Reaktivität durch die WP-Mutation scheint auch physiologisch sinnvoll zu sein. Da katalytisch inaktive Grx kein zweites Cystein besitzen, können eventuelle Grx-SS-Protein-Bindungen nicht schnell wieder aufgelöst werden. Somit soll die Akkumulation dieses Heterodimers unterbunden werden [32, 54, 82]. Beispiele für solche Interaktionen stellen ScGrx3 und ScGrx4 dar, die beide ein WP-Motiv besitzen. Sie deglutathionylieren die Histondeacetylase Sir2 sehr langsam und sind somit Regulatoren dieser Signalkaskade [152].

Der deutlich unterschiedliche Effekt auf die beiden Halbreaktionen bestätigt ebenfalls das gängige Model, nach dem das Grx in einem Ping-Pong-Mechanismus mit zwei unabhängigen Glutathion-Bindungsstellen reagiert.

Verglichen mit dem Effekt der WP-Mutation hat das Einfügen der langen Schleife vor dem aktiven Zentrum des ScGrx7 eine deutlich größere Auswirkung. ScGrx7^{loop} verliert mehr als 99 % seiner Aktivität, sowohl in der oxidativen, als auch in der reduktiven Halbreaktion. Während das kurze TG-Motiv dem aktiven Zentrum Stabilität verleiht, kann das Einfügen einer

langen Schleife dem ScGrx7^{loop} das Einnehmen einer alternativen Konformation ermöglichen, in der es nicht möglich ist, katalytisch aktiv zu sein. Trotz des beachtlichen Verlustes an Effizienz zeigt ScGrx7^{loop} dennoch katalytische Aktivität in *Steady-state Assays* mit GSSCys als Substrat. Es muss also davon ausgegangen werden, dass es eine Reihe an Aminosäuren und Motiven in den beiden Grx-Klassen sind, die die Klassen trotz sehr ähnlicher Sequenzen voneinander unterscheiden. Da GSSCys verglichen mit Proteinsubstraten ein sehr kleines Molekül ist, kann die verbleibende Aktivität in einer Zelle, vor allem in Hinblick auf physiologische glutathionylierte oder nicht-glutathionylierte Disulfidsubstrate, nicht genauer bestimmt werden.

Fügt man der ScGrx7^{loop} Mutante zusätzlich die WP Mutation hinzu, so erhält man einen fast linear addierten Effekt dieser Mutationen. Dies lässt vermuten, dass ScGrx7^{loop} in derselben Art und Weise mit seinen Substraten reagiert wie das Wildtypenzym, jedoch schwerer zugänglich ist oder in geringerer Zahl in einer aktiven Konformation vorliegt. Da für die Loop-Mutante sowohl K_m deutlich größer als auch k_{cat} deutlich geringer sind, kann die Schleife als eine Art Ein- und Ausschalter interpretiert werden. Nur wenn die Schleife in der korrekten Konformation vorliegt, kann das Enzym reagieren. Die effektive Konzentration aktiver Glutaredoxine wird im GSSCys-Test somit um etwas mehr als das Hundertfache reduziert, was ebenfalls das Verhältnis von aktiven zu inaktiven Konformationen widerspiegeln könnte.

4.2.2. HsGrx5 kann durch Motive aus ScGrx7 aktiviert werden

Das Wildtypenzym HsGrx5 zeigt in klassischen *in vitro* GSSCys-Tests keine messbare Aktivität. Seine Aufgabe in der Zelle besteht vor allem in der Synthese und Verteilung von Eisen-Schwefel-Clustern im Mitochondrium. Wird rekombinantes HsGrx5 in *E. coli* produziert, hat es eine starke braune Färbung, die es als Holoprotein durch den gebundenen Eisen-Schwefel-Cluster erhält. Diese Bindung weist eine große Stabilität auf, sodass die Proteinlösung bis zu fünf Tage benötigt, um vollständig auszubleichen, was die Dissoziation des Fe-S-Clusters widerspiegelt. Das verbleibende Apoprotein besitzt keine Färbung mehr.

Ersetzt man das hoch-konservierte WP-Motiv durch zwei Argininreste, fällt bei der Reinigung des HsGrx5^{RR} als erstes die fehlende Braunfärbung auf. Dies bedeutet vermutlich, dass eine Mutation an dieser Stelle keine stabile Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters mehr ermöglicht und das WP-Motiv somit essenziell für seine physiologische Rolle in menschlichen Zellen ist. Analog zu der Interpretation zum weniger aktiven ScGrx7^{WP} wird die an das WP-Motiv

angrenzende Schleife auch im HsGrx5 durch das Einfügen von RR destabilisiert. Dies kann entweder bedeuten, dass die neue Konformation dieser Schleife kein Binden von Fe-S-Clustern mehr ermöglicht, da der Zugang zum aktiven Zentrum für den Cluster erschwert wird. Zum anderen kann auch das Gegenteil der Fall sein: Der Zugang und die Bindung des Clusters an das HsGrx5 wird erleichtert, allerdings fällt die stabilisierende Wirkung der Schleife auf das Holoprotein weg, sodass er leicht wieder dissoziieren kann oder in falscher Orientierung in die Tasche gelangt. Die HsGrx5^{RR}-Mutation reicht jedoch nicht aus, um im GSSCys-Test eine Aktivität nachzuweisen.

Wird die GTPEQPQ-Schleife ausgeschnitten und durch das in dem aktiven ScGrx7 befindliche TG ersetzt, besitzt das Protein genau wie bei der RR-Mutation während und nach der Aufreinigung keine Farbe. Auch hierbei handelt es sich um eine Schleife, die das aktive Zentrum teilweise bedecken kann und somit den gleichen Einfluss auf Spezifität, Stabilität und Erreichbarkeit durch Fe-S-Cluster haben kann, wie zuvor diskutiert. Auffällig ist bei dieser HsGrx5^{loop} Mutante jedoch eine deutlich messbare Aktivität sowohl für die oxidative als auch für die reduktive Halbreaktion. Wie bei der ScGrx7 Mutante mit WP-Motiv, ist auch bei dieser Variante der oxidative Schritt der geschwindigkeitsbestimmende.

NMR-Strukturen des inaktiven EcGrx4 [90] zeigen eine Konformation des Apoproteins, bei der Helix 2, in welcher das aktive Cystein liegt, der *Glutathion-Scaffold-Site* so abgewendet ist, dass eine enzymatische Katalyse von glutathionylierten Substraten nahezu unmöglich ist. Erst durch das Binden eines Eisen-Schwefel-Clusters ändert das Protein seine Konformation zu einer denkbar katalytisch aktiven Form. Da das aktive Cystein nun aber blockiert ist, kann das Enzym auch hiernach nicht aktiv werden. Das Entfernen dieser Schleife könnte die Flexibilität dieser Helix vermindern und somit auch ohne gebundenen Fe-S-Cluster eine aktive Konformation hervorrufen, in der sich kein Fe-S-Cluster anlagern kann. Somit ist die Schleife am N-Terminus der Helix 2 einer der wichtigsten Faktoren, die aktive und inaktive Grx unterscheiden. Da HsGrx5^{loop} allerdings noch immer mehr als das 100-fache langsamer ist als ein aktives ScGrx7, müssen noch weitere Aminosäuren und Motive eine wichtige Rolle spielen.

Die kombinierte Variante HsGrx5^{loop+RR} wies ebenfalls keine Färbung auf und verlor ihre zuvor gewonnene katalytische Aktivität wieder. Dies bedeutet, dass andere strukturbestimmende Faktoren ebenfalls starke Auswirkungen auf die Aktivität und Stabilität des Enzyms haben müssen, die diese Kombination nicht zulassen. Das schnellere Ausfallen der Proteinlösung bestätigt diese Annahme.

In einer parallel durchgeführten Studie von Trnka *et al.* [153] wurde ebenfalls die Auswirkung dieser Schleife auf aktive und inaktive Glutaredoxine untersucht. Die Studie zeigt eine Verschiebung der ϵ -Aminogruppe des konservierten Lysinrests (K_a in Abbildung 6) um gerade einmal 0,2 nm zwischen aktiven (am Beispiel HsGrx2) und inaktiven (am Beispiel HsGrx5) Grx. Der Lysinrest ist essenziell für die Aktivität von Glutaredoxinen [82, 83, 94]. Laut dieser Studie führt die Verschiebung dieses Rests zu einer Änderung der Orientierung und Reaktivität von GSH oder Fe-S-Clustern im aktiven Zentrum und sogar zur Umorientierung der Monomerproteine in einem dimeren Holokomplex mit ligiertem Fe_2S_2 -Cluster. Gleichzeitig zeigen die Daten von Trnka *et al.* allerdings eine große Fluktuation des aktiven Cysteins im HsGrx5-Apoprotein ([153] Fig. 2 c), was dem in dieser Dissertation beschriebenen Modell, nach welchem das aktive Cystein im HsGrx5-Apoprotein der *Glutathion-Scaffold-Site* abgewendet vorliegen kann, entspricht.

Zusätzlich zu den hier durchgeführten *in vitro* Messungen wurden von der Gruppe von Bruce Morgan an roGFP2 gekoppelte Aktivitätsmessungen verschiedener Grx-Mutanten in lebenden Hefezellen vorgenommen, unter anderem auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HsGrx5^{WT}, HsGrx5^{RR}, HsGrx5^{loop}, HsGrx5^{loop+RR}, ScGrx7^{WT}, ScGrx7^{WP}, ScGrx7^{loop} und ScGrx7^{loop+WP} [96, 126]. Während sich für alle ScGrx7-Mutanten auch *in cellulo* eine sehr ähnliche Tendenz wie in den hier durchgeführten *in vitro* Messungen zeigte, konnten bei der Untersuchung der HsGrx5-Mutanten Unterschiede festgestellt werden. Eine Mutation zu HsGrx5^{loop} reichte im roGFP2-HsGrx5^{loop} Fusionskonstrukt nicht aus, um eine deutliche Aktivitätssteigerung im Vergleich zum roGFP2-HsGrx5^{WT} festzustellen. Im Gegensatz zu den *in vitro* Daten konnte die kombinierte Mutante roGFP2-HsGrx5^{RR+loop} allerdings ihre Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verdoppeln. HsGrx5^{RR+loop} scheint in zellulärem Umfeld also eine größere Stabilität aufzuweisen und zeigt somit eine kleine katalytische Aktivität. Es muss allerdings beachtet werden, dass Oxidationsäquivalente bei dieser Art der Messung durch die Zugabe von H_2O_2 erzeugt wurden und somit sowohl indirekt generiertes GSSG, als auch glutathionylierte Zellbestandteile als Substrate dienen können. Dies könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass die zwei eingefügten Argininreste in HsGrx5^{RR+loop} wichtig für die Interaktion mit physiologischen Substraten sein könnten. Um die Aktivität des HsGrx5^{loop} noch weiter zu steigern, wurden von Zimmernann *et al.* zusätzlich Gly68 aus dem CGFS-Motiv durch Prolin, sowie Arg97 (r_3 in Abbildung 6) durch den konservierten Glutaminrest in Helix 3 ersetzt. Die so erstellte Tripelmutante roGFP2-HsGrx5^{loop+G68P+R97Q} war in *in cellulo* Messungen fast so aktiv

wie ScGrx7 [96, 126]. Dies bestätigt erneut, dass die GTPEQPQ-Schleife einer der entscheidenden Unterschiede zwischen Klasse 1 und Klasse 2 Glutaredoxinen darstellt, jedoch weitere Aminosäuresequenzen für eine effiziente Katalyse wichtig sind. Eine genaue Untersuchung dieser Tripelmutante sollte in Zukunft jedoch zusätzlich *in vitro* vorgenommen werden, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

4.3. Glutaredoxine sind Regulatoren der Stickoxid-Signaltransduktion

S-Nitrosoglutathion ist ein S-nitrosyliertes Derivat von GSH, wird gemeinhin als Speicher des Stickoxids NO gesehen und ist damit ein wichtiger Bestandteil der NO-Signaltransduktion [138]. Als prominentestes Reduktionsmittel gilt die GSNO-Reduktase, die mit NADH als Substrat GSNO zu GSNHOH reduziert, welches hiernach entweder mit GSH zu GSSG und NH₂OH reagieren kann, oder unter spontaner Hydrolyse zu GSO₂H und Ammonium zerfällt [154]. Als weiteres Reduktionsmittel wurde die Carbonyl Reduktase 1 von Bateman *et al.* in 2008 beschrieben [155]. Hier entstehen, ebenfalls mit GSH als Substrat, die Endprodukte GSSG und NH₂OH. In beiden Fällen wird jedoch der zuvor angesprochene NO-Speicher geleert, indem das NO als Signalmolekül aus dem Vorrat entfernt wird.

In dieser Arbeit wurde eine direkte Reaktion von PfGrx mit GSNO in Abwesenheit von GSH gezeigt. Aufgrund der hohen Reaktivität der *Scaffold-Site* mit Glutathionsubstraten ist hier zu vermuten, dass die Oxidation des Grx keine S-Nitrosylierung darstellt, sondern in Form einer Glutathionylierung des aktiven Cysteins geschieht, was in früheren Studien bereits für das in Chloroplasten vorkommende GrxS12 gezeigt wurde [78]. Hierdurch wird, im Gegensatz zu den zuvor benannten Reduktanden des GSNO, ein Molekül HNO freigesetzt.

Die hier gezeigten Daten können also auf eine Rolle von Glutaredoxinen in der Freisetzung von gebundenem NO und somit in dessen Signaltransduktion hinweisen [126].

4.4. roGFP2 als Reporterprotein oder Proteinsubstrat

RoGFP2 und seine Fusionskonstrukte werden seit Jahren in der Wissenschaft eingesetzt. Je nach Wahl des Fusionspartners kann hierbei eine Selektivität für einzelne Oxidationsmittel wie H₂O₂ oder GSSG erreicht werden [115, 127, 128]. Doch obwohl Konstrukte zwischen roGFP2

und Glutaredoxinen oder Peroxiredoxinen bereits in breiter Masse eingesetzt werden [123-126], wurde die Reaktion der Fusionspartner selbst noch nicht ausreichend im Detail untersucht [113, 153]. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von roGFP2 und PfGrx als Mono- und Dithiolvariante untersucht und durch die Mutation von Cysteinresten in roGFP2 die Kinetik von Teilreaktionen untersucht.

4.4.1. roGFP2 eignet sich nicht zur dynamischen Untersuchung von intrazellulären nicht-Glutathion-Disulfiden

Betrachtet man die Reaktion der Einzelproteine, ist eine klare Präferenz des roGFP2 für eine Reaktion mit glutathionyliertem Grx zu sehen. Die Reaktion des roGFP2^{WT} mit PfGrx^{C88S}-S₂ ist die langsamste aller hier getesteten Variationen, obwohl das Reaktionsgleichgewicht deutlich auf der Seite des oxidierten roGFP2 liegt. Sowohl bei dieser als auch bei der Reaktion von PfGrx^{C88S}-S₂ mit einer Monothiol-Variante des roGFP2 zeigt sich keine Bildung eines Heterodimers der beiden Reaktanden im Gel und keine Reaktion der Monothiol-roGFP2-Varianten in der *Stopped-flow* Apparatur. Es ist also davon auszugehen, dass das intermolekulare Disulfid ein sehr ungünstiger Zustand ist und schnell wieder aufgelöst wird. Somit lässt sich ableiten, dass man sich bei dynamischen *in cellulo* Experimenten, die auf der Reduktion eines nicht-Glutathion Disulfidsubstrats durch ein fusioniertes Grx beruhen, nur sehr begrenzt auf das roGFP2 als Reporter-Protein verlassen kann. Auf Grundlage der hier mithilfe des PfGrx^{C88S}-S₂ erfassten Daten ist anzunehmen, dass jede so gemessene Reaktion eine große Verfälschung durch Nebenreaktionen mit Glutathionsubstraten haben kann. Diese Hypothese sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, z. B. durch Kinetikmessungen des Fusionskonstruktes roGFP2-PfGrx^{C88S} mit Disulfidsubstraten wie HEDS, oder besser noch mit oxidierten Protein-Disulfid-Substraten wie beispielsweise der Ribonucleotidreduktase.

Ein glutathionyliertes PfGrx, vor allem PfGrx^{C32/88S}-SSG, konnte hingegen reduziertes roGFP2^{WT} effizient oxidieren. Somit ist davon auszugehen, dass sowohl bei den Einzelproteinen als auch im Fusionskonstrukt eine Oxidation des roGFP2 durch den Übertrag einer Glutathioneinheit stattfindet. Dies bestätigt die Beobachtungen aus früheren Studien [113, 115, 153].

Bei der Betrachtung der Glutathionierungskinetik des roGFP2 zeigt sich beim Vergleich der C151S und C208S Mutanten eine leichte Präferenz zur Reaktion mit dem Rest Cys208. Mit k_{ox} -

Werten im Bereich von $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ist dieser Schritt vermutlich der geschwindigkeitsbestimmende. Führt man jeweils ein Äquivalent von PfGrx^{C32/88S}-SSG und roGFP2^{C151S}-SH zusammen, so stellt sich eine Glutathionylierung von jeweils 50 % beider Proteine ein, was auf ein vergleichbares Redoxpotential der beiden Reaktionspartner hinweist (Abb. 22). Anhand der Primärdiagramme in Abbildung 20 und 21 lässt sich zudem beobachten, dass das Redoxpotential des Dithiol-PfGrx^{C88S} negativer als das des Monothiol-PfGrx^{C32/88S} ist. Rest Cys32 scheint demnach das Redoxpotential des aktiven Zentrums zu beeinflussen. Bei vollständiger Glutathionylierung zeigen die beiden Monothiol-roGFP2-Varianten ein jeweils leicht verändertes Spektrum. Die Oxidation des Cys208 zeigt hierbei eine kleinere Veränderung als die des Cys151. Dieses Ergebnis ist überraschend, da das Cys208 direkt an das Ser209 (Ser205 in Abb. 7) grenzt, welches Teil der Protonen-Transport-Kette des Chromophors ist, während das Cys151 nur indirekten Einfluss ausüben kann (Abb. 7). Es ist demnach denkbar, dass der sterische Effekt infolge einer Glutathionylierung des Cys151 einen größeren Effekt auf die Position des Cys208 und damit auf das Chromophor hat, als die Glutathionylierung des Cys208 selbst. Denkbar ist allerdings auch, dass die Glutathionylierung des Cys151 dessen Position so verändert, dass das angrenzende His152 in Reichweite für eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Sauerstoffatom des Tyr66-Phenols gebracht wird und somit ein protonierter Zustand dieses Rests leicht begünstigt wird (vgl. [100] Abb. 3). Zur genaueren Bestimmung müssten Kristall- oder NMR-Strukturen der beiden oxidierten Monothiol-roGFP2 Mutanten erfasst werden.

Vergleicht man die Oxidationskinetik der beiden Grx-Varianten, so lässt sich ein schnellerer Übertrag durch die Monothiolvariante erkennen. Dies kann auf eine Veränderung der Konformation und Reaktivität des aktiven Cysteins durch Anwesenheit oder Abwesenheit eines zweiten Cysteins im aktiven Zentrum hindeuten. Das zweite Thiol scheint demnach wichtig für die *Glutathion-Scaffold-Site* zu sein und ermöglicht ein stärkeres Binden der oxidierten Glutathioneinheit in die *Scaffold-Site*, was einen Übertrag dieser Einheit auf das roGFP2 verlangsamt. Eine andere Erklärung für die langsamere Kinetik des PfGrx^{C88S} könnte eine teilweise ausgebildete interne Disulfidbrücke sein. Liegen nur 50 % des glutathionylierten Dithiol-Grx tatsächlich als glutathionylierte Spezies vor, so läge der gemessene k_{ox} -Wert demnach auch nur bei 50 %. Eine Kombination aus beiden Effekten ist hier wahrscheinlich.

Björnberg *et al.* haben 2006 [113] bereits die Reaktion von rxYFP mit Grx1p aus Hefe studiert. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Oxidation von rxYFP nur durch ein

Grx1p-SSG Intermediat effizient stattfinden kann. Es wurde ebenfalls die Interaktion einer Monothiol-Variante Grx1p-sC mit rxYFP untersucht, welche im rxYFP-Grx1p-sC Fusionskonstrukt die Oxidation von rxYFP durch GSSG siebenmal schneller katalysieren konnte als die Dithiolvariante rxYFP-Grx1p.

Als unfusioniertes Einzelprotein wurde roGFP2 bereits von Trnka *et al.* 2020 [153] als Elektronendonator und -akzeptor genutzt, um die Aktivität von Glutaredoxinen und Glutaredoxinmutanten zu bestimmen. Im Zuge dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Glutaredoxine roGFP2 durch den Übertrag von Glutathion oxidieren. Dazu wurden wie in dieser Dissertation Monothiol-roGFP2-Mutanten erstellt. Trnka *et al.* konnten jedoch keine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften der Monothiol-roGFP2-Mutanten in reduziertem oder glutathionyliertem Zustand zeigen, wodurch wichtige Informationen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus zwischen roGFP2 und Grx nicht erfasst werden konnten.

Zusätzlich wurde der Übertrag des Glutathion von Grx-SSG auf roGFP2-(SH)₂ nicht isoliert betrachtet, sondern nur die Gesamtreaktion $\text{Grx-SH} + \text{roGFP2-(SH)}_2 + \text{GSSG} \rightarrow \text{Grx-SH} + \text{roGFP2-S}_2 + 2 \text{GSH}$. Es konnte also nicht darauf eingegangen werden, dass der Übertrag der Glutathioneinheit selbst geschwindigkeitsbestimmend sein kann und eine Aktivitätsbestimmung von Grx mit roGFP2 als Reporterprotein so an seine Grenzen stoßen kann.

4.4.2. Nutzung von Mono- und Dithiol-roGFP2 als Proteinsubstrat zeigt, dass PfGrx GSH zur Reduktion von nicht-Glutathion-Disulfiden aktivieren muss

Ausgangspunkt für die Untersuchung der reduktiven Halbreaktion von roGFP2 war zunächst mit Diamid oxidiertes roGFP2^{WT}-S₂, welches mit reduziertem PfGrx^{C32/88S} oder PfGrx^{C88S} gemischt wurde. In zuvor durchgeführten Kinetikmessungen mit Glutaredoxinen wurde HEDS als Disulfid Modells substrat genutzt [86], welches zum einen ein wesentlich kleineres Substrat ist und sich somit besser in das aktive Zentrum des Grx einlagern kann, zum anderen waren diese Messungen stets an die reduktive Halbreaktion des Grx mit GSH gekoppelt. Bei diesem Test wird, analog zum GSSCys-Test, erst das durch die GR verbrauchte NADPH gemessen. Durch das Verwenden von roGFP2 kann die Oxidation von PfGrx entkoppelt von seiner Reduktion visualisiert werden [121].

Während für das Monothiol-Grx zu erwarten war, dass roGFP2^{WT}-S₂ in Abwesenheit von GSH nicht reduziert werden kann, ist es überraschend, dass PfGrx^{C88S} dazu ebenfalls nicht in der

Lage war. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass GSH von essenzieller Bedeutung zur Reduktion von Disulfidsubstraten durch das PfGrx ist und nicht nur der Regeneration des oxidierten Grx dient. Rückschlüsse auf die Reaktion mit physiologischen Substraten müssen jedoch mit Bedacht gefasst werden, da eine sterisch ungünstige Ausrichtung der Cysteine nicht ausgeschlossen werden kann.

Erst das Zugeben von GSH hat eine Reduktion des roGFP2 ermöglicht. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist hierbei für das Dithiol-Grx deutlich größer und steigt sowohl mit größerer GSH- als auch mit steigender Grx-Konzentration. Abhängig von der eingesetzten Menge GSH nähert sich die Reduktionsgeschwindigkeit bei größerer Grx-Konzentration einer Sättigung.

Auch das Monothiol-Grx ist in der Lage in Anwesenheit von GSH ein Dithiolsubstrat zu reduzieren, wenn auch etwa 10-mal langsamer als die Dithiolvariante. Ein leichtes Sättigungsverhalten ist für das PfGrx^{C32/88S} erst bei höchster GSH-Konzentration zu erkennen und tritt bei größeren Grx-Konzentrationen (> 100 μM) vermutlich im Bereich eines ähnlichen k_{obs} -Wertes wie bei der Dithiolvariante ein. Es ist also denkbar, dass das Grx ein Molekül GSH transient rekrutieren kann, und nur in dieser kombinierten Form eine Reduktion des Disulfidsubstrats vornehmen kann. Hierzu muss sich ein ternärer Komplex aus roGFP2, PfGrx und GSH bilden, welcher, z. B. durch die hier geringe roGFP2-Konzentration in richtiger Orientierung, gesättigt werden kann.

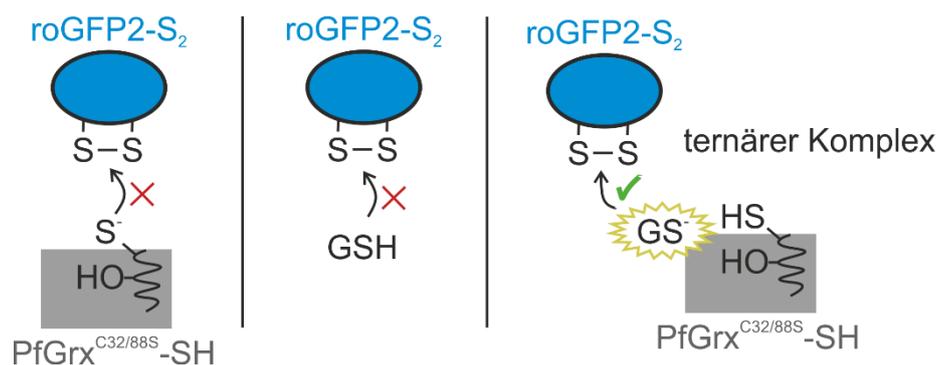


Abbildung 36 PfGrx muss GSH rekrutieren und aktivieren um oxidiertes roGFP2-S₂ zu reduzieren.

roGFP2-S₂ kann weder durch PfGrx alleine (links), noch durch GSH alleine (mitte) effizient reduziert werden. Ein Molekül GSH muss zunächst von PfGrx aktiviert werden (rechts), um die Disulfidbrücke des roGFP2 auflösen zu können und das roGFP2 zu glutathionylieren. Auf diese Weise können auch Monothiol-Glutaredoxine nicht-Glutathion-Disulfide reduzieren.

Um zu bestätigen, dass PfGrx das GSH zunächst aktivieren muss, wurde ein Kompetitions-Test durchgeführt, bei dem GSMe in 5-fachem Überschuss gegenüber GSH der Reaktion

hinzugefügt wurde. Die hieraus resultierende kleinere Reduktionsgeschwindigkeit deutet darauf hin, dass GSMe die GSH-Bindungsstelle im Grx kompetitiv blockieren kann. Da hierdurch die Gesamtreaktion langsamer wird, ist anzunehmen, dass sich GSH an das Grx anlagern muss, bevor es mit roGFP2 reagieren kann. Hier wird es vermutlich zu einem GS⁻ aktiviert, wodurch seine Reaktivität stark erhöht wird. Dieses GS⁻ löst dann die Disulfidbrücke im roGFP2 auf und glutathionyliert es.

Meyer *et al.* [121] zeigten 2007 bereits, dass roGFP2-S₂ durch GSH alleine nicht effizient reduziert werden konnte. Die Zugabe von AtGRX C1 ermöglichte jedoch die Reduktion von roGFP2 in moderater Geschwindigkeit. Eine Kontrollreaktion, bei der AtGRX C1 roGFP2 in Abwesenheit von GSH reduzieren sollte, wurde jedoch nicht durchgeführt.

Die Deglutathionylierungen von roGFP2^{C151S} und roGFP2^{C208S} zeigen ebenfalls eine 4-10-mal schnellere Reduktion durch PfGrx^{C88S} verglichen mit PfGrx^{C32/88S}. Dies bestätigt die Beobachtung, dass das Cys32 die Reaktivität des Cys29 beeinflusst. Da die Deglutathionylierung von roGFP2-SSG schnell abläuft, stellt die Glutathionylierung des oxidierten roGFP2^{WT}-S₂ vermutlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion dar.

Die Reduktion der glutathionylierten roGFP2-Monothiolvarianten durch PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} zeigt keine klare Veränderung durch Zugabe oder Weglassen von GSH, was auf eine GSH-unabhängige Reaktion hindeutet. Beide Grx-Varianten sind in der Lage die Reduktion von roGFP2^{C151S}-SSG und roGFP2^{C208S}-SSG effizient zu katalysieren. Mit einer Geschwindigkeit von 10⁶ M⁻¹s⁻¹ läuft diese Reaktion sogar etwa 100-mal schneller ab als die Oxidation von unfusioniertem roGFP2 durch PfGrx.

Da sich die reduzierte und die glutathionylierte roGFP2^{C208S}-Spezies in ihren Fluoreszenzeigenschaften gut voneinander unterscheiden, eignet sich diese roGFP2-Mutation auch für zukünftige Untersuchungen als glutathionyliertes Proteinsubstrat.

4.4.3. Die Geschwindigkeit des Übertrags einer Glutathioneinheit im roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukt ist limitiert

Zuletzt wurden die Fusionskonstrukte zwischen roGFP2 und PfGrx untersucht. Die Primärdiagramme wiesen hier zwei Phasen auf, zunächst einen leichten Anstieg der Fluoreszenz, gefolgt von einem starken Abfall. Die Geschwindigkeit beider Phasen zeigt eine GSSG-Abhängigkeit, die mit größerer Substratkonzentration ansteigt, bevor sie sich einem

Sättigungswert annähert. Während die zweite Phase in der Größenordnung bekannter Werte für die oxidative Halbreaktion aktiver Grx liegt, zeigt die erste Phase eine Reaktionsgeschwindigkeit k_1^{ox} im Bereich von $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die aufgenommene Fluoreszenzänderung kann also keine Folge der Oxidation des Glutaredoxins sein, da sie zu schnell auftritt. Betrachtet man in der *Stopped-flow* Apparatur eine Reaktion von roGFP2 mit GSSG ohne verknüpftes Grx (Anhang 17), so ist diese Phase nicht zu sehen. Es handelt sich hierbei also um eine Grx-abhängige Änderung der Fluoreszenz in roGFP2, was auch daran zu erkennen ist, dass sie bei verschiedenen Grx-Varianten variiert. Eine mögliche Erklärung dieser Phase kann die Anlagerung von GSSG in die *Scaffold-Site* des PfGrx sein. Das Einpassen dieses Substrats kann zu einer Veränderung der relativen Lage von Grx zu roGFP2 führen, sodass sich die elektrische Umgebung am roGFP2 ändert und sich somit das Spektrum verschiebt. Es ist ebenfalls denkbar, dass die geladenen Reste des Glutathions mit den teilweise als Thiolat vorliegenden Cysteinen des roGFP2 wechselwirken und somit Auswirkung auf die Protonen-Transport-Kette in dessen Chromophor haben. Die Sättigung ist dann durch eine sterische Hinderung der *Glutathion-Scaffold-Site* durch das roGFP2 hervorgerufen worden, wodurch das GSSG nicht in einer ungehinderten bimolekularen Reaktion assoziieren und dissoziieren kann. Es muss ebenfalls beachtet werden, dass roGFP2 das Anlagern von Glutathion an des PfGrx nur dann detektieren kann, wenn das aktive Zentrum des Grx roGFP2 zugewandt ist (Abb. 37).

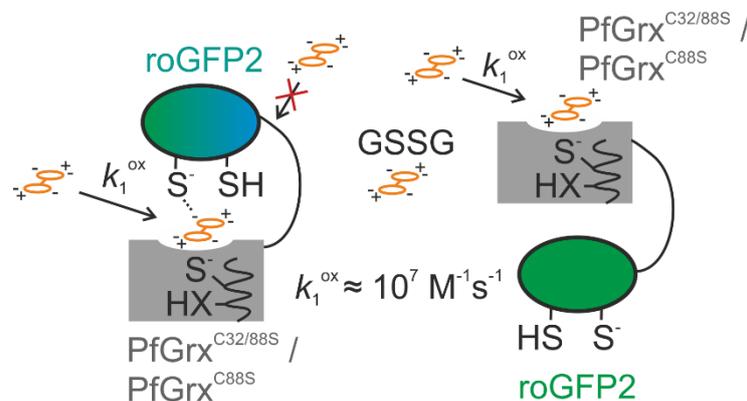


Abbildung 37 Schematische Darstellung der Assoziation von GSSG an PfGrx im roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukt. Hypothetische Erklärung von k_1^{ox} im roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukt. GSSG (orange) kann sich an PfGrx anlagern ($k_1^{\text{ox}} \approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Die geladenen Reste des GSSG wechselwirken dann mit den teilweise als Thiolat vorliegenden Cysteinen des roGFP2 und verursachen eine Änderung der Fluoreszenz. Diese Anlagerung findet nicht in einer ungehinderten bimolekularen Reaktion zwischen PfGrx und GSSG statt, da roGFP2 den Zugang zu der *Glutathion-Scaffold-Site* teilweise blockiert. Ist das aktive Zentrum des PfGrx dem roGFP2 abgewandt, so hat diese Assoziation keine Auswirkung auf die Fluoreszenz von roGFP2.

Auffällig für die erste Phase ist zudem die langsamere Kinetik des Monothiol-Grx. Der zuvor aufgestellten Hypothese folgend, bedeutet dies, dass sich das GSSG langsamer in die

Glutathion-Scaffold-Site einfügt, als dies bei den Dithiol-Varianten geschieht. Dies bestätigt erneut, dass das zweite Cystein im aktiven Zentrum die Konformation des aktiven Cysteins beeinflussen kann.

k_2^{ox} bewegt sich für die drei hier getesteten Fusionskonstrukte in einem ähnlichen Bereich von $4-6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und spiegelt somit die Reaktion von PfGrx mit GSSG, den darauffolgenden Übertrag auf roGFP2 und die Ausbildung einer internen Disulfidbrücke in roGFP2 wider. Bei erster Betrachtung kann also bestätigt werden, dass sich ein roGFP2-Fusionskonstrukt dazu eignet, die Aktivität eines Grx abzuschätzen, wie es in Liedgens *et al.* 2020 vorgeschlagen wurde. Die Sekundärdiagramme zeigen allerdings auch ein Sättigungsverhalten für große GSSG-Konzentrationen, welches vermutlich die schnellstmögliche Übertragung der Glutathioneinheit von PfGrx auf roGFP2 im Fusionskonstrukt darstellt. Obwohl die zytosolische GSSG-Konzentration vermutlich im nanomolaren Bereich liegt [16], könnte diese Sättigung bei hohen lokalen GSSG-Konzentrationen oder bei dynamischen Messungen innerhalb von Zellkompartimenten eine Rolle spielen.

Von Björnberg *et al.* 2006 durchgeführte Messungen [113] mit rxYFP-Grx1p (CPYC-Motiv) und rxYFP-Grx1p-sC (CPYS-Motiv) zeigten kein Sättigungsverhalten bei der Oxidation der Fusionskonstrukte durch bis zu $20 \mu\text{M}$ GSSG. Mit Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung von ca. $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (rxYFP-Grx1p) und $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (rxYFP-Grx1p-sC) lief die Oxidation dieser Konstrukte jedoch deutlich langsamer ab als die hier beobachteten Reaktionen, sodass der Übertrag des Glutathion von Grx1p auf rxYFP vermutlich zu keinem Zeitpunkt geschwindigkeitslimitierend war.

Durch die Reaktionsgeschwindigkeit der Einzelproteine $\text{roGFP2}^{\text{WT}}\text{-(SH)}_2$ und $\text{PfGrx}^{\text{C32/88S}}\text{-SSG}$ ($3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Tabelle 14) und die abgeschätzte maximale Übertragungsgeschwindigkeit des Glutathions im Fusionskonstrukt (ca. 10 s^{-1} , Tabelle 17) kann eine theoretische Konzentration des $\text{PfGrx}^{\text{C32/88S}}$ aus der Sicht von $1 \mu\text{M}$ roGFP2 im Fusionskonstrukt errechnet werden. Hier liegt die Annahme zugrunde, dass $\text{PfGrx}^{\text{C32/88S}}$ im Sättigungsbereich der Oxidation des Fusionskonstrukts vollständig glutathionyliert vorliegt und somit gleiche Bedingungen wie in der Reaktion der Einzelproteine $\text{PfGrx}^{\text{C32/88S}}\text{-SSG}$ und roGFP2-(SH)_2 herrschen. Mit $10 \text{ s}^{-1} = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \times c$, wobei c die theoretische Konzentration von $\text{PfGrx}^{\text{C32/88S}}$ in $1 \mu\text{M}$ roGFP2- $\text{PfGrx}^{\text{C32/88S}}$ Fusionskonstrukt darstellt, kann die effektive Glutaredoxinkonzentration auf ca. $333 \mu\text{M}$ abgeschätzt werden. Diese wurde zuvor auf das ca. 1000-fache der realen Grx-

Konzentration geschätzt [100]. Da die maximale Übertragungsgeschwindigkeit eines internen PfGrxC⁸⁸⁵-Disulfids im Fusionskonstrukt noch nicht gemessen werden konnte, kann mithilfe der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion der Einzelproteine PfGrxC⁸⁸⁵-S₂ und roGFP2-(SH)₂ (154 M⁻¹s⁻¹, Tabelle 14) diese Sättigung mit $k = 154 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \times 333 \text{ }\mu\text{M}$ näherungsweise errechnet werden, mit der theoretischen Geschwindigkeitskonstante $k = k^{\text{theo}}_{\text{fus}}^{\text{SS}} \approx 5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Björnberg *et al.* [113] konnten den Übertrag des nicht-Glutathion Disulfids von Grx1p auf rxYFP im Fusionskonstrukt auf ca. $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ abschätzen, was die Tendenz der hier erlangten Ergebnisse bestätigt.

Es ist ebenfalls denkbar, dass der Übertrag des Glutathions von PfGrx auf roGFP2 im Fusionskonstrukt schneller ablaufen kann, die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch durch die Ausbildung der internen Disulfidbrücke in roGFP2 limitiert wird. Zur Überprüfung dieser zwei Hypothesen könnte zum einen die Länge des *Linkers* zwischen roGFP2 und PfGrx variiert werden. Für einen effizienten Übertrag des Glutathions von PfGrx auf roGFP2 gibt es vermutlich eine optimale Anzahl an Aminosäuren zwischen den Fusionspartnern. Fügt man weitere Aminosäuren hinzu oder lässt sie weg, sollte sich $k_{\text{fus}}^{\text{SSG}}$ ändern, sofern der Übertrag des Glutathions geschwindigkeitsbestimmend ist und nicht die intramolekulare Auflösung von roGFP2-SSG/SH zu roGFP2-S₂.

Zum anderen könnten weitere Fusionskonstrukte mit anderen Glutaredoxinen erstellt werden. Geeignete Kandidaten wären hierfür ScGrx7 und HsGrx5, die bereits gut untersucht wurden [96, 126]. Bei Betrachtung dieser Konstrukte in der *Stopped-flow* Apparatur sollte sich ebenfalls eine Sättigung einstellen. Ist diese im selben Bereich wie die hier mit PfGrx gemessene, also unabhängig vom Fusionspartner, so weist dies auf eine langsame Ausbildung der Disulfidbrücke hin. Stellt sich eine Sättigung bei einem anderen Wert ein, ungeachtet davon ob er größer oder kleiner ist, ist das Sättigungsverhalten Fusionspartner-abhängig und auf den Übertrag der Oxidationsäquivalente von Sensor auf Reporter zu erklären.

Auch können andere nicht-Glutaredoxin Proteine für ein Fusionskonstrukt gewählt werden, z. B. roGFP2-PfAOP, um die Interaktion von roGFP2 mit Proteinen in einem weiteren Blickwinkel zu untersuchen. PfAOP ist ein Peroxiredoxin, dessen Rolle in der Zelle hauptsächlich die Entgiftung von Peroxiden wie H₂O₂ darstellt. Dieses Protein wurde bereits gut studiert und sogar als Fusionskonstrukt mit roGFP2 in Hefe vermessen [33, 133]. Es sollte

jedoch bedacht werden, dass es bei der Reaktion mit Peroxiredoxinen in deren oxidativen Halbreaktionen zu keiner Glutathionylierung des roGFP2 kommt und ein eventuell auftretendes Sättigungsverhalten mit Bedacht interpretiert werden muss.

Aufgrund der hier gezeigten Daten wurde folgendes Reaktionsmodell erstellt (Abb. 38):

Ausgehend von glutathionyliertem PfGrx findet ein schneller Übertrag des Gluthions auf das reduzierte roGFP2 statt, bevorzugt über den Rest Cys208, mit einer Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich von $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($k_{\text{ox}}^{\text{SSG}}$). Dieser Übertrag ist im Fusionskonstrukt vermutlich auf ca. 10 s^{-1} ($k_{\text{fus}}^{\text{SSG}}$) limitiert. Glutathionyliertes roGFP2 kann hiernach eine interne Disulfidbrücke ausbilden, wobei GSH freigesetzt wird.

Wird die Reaktion mit PfGrx^{C88S}-S₂ begonnen, so zeigt sich ein extrem ineffizienter Übertrag der Oxidation auf das reduzierte roGFP2 mit $k_{\text{ox}}^{\text{SS}} \approx 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Den geschwindigkeitslimitierenden Schritt stellt vermutlich die Ausbildung des transienten Heterodimers zwischen roGFP2 und PfGrx dar, das sich danach schnell zugunsten des oxidierten roGFP2 auflöst. Im Fusionskonstrukt ist dieser Übertrag durch den theoretisch errechneten Wert $k^{\text{theo}}_{\text{fus}}^{\text{SS}} \approx 5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ limitiert.

Die Reduktion von oxidiertem roGFP2-S₂ ist sehr langsam und kann durch PfGrx nur über ein rekrutiertes und aktiviertes GS⁻ erfolgen ($k_{\text{red}}^{\text{SS}} \approx 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei physiologischer GSH-Konzentration von ca. 5 mM), welches vermutlich die Disulfidbrücke des roGFP2 direkt angreift und anschließend auf das Cys29 des Grx übertragen wird ($k_{\text{red}}^{\text{SSG}} \approx 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). PfGrx-SSG kann hiernach durch ein weiteres Molekül GSH unter Bildung von GSSG reduziert und regeneriert werden.

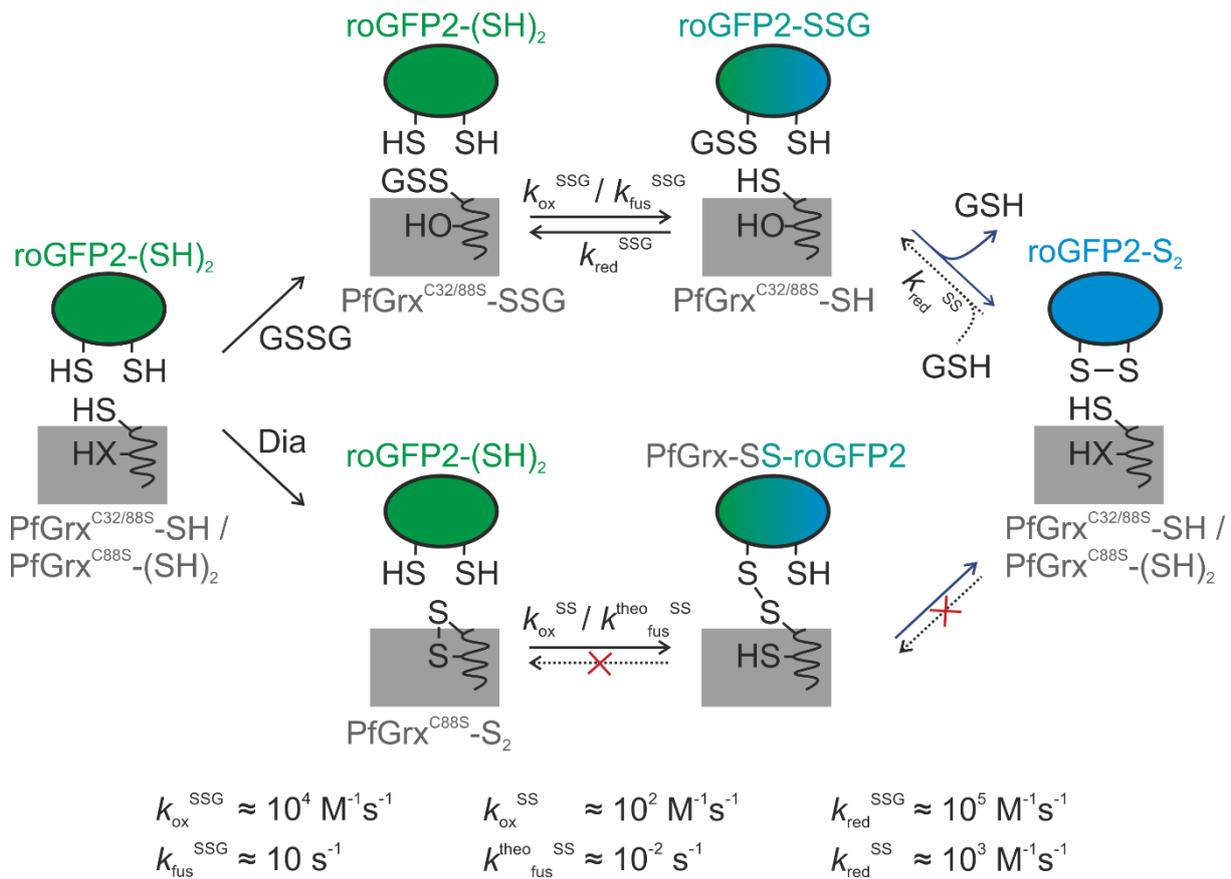


Abbildung 38 Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von roGFP2 und PfGrx.

Oben: Glutathonyliertes PfGrx reagiert schnell mit reduziertem roGFP2 ($k_{\text{ox}}^{\text{SSG}}$, ca. $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), indem es die Glutathioneinheit überträgt, innerhalb des Fusionskonstrukts maximal mit ca. 10 s^{-1} ($k_{\text{fus}}^{\text{SSG}}$). Unter Abspaltung von GSH bildet das roGFP2 eine interne Disulfidbrücke aus (blauer Pfeil, Geschwindigkeit konnte nicht bestimmt werden). Unten: PfGrx mit einem internen Disulfid reagiert nur langsam mit roGFP2 zu einem transienten intermolekularen Disulfid ($k_{\text{ox}}^{\text{SS}}$, ca. $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), innerhalb des Fusionskonstrukts maximal mit ca. $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($k_{\text{fus}}^{\text{theo SS}}$). Dieses wird schnell wieder zugunsten des oxidierten roGFP2 aufgelöst (blauer Pfeil, Geschwindigkeit konnte nicht bestimmt werden). Die Reduktion von oxidiertem roGFP2 findet durch ein von PfGrx aktiviertes GS⁻-Molekül statt ($k_{\text{red}}^{\text{SS}}$, ca. $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dieses wird von PfGrx hiernach in einer Deglutathonylierungsreaktion reduziert ($k_{\text{red}}^{\text{SSG}}$, ca. $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

5. Fazit und Ausblick

Durch die Arbeit mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* konnte ein Stamm erzeugt werden, der ein genomisch integriertes *PFPRX6-HIS₈-GFP*-Konstrukt enthält. Diese Integration konnte durch PCRs bestätigt werden. Kommerzielle Sequenzierungen verifizierten die korrekte Rekombination, allerdings nicht über die Homologieregion des *PFPRX6* auf dem pSLI hinaus. Es war noch nicht möglich, die Anwesenheit des Proteins durch eine Western-Blot Analyse oder Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Vor der Weiterarbeit mit diesem Stamm sollten weitere Sequenzierungen vorgenommen werden, bis mindestens das gesamte 5'-Ende des *PFPRX6*-Lokus überprüft wurde. Hiernach sollte die korrekte Expression von *PFPRX6-HIS₈-GFP* sichergestellt werden, entweder durch Fluoreszenzmikroskopie, die Nutzung anderer Antikörper zur Reinigung und Detektion, oder durch eine Analyse mittels Massenspektrometrie. Der Stamm kann ggf. genutzt werden, um weitere Studien zum Reduktionspartner von PfPrx6 und seiner Lokalisierung in der Zelle vorzunehmen.

Im Hinblick auf die Aktivität von ScGrx7 und HsGrx5 konnten wichtige Motive identifiziert werden, die Unterschiede in der katalytischen Aktivität zwischen Klasse 1 und Klasse 2 Glutaredoxinen verursachen. Durch das Ersetzen des RR-Motivs in ScGrx7 durch WP konnte die oxidative Halbreaktion stark verlangsamt werden und somit die Relevanz dieser Reste, sowie die der benachbarten Schleife, für das Binden und Reduzieren glutathionierter Substrate gezeigt werden. Wurde die kurze TG-Sequenz direkt vor dem aktiven Cystein des ScGrx7 durch die lange GTPEQPQ-Schleife des HsGrx5 ersetzt, so verlor ScGrx7 über 99 % seiner Aktivität, während das Entfernen der Schleife in HsGrx5 dieses aktivierte. Diese Schleife ist also einer der essenziellen Gründe für die Aktivität bzw. Inaktivität der beiden Glutaredoxin-Klassen und wurde im Zuge dieser Arbeit als eine Art An- und Ausschalter für ihre katalytische Aktivität interpretiert.

Mithilfe des roGFP2 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass PfGrx GSNO direkt reduziert und somit eine Rolle in der NO-Signaltransduktion spielen kann.

Die Reaktion zwischen PfGrx und roGFP2 wurde im Detail untersucht und konnte Schritt für Schritt aufgeklärt werden. Die Daten zeigen eine schnelle Oxidationsdynamik von roGFP2 über

seinen Cys208 Rest, wenn der Oxidationstransfer über ein Glutathion vermittelt wird. Die Oxidation von roGFP2 durch den Übertrag eines internen Disulfids von PfGrxC⁸⁸⁵ war nur sehr langsam. Dies bedeutet, dass sich roGFP2-Grx-Fusionskonstrukte zur dynamischen *in cellulo* Untersuchung von Disulfidsubstraten nur bedingt eignen und störungsanfällig gegenüber unerwünschten Nebenreaktionen sein können. Desweiteren scheint der Übertrag der Oxidationsäquivalente von Grx auf roGFP2 auch im Falle einer Fusion limitiert zu sein.

Durch die Untersuchung der reduktiven Halbreaktion konnten ebenfalls Informationen über das PfGrx gesammelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Dithiol-PfGrx die Reduktion von sowohl nicht-Glutathion-Disulfid- als auch von Glutathionsubstraten effizienter katalysiert als die Monothiolvariante, was die Beobachtungen von Djuka *et al.* 2013 [139] bestätigt. Sowohl Monothiol- als auch Dithiol-Grx können Protein-Disulfidsubstrate reduzieren, indem ein Molekül GSH aktiviert wird und damit effizient mit dem Substrat reagieren kann, wonach das Substrat von Grx deglutathionyliert wird.

Ebenfalls konnte das Potential von roGFP2^{C208S} als Modellsubstrat zur weiteren Untersuchung von Kinetiken von Glutaredoxinen verdeutlicht werden, da eine (De-)Glutathionylierung eine deutlich messbare Fluoreszenzänderung aufweist.

In der Zukunft kann es sich lohnen, die Reaktion von roGFP2-PfGrx mit anderen Substraten wie HEDS oder Protein-Disulfiden zu untersuchen, um die Grenzen dieses Fusionskonstrukts besser zu beschreiben. Auch eine Interaktion von roGFP2 mit anderen Proteinen kann studiert werden, zum einen mit weiteren Grx-Homologen, zum anderen mit anderen Proteinklassen wie z. B. Peroxiredoxinen, um den genauen Übertrag von Oxidationsäquivalenten auf roGFP2 in einem größeren Blickwinkel zu verstehen. Dies würde ein zuverlässigeres Interpretieren von Daten aus einer Vielzahl von roGFP2-Assays ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

1. *World malaria report 2021*. 2021, World Health Organization.
2. Mehlhorn, H., *Die Parasiten des Menschen: Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen*. 2012: Springer-Verlag.
3. Bartoloni, A. and L. Zammarchi, *Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012. **4**(1): p. e2012026.
4. Mota, M.M. and A. Rodriguez, *Migration through host cells: the first steps of Plasmodium sporozoites in the mammalian host*. *Cellular microbiology*, 2004. **6**(12): p. 1113-1118.
5. Prudêncio, M., A. Rodriguez, and M.M. Mota, *The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage*. *Nature Reviews Microbiology*, 2006. **4**(11): p. 849-856.
6. Grüning, C., et al., *Development and host cell modifications of Plasmodium falciparum blood stages in four dimensions*. *Nature communications*, 2011. **2**(1): p. 1-11.
7. Lazarus, M.D., T.G. Schneider, and T.F. Taraschi, *A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Journal of cell science*, 2008. **121**(11): p. 1937-1949.
8. Gerald, N., B. Mahajan, and S. Kumar, *Mitosis in the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic cell*, 2011. **10**(4): p. 474-482.
9. Preiser, P., et al., *The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion*. *Microbes and Infection*, 2000. **2**(12): p. 1461-1477.
10. Coleman, B.I., et al., *A Plasmodium falciparum histone deacetylase regulates antigenic variation and gametocyte conversion*. *Cell host & microbe*, 2014. **16**(2): p. 177-186.
11. Aly, A.S., A.M. Vaughan, and S.H. Kappe, *Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host*. *Annual review of microbiology*, 2009. **63**: p. 195-221.
12. Prevention, C.f.D.C.a. 2020; Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.
13. Pagola, S., et al., *The structure of malaria pigment β -haematin*. *Nature*, 2000. **404**(6775): p. 307-310.
14. Müller, S., *Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*, 2004. **53**(5): p. 1291-1305.
15. Wang, M., et al., *PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life*. *Molecular & cellular proteomics*, 2012. **11**(8): p. 492-500.
16. Deponte, M., *The incomplete glutathione puzzle: just guessing at numbers and figures?* *Antioxidants & redox signaling*, 2017. **27**(15): p. 1130-1161.
17. Hofmann, B., H.-J. Hecht, and L. Flohé, *Peroxiredoxins*. 2002.
18. Hall, A., et al., *Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins*. *Antioxidants & redox signaling*, 2011. **15**(3): p. 795-815.
19. Rhee, S.G. and I.S. Kil, *Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins*. *Annual review of biochemistry*, 2017. **86**: p. 749-775.
20. Trujillo, M., G. Ferrer-Sueta, and R. Radi, *Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins*. *Methods in enzymology*, 2008. **441**: p. 173-196.
21. Knoops, B., E. Loumaye, and V. Van Der Eecken, *Evolution of the peroxiredoxins*. In "Peroxiredoxin Systems," (L. Flohé and JR Harris, eds.), *Subcellular Biochemistry*,

- Vol. 44. 2007, Springer, New York.
22. Jang, H.H., et al., *Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function*. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 625-635.
 23. Moon, J.C., et al., *Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(31): p. 28775-28784.
 24. Chuang, M.-H., et al., *The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of Helicobacter pylori switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(8): p. 2552-2557.
 25. Castro, H., et al., *Leishmania mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity*. *PLoS pathogens*, 2011. **7**(10): p. e1002325.
 26. Vivancos, A.P., et al., *A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(25): p. 8875-8880.
 27. Bozonet, S.M., et al., *Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(24): p. 23319-23327.
 28. Iwai, K., A. Naganuma, and S. Kuge, *Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkylhydroperoxides to induce disulfide bond formation in the Cad1 transcription factor*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(14): p. 10597-10604.
 29. Jarvis, R.M., S.M. Hughes, and E.C. Ledgerwood, *Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012. **53**(7): p. 1522-1530.
 30. Sobotta, M.C., et al., *Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling*. *Nature chemical biology*, 2015. **11**(1): p. 64-70.
 31. Stöcker, S., et al., *A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation*. *Nature chemical biology*, 2018. **14**(2): p. 148-155.
 32. Deponte, M., *Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013. **1830**(5): p. 3217-3266.
 33. Schumann, R., L. Lang, and M. Deponte, *Characterization of the glutathione-dependent reduction of the peroxiredoxin 5 homolog PfAOP from Plasmodium falciparum*. *Protein Science*, 2022. **31**(5): p. e4290.
 34. Sarma, G.N., et al., *Crystal structure of a novel Plasmodium falciparum 1-Cys peroxiredoxin*. *Journal of molecular biology*, 2005. **346**(4): p. 1021-1034.
 35. Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus, *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. *Science*, 2003. **300**(5619): p. 650-653.
 36. D'Autréaux, B. and M.B. Toledano, *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007. **8**(10): p. 813-824.
 37. Hall, A., P.A. Karplus, and L.B. Poole, *Typical 2 - Cys peroxiredoxins -structures, mechanisms and functions*. *The FEBS journal*, 2009. **276**(9): p. 2469-2477.
 38. Brigelius-Flohé, R. and L. Flohé, *Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors*. *Antioxidants & redox signaling*, 2011. **15**(8): p. 2335-2381.
 39. Greetham, D., et al., *Oxidation of the yeast mitochondrial thioredoxin promotes cell death*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013. **18**(4): p. 376-385.
 40. Choi, H.-J., et al., *Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å*

- resolution*. Nature structural biology, 1998. **5**(5): p. 400-406.
41. Deponte, M. and K. Becker, *Biochemical characterization of Toxoplasma gondii 1-Cys peroxiredoxin 2 with mechanistic similarities to typical 2-Cys Prx*. Molecular and biochemical parasitology, 2005. **140**(1): p. 87-96.
 42. Nakamura, T., et al., *Oxidation of archaeal peroxiredoxin involves a hypervalent sulfur intermediate*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(17): p. 6238-6242.
 43. Loumaye, E., et al., *Cloning and characterization of Arenicola marina peroxiredoxin 6, an annelid two-cysteine peroxiredoxin highly homologous to mammalian one-cysteine peroxiredoxins*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. **45**(4): p. 482-493.
 44. Jeon, S.-J. and K. Ishikawa, *Characterization of novel hexadecameric thioredoxin peroxidase from Aeropyrum pernix K1*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(26): p. 24174-24180.
 45. Kang, S.W., I.C. Baines, and S.G. Rhee, *Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(11): p. 6303-6311.
 46. Kawazu, S.-i., et al., *Peroxiredoxins in malaria parasites: parasitologic aspects*. Parasitology international, 2008. **57**(1): p. 1-7.
 47. Manevich, Y., S. Feinstein, and A. Fisher, *Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with π GST*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(11): p. 3780-3785.
 48. Nickel, C., et al., *Thioredoxin networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum*. Antioxidants & redox signaling, 2006. **8**(7-8): p. 1227-1239.
 49. Feld, K., et al., *Tyrosine substitution of a conserved active-site histidine residue activates Plasmodium falciparum peroxiredoxin 6*. Protein Science, 2019. **28**(1): p. 100-110.
 50. Herrero, E. and M.A. de la Torre-Ruiz, *Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions*. Cellular and molecular life sciences, 2007. **64**(12): p. 1518-1530.
 51. Lillig, C.H., C. Berndt, and A. Holmgren, *Glutaredoxin systems*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2008. **1780**(11): p. 1304-1317.
 52. Mieyal, J.J., et al., *Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation*. Antioxidants & redox signaling, 2008. **10**(11): p. 1941-1988.
 53. Martin, J.L., *Thioredoxin—a fold for all reasons*. Structure, 1995. **3**(3): p. 245-250.
 54. Liedgens, L. and M. Deponte, *The catalytic mechanism of glutaredoxins*. Glutathione, 2018: p. 251-261.
 55. Nagai, S. and S. Black, *A thiol-disulfide transhydrogenase from yeast*. Journal of Biological Chemistry, 1968. **243**(8): p. 1942-1947.
 56. Axelsson, K., S. Eriksson, and B. Mannervik, *Purification and characterization of cytoplasmic thioltransferase (glutathione: disulfide oxidoreductase) from rat liver*. Biochemistry, 1978. **17**(15): p. 2978-2984.
 57. Holmgren, A., *Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(9): p. 3664-3671.
 58. Tamarit, J., et al., *Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(28): p. 25745-25751.
 59. Deponte, M., K. Becker, and S. Rahlfs, *Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins*. 2005.
 60. Fernandes, A.P., et al., *A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from Escherichia coli*

- can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(26): p. 24544-24552.
61. Filser, M., et al., *Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of Trypanosoma brucei monothiol glutaredoxin-1*. 2008.
 62. Zaffagnini, M., et al., *Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(14): p. 8868-8876.
 63. Outten, C.E. and A.-N. Albetel, *Iron sensing and regulation in Saccharomyces cerevisiae: ironing out the mechanistic details*. *Current opinion in microbiology*, 2013. **16**(6): p. 662-668.
 64. Couturier, J., et al., *The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions?* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2015. **1853**(6): p. 1513-1527.
 65. Elledge, S.J., Z. Zhou, and J.B. Allen, *Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation*. *Trends in biochemical sciences*, 1992. **17**(3): p. 119-123.
 66. Holmgren, A., *Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1976. **73**(7): p. 2275-2279.
 67. Gon, S., M.J. Faulkner, and J. Beckwith, *In vivo requirement for glutaredoxins and thioredoxins in the reduction of the ribonucleotide reductases of Escherichia coli*. *Antioxidants & redox signaling*, 2006. **8**(5-6): p. 735-742.
 68. Avval, F.Z. and A. Holmgren, *Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for Mammalian s phase ribonucleotide reductase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(13): p. 8233-8240.
 69. Song, J.J. and Y.J. Lee, *Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1*. *Biochemical Journal*, 2003. **373**(3): p. 845-853.
 70. Sun, J., et al., *Glutaredoxin 1 (GRX1) inhibits oxidative stress and apoptosis of chondrocytes by regulating CREB/HO-1 in osteoarthritis*. *Molecular immunology*, 2017. **90**: p. 211-218.
 71. Li, Y., et al., *Glutaredoxin 1 mediates the protective effect of steady laminar flow on endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis via inhibiting Bim*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 1-11.
 72. Zhu, Y., et al., *Proliferation and apoptosis of lung cancer cells regulated by glutaredoxin 3*. *Zhonghua Zhong liu za zhi [Chinese Journal of Oncology]*, 2018. **40**(5): p. 325-329.
 73. Gorelenkova Miller, O. and J.J. Mielal, *Critical Roles of Glutaredoxin in Brain Cells—Implications for Parkinson's Disease*. *Antioxidants & redox signaling*, 2019. **30**(10): p. 1352-1368.
 74. Mesecke, N., et al., *A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance*. *Molecular biology of the cell*, 2008. **19**(6): p. 2673-2680.
 75. Mesecke, N., et al., *Two novel monothiol glutaredoxins from Saccharomyces cerevisiae provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins*. *Biochemistry*, 2008. **47**(5): p. 1452-1463.
 76. Izquierdo, A., et al., *Saccharomyces cerevisiae Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway*. *Eukaryotic cell*, 2008. **7**(8): p. 1415-1426.
 77. Couturier, J., et al., *Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(14): p. 9299-9310.
 78. Zaffagnini, M., et al., *Glutaredoxin s12: unique properties for redox signaling*.

- Antioxidants & redox signaling, 2012. **16**(1): p. 17-32.
79. Bushweller, J.H., et al., *Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14. fwdarw. S) and its mixed disulfide with glutathione*. Biochemistry, 1992. **31**(38): p. 9288-9293.
80. Nordstrand, K., et al., *NMR structure of Escherichia coli glutaredoxin 3-glutathione mixed disulfide complex: implications for the enzymatic mechanism*. Journal of molecular biology, 1999. **286**(2): p. 541-552.
81. Zimmermann, J., et al., *One cysteine is enough: A monothiol Grx can functionally replace all cytosolic Trx and dithiol Grx*. Redox biology, 2020. **36**: p. 101598.
82. Eckers, E., et al., *Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from Saccharomyces cerevisiae: the catalytic redox mechanism redux*. Biochemistry, 2009. **48**(6): p. 1410-1423.
83. Begas, P., et al., *Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites*. Nature communications, 2017. **8**(1): p. 1-13.
84. Yang, Y. and W.W. Wells, *Catalytic mechanism of thioltransferase*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(19): p. 12766-12771.
85. Rahlfs, S., M. Fischer, and K. Becker, *Plasmodium falciparum possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 37133-37140.
86. Begas, P., V. Staudacher, and M. Deponte, *Systematic re-evaluation of the bis (2-hydroxyethyl) disulfide (HEDS) assay reveals an alternative mechanism and activity of glutaredoxins*. Chemical science, 2015. **6**(7): p. 3788-3796.
87. Lillig, C.H., et al., *Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(23): p. 8168-8173.
88. Feng, Y., et al., *Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site*. Biochemistry, 2006. **45**(26): p. 7998-8008.
89. Johansson, C., et al., *Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(5): p. 3077-3082.
90. Fladvad, M., et al., *Molecular mapping of functionalities in the solution structure of reduced Grx4, a monothiol glutaredoxin from Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(26): p. 24553-24561.
91. Picciocchi, A., et al., *CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster*. Biochemistry, 2007. **46**(51): p. 15018-15026.
92. Johansson, C., et al., *The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster coordination, tetrameric assembly and monomer activity*. Biochemical Journal, 2011. **433**(2): p. 303-311.
93. Iwema, T., et al., *Structural basis for delivery of the intact [Fe₂S₂] cluster by monothiol glutaredoxin*. Biochemistry, 2009. **48**(26): p. 6041-6043.
94. Tang, Y., et al., *Structure-guided activity enhancement and catalytic mechanism of yeast grx8*. Biochemistry, 2014. **53**(13): p. 2185-2196.
95. Banci, L., et al., *[2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(17): p. 6203-6208.
96. Liedgens, L., et al., *Quantitative assessment of the determinant structural differences between redox-active and inactive glutaredoxins*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 1725.
97. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea*. Journal of cellular and comparative physiology, 1962. **59**(3): p. 223-239.

98. Ormö, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-1395.
99. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature biotechnology, 1996. **14**(10): p. 1246-1251.
100. Meyer, A.J. and T.P. Dick, *Fluorescent protein-based redox probes*. Antioxidants & redox signaling, 2010. **13**(5): p. 621-650.
101. Brejc, K., et al., *Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(6): p. 2306-2311.
102. Elsliger, M.-A., et al., *Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH*. Biochemistry, 1999. **38**(17): p. 5296-5301.
103. Chattoraj, M., et al., *Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(16): p. 8362-8367.
104. Meech, S.R., *Excited state reactions in fluorescent proteins*. Chemical Society Reviews, 2009. **38**(10): p. 2922-2934.
105. Kain, S., et al., *Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization*. Biotechniques, 1995. **19**(4): p. 650-655.
106. Lorenz, H., D.W. Hailey, and J. Lippincott-Schwartz, *Fluorescence protease protection of GFP chimeras to reveal protein topology and subcellular localization*. Nature methods, 2006. **3**(3): p. 205-210.
107. Skube, S.B., J.M. Chaverri, and H.V. Goodson, *Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments in vivo*. Cytoskeleton, 2010. **67**(1): p. 1-12.
108. Koroleva, O.A., et al., *High - throughput protein localization in Arabidopsis using Agrobacterium - mediated transient expression of GFP - ORF fusions*. The Plant Journal, 2005. **41**(1): p. 162-174.
109. Ogawa, H., et al., *Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(25): p. 11899-11903.
110. Schumann, R., et al., *Protein abundance and folding rather than the redox state of Kelch13 determine the artemisinin susceptibility of Plasmodium falciparum*. Redox biology, 2021. **48**: p. 102177.
111. Hanson, G.T., et al., *Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(13): p. 13044-13053.
112. Østergaard, H., et al., *Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein*. The EMBO journal, 2001. **20**(21): p. 5853-5862.
113. Björnberg, O., H. Østergaard, and J.R. Winther, *Mechanistic insight provided by glutaredoxin within a fusion to redox-sensitive yellow fluorescent protein*. Biochemistry, 2006. **45**(7): p. 2362-2371.
114. Østergaard, H., C. Tachibana, and J.R. Winther, *Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol*. The Journal of cell biology, 2004. **166**(3): p. 337-345.
115. Gutscher, M., et al., *Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential*. Nature methods, 2008. **5**(6): p. 553-559.
116. Chi, A.Y., et al., *Prolonged hypoxia increases ROS signaling and RhoA activation in pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells*. Antioxidants & redox signaling, 2010. **12**(5): p. 603-610.
117. Schwarzer, C., et al., *Organelle redox of CF and CFTR-corrected airway epithelia*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. **43**(2): p. 300-316.
118. Brach, T., et al., *Non - invasive topology analysis of membrane proteins in the*

- secretory pathway*. The Plant Journal, 2009. **57**(3): p. 534-541.
119. Jiang, K., et al., *Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in Arabidopsis*. Plant physiology, 2006. **141**(2): p. 397-403.
 120. Klimova, T.A., et al., *Hyperoxia - induced premature senescence requires p53 and pRb, but not mitochondrial matrix ROS*. The FASEB Journal, 2009. **23**(3): p. 783-794.
 121. Meyer, A.J., et al., *Redox - sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer*. The Plant Journal, 2007. **52**(5): p. 973-986.
 122. Heim, R., *Improved green fluorescence*. Nature, 1995. **373**: p. 663-664.
 123. Loi, V.V., et al., *Real-time imaging of the bacillithiol redox potential in the human pathogen Staphylococcus aureus using a genetically encoded bacilliredoxin-fused redox biosensor*. Antioxidants & redox signaling, 2017. **26**(15): p. 835-848.
 124. Tung, Q.N., et al., *Stable integration of the Mrx1-roGFP2 biosensor to monitor dynamic changes of the mycothiol redox potential in Corynebacterium glutamicum*. Redox biology, 2019. **20**: p. 514-525.
 125. Tsachaki, M., et al., *Determination of the topology of endoplasmic reticulum membrane proteins using redox-sensitive green-fluorescence protein fusions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2015. **1853**(7): p. 1672-1682.
 126. Zimmermann, J., et al., *An intracellular assay for activity screening and characterization of glutathione-dependent oxidoreductases*. Free Radical Biology and Medicine, 2021. **172**: p. 340-349.
 127. Gutscher, M., et al., *Proximity-based Protein Thiol Oxidation by H₂O₂-scavenging Peroxidases**. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(46): p. 31532-31540.
 128. Nietzel, T., et al., *The fluorescent protein sensor ro GFP 2 - Orp1 monitors in vivo H₂O₂ and thiol redox integration and elucidates intracellular H₂O₂ dynamics during elicitor - induced oxidative burst in Arabidopsis*. New Phytologist, 2019. **221**(3): p. 1649-1664.
 129. Toledano, M.B., et al., *Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules*. Trends in biochemical sciences, 2004. **29**(7): p. 351-357.
 130. Aller, I., N. Rouhier, and A.J. Meyer, *Development of roGFP2-derived redox probes for measurement of the glutathione redox potential in the cytosol of severely glutathione-deficient rml1 seedlings*. Frontiers in plant science, 2013. **4**: p. 506.
 131. Schuh, A.K., et al., *Stable integration and comparison of hGrx1-roGFP2 and sfroGFP2 redox probes in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. ACS infectious diseases, 2018. **4**(11): p. 1601-1612.
 132. Kasozi, D., et al., *Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. PLoS Pathogens, 2013. **9**(12): p. e1003782.
 133. Staudacher, V., et al., *Redox-sensitive GFP fusions for monitoring the catalytic mechanism and inactivation of peroxiredoxins in living cells*. Redox biology, 2018. **14**: p. 549-556.
 134. Deitsch, K.W., C.L. Driskill, and T.E. Wellems, *Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes*. Nucleic acids research, 2001. **29**(3): p. 850-853.
 135. Birnbaum, J., et al., *A genetic system to study Plasmodium falciparum protein function*. Nature methods, 2017. **14**(4): p. 450-456.
 136. Benting, J., D. Mattei, and K. Lingelbach, *Brefeldin A inhibits transport of the glycoporphin-binding protein from Plasmodium falciparum into the host erythrocyte*.

- Biochemical Journal, 1994. **300**(3): p. 821-826.
137. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
 138. Broniowska, K.A., A.R. Diers, and N. Hogg, *S-nitrosoglutathione*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013. **1830**(5): p. 3173-3181.
 139. Djuika, C.F., et al., *Plasmodium falciparum antioxidant protein as a model enzyme for a special class of glutaredoxin/glutathione-dependent peroxiredoxins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013. **1830**(8): p. 4073-4090.
 140. Kehr, S., et al., *Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites*. PLoS pathogens, 2010. **6**(12): p. e1001242.
 141. Yano, K., et al., *Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins in Plasmodium falciparum erythrocytic stage*. Parasitology international, 2005. **54**(1): p. 35-41.
 142. Fisher, A.B., *Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling*. Archives of biochemistry and biophysics, 2017. **617**: p. 68-83.
 143. Painter, H.J., et al., *Genome-wide real-time in vivo transcriptional dynamics during Plasmodium falciparum blood-stage development*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 1-12.
 144. Kimura, R., et al., *2-Cys peroxiredoxin of Plasmodium falciparum is involved in resistance to heat stress of the parasite*. Parasitology international, 2013. **62**(2): p. 137-143.
 145. Thirumalaikumar, V.P., et al., *Selective autophagy regulates heat stress memory in Arabidopsis by NBR1-mediated targeting of HSP90. 1 and ROF1*. Autophagy, 2021. **17**(9): p. 2184-2199.
 146. Zhang, J., et al., *The BRCA2-MEILB2-BRME1 complex governs meiotic recombination and impairs the mitotic BRCA2-RAD51 function in cancer cells*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 1-18.
 147. Holmström, K.M. and T. Finkel, *Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling*. Nature reviews Molecular cell biology, 2014. **15**(6): p. 411-421.
 148. Rahbari, M., et al., *Detection of thiol-based redox switch processes in parasites—facts and future*. Biological Chemistry, 2015. **396**(5): p. 445-463.
 149. Brock, R., I.H. Hamelers, and T.M. Jovin, *Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor*. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 1999. **35**(4): p. 353-362.
 150. Manevich, Y. and A.B. Fisher, *Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism*. Free Radical Biology and Medicine, 2005. **38**(11): p. 1422-1432.
 151. Monteiro, G., et al., *Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(12): p. 4886-4891.
 152. Vall-Llaura, N., et al., *Reversible glutathionylation of Sir2 by monothiol glutaredoxins Grx3/4 regulates stress resistance*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **96**: p. 45-56.
 153. Trnka, D., et al., *Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 1-12.
 154. JENSEN, D.E., G.K. BELKA, and G.C.D. BOIS, *S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme*. Biochemical Journal, 1998. **331**(2): p. 659-668.
 155. Bateman, R.L., et al., *Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione*

reductase. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(51): p. 35756-35762.

7. Anhang

Erwarteter genomischer Lokus nach Integration des pSLI-PFPRX6-HIS₈-GFP:

a) Nukleotidsequenz

...ATGGCTTACCATTAGGAGCTACTTTCCAACTTTACTGCTACTGCTTCTAATGTAGATGGAGTTTTGACTTTTA
TAAATATGTAGGAGATAATTGGGCTATTTTATTA**GTCACCCACATGATTTTACTC**CCGTTTGT/-/ACCACTGAACTT
GCTGAATTTGGTAA**AAATGCATGAAGAATTTTTAAAACTCAACTGCAAATTAATAGGATTTAGCTGTA**ACTCCAAA
GAATCTCAGATCAATGGATTGAAGATATAAAATTTACGGAAACCTAGATAAGTGGGATATTCCTATGGTTTGT
GATGAATCCAGAGAATTAGCTAACCAATTAAAAATTATGGATGAAAAAGAAAAAGATATTA**AAGGACTTCCAT**
AACTGTAGATGTGTTTTCTTTATTTCTCCAGATAAAAAAGTCAAAGCAACCGTTCTTTATCCAGCCACAACAGG
AAGAAATTCTCAAGAAATTCTTAGAGTTCTTAAATCCTTACAACTTACAAACACACACCCTGTTGCTACTCCTGT
TAATTGGAAAGAAGGAGACAAATGCTGTATCTACCATCTGTTGATAATGCAGACCTTCCAAAACTTTTTAAAA
ATGAAGTAAAAAATTGGATGTACCATCCAAAAGGCATATTTAAGATTTGTTCAAATGGGTACCACCACCAC
CACCACCACCACCACACGCGTGCTAGAGGTGCTGCTGCTGGTGCTGGAGGTGCAGGTAGACGTACGATGAGTA
AAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTT
TCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAA
AACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGCGTATGGTCTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAGATCA
TATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAG
ATGACGGGA**ACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATAC**CCTTGTTAATAGAATCGAGTTAA
AGGTATTGATTTAAAGAAGATGGAAACATTCTGGACACAAATTGGAATACA**ACTATAACTCACACAATG**TAT
ACATCATGGCAGACAAACAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAA**ATTAGACACAACATTGAAGATGGAA**
GCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAA**ACTCCAATTGGCGATGGCCCTG**CTTTTACCAGACAACCATT
ACCTGTCCACACA**ACTG**CCCTTT**CGAAAGATCCCAACG**AAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTT**GT**A
ACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAAG**TCGACGGAGAAGGAAGAGGAAGTTTATTA**
ACATGTGGAGATGTAGAAGAAAATCCAGGACCAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCC
GCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGA**CTGGGCACAACAGACAATC**GGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCG
GCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACG
AGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGC
GGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTGCTCCTGCCGAGA
AAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCCGACCACCAAGC
GAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGC
ATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGA**ACTGTTCCG**CAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT
GACCCATGGCGATGCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAATGGCCGCTTTTCTGGATT**CATCGACTGTG**CCCG
GCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAAT
GGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGA
CGAGTTCTTCTAA....

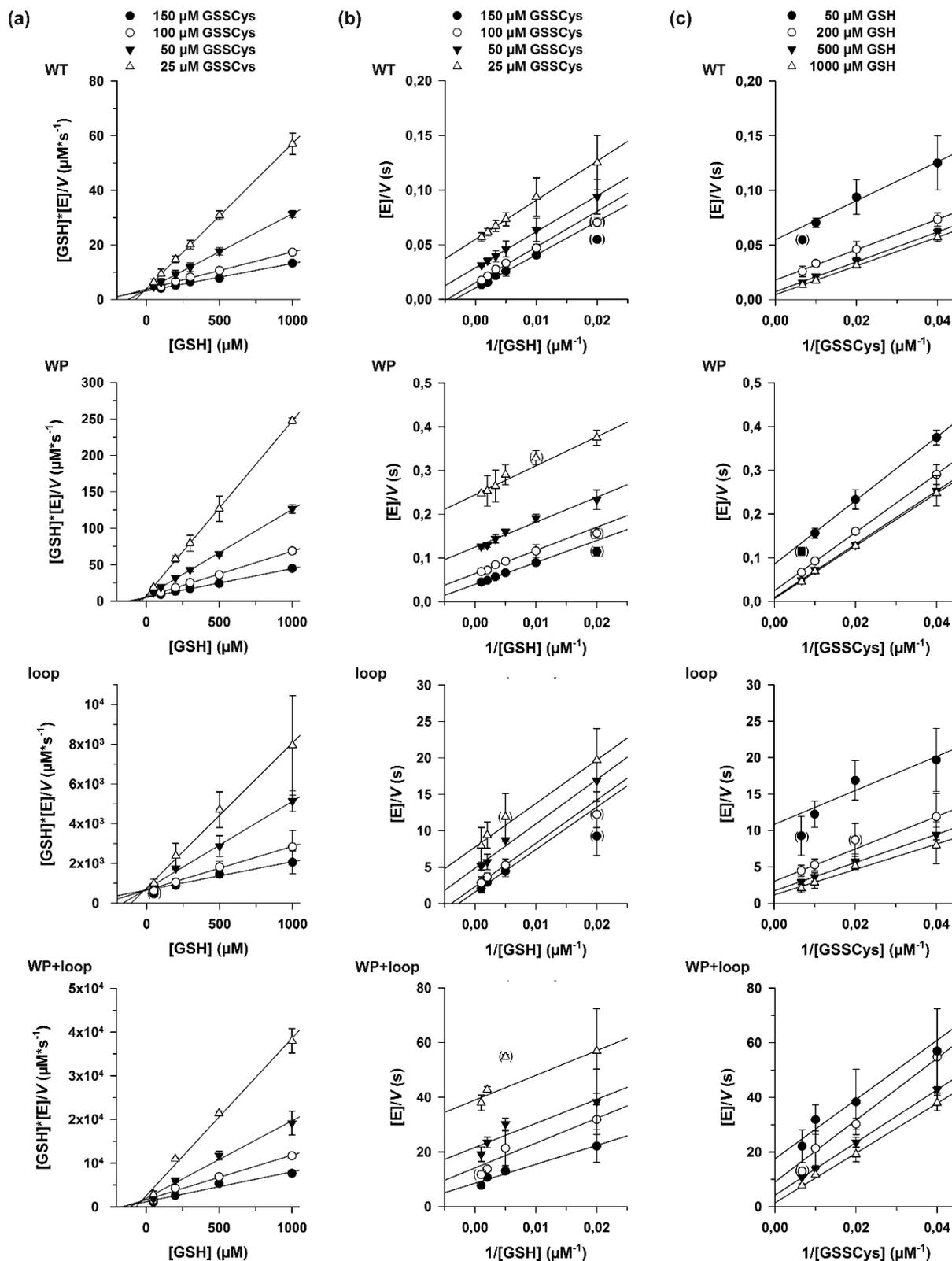
b) Aminosäuresequenz:

...MAYHLGATFPNFTATASNVDGVDFYKYVGDNWAILFS**HPHDFT**PVC/-/TTELA**EF**GK**MHEEFLKLNCKLIGFSCN**
SKESHDQWIEDIKFYGNLDKWDIPMVCDESRELANQLKIMDEKEKDIKGLPLTCRCVFFISPDKKVKATVLYPATTG
RNSQEILRVLKSLQLTNTHPVATPVNWKEGDKCILPSVDNADLPKLFKNEVKKLDVPSQKAYLRFVQMGTHHHH
HHHTRARGAAAGAGGAGRR**MSKGEELFTGVVPI**VELDGDVNGHKFSVSGEGEDATY**GKLT**LKFICTTGKLP
VPWPTLVTT**FAYGLQCFARYPDHMKQHDF**FKSAMPEGVVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK**GID**
FKEDGNILGHKLEYNNSHN**VYIMADKQKNGIKVNF**KIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPD**NHYLST**
QSALSKDPNEKRDMVLL**EFVTAAGITHGM**DELYKVDGEGR**SLT**CGDVEENPG**PMIEQDGLHAGSPA**AAWVE
RLFYD**WAQQT**IGCSDAAV**FRLSAQGRPV**LVKTDLSGALNELQDEARLSWLATTGVPCA**AVLDV**VTEAGRDWLL
LGEVPGQDLLSSHLAPAEKVSIMADAMRR**LHTLDPATCP**FDHQAKHRIERARTRMEAGLVDQDDLDEEHQGLAPA
ELFARLKARMPDGEDLVVTHGDA**CLPNIMVENGR**FSGFIDCGRLGVADRYQDIALATRDIAEELGGEWADRFLVYG
IAAPDSQRIAFYRLLDEFF*....

Anhang 1 Sequenzierungsergebnis des genomischen Lokus von PFPRX6 nach Integration des pSLI-PFPRX6-HIS₈-

GFP.

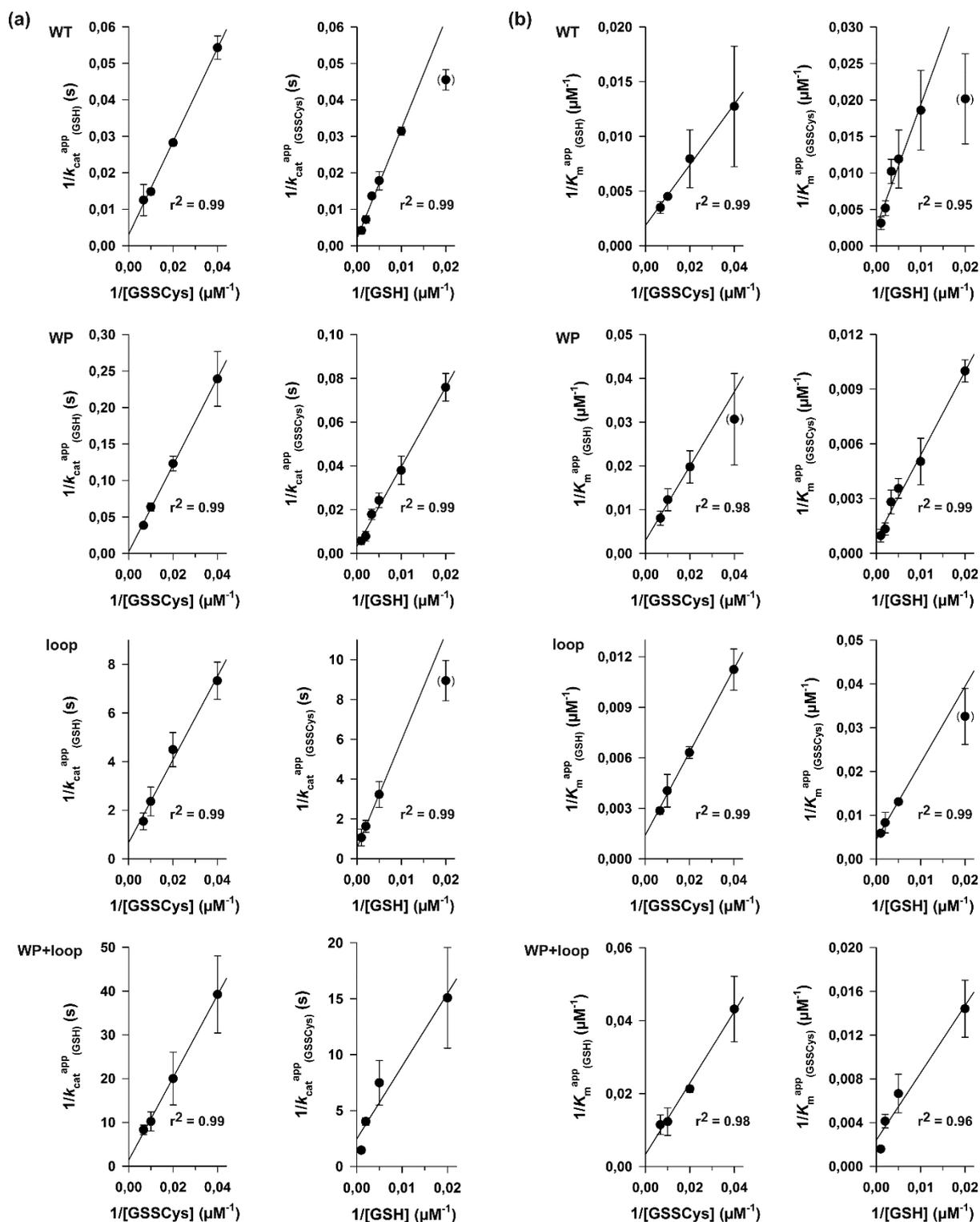
Nachdem die Integration durch PCRs überprüft wurde (siehe Abbildung 9), wurde die 5'-PCR von Eurofins Genomics sequenziert. Als Sequenzierprimer wurden Primer 2 (rückwärts) und Primer 3 (vorwärts) gewählt. Beide Sequenzierungen wurden analysiert und die korrekt sequenzierten Abschnitte sind fettgedruckt und unterstrichen. Kursiv markierte Teile befinden sich nur im Genom und nicht auf dem pSLI. /-/ markiert den Anfang der Homologieregion. Ebenfalls markiert sind *PFPRX6* (rot), *GFP* (grün), *NEO* (braun) und die Bindungsstellen der Sequenzierprimer 2 und 3 (türkis). * steht für ein Stoppkodon.



Anhang 2 GSSCys-Test *Steady-state* Kinetiken von ScGrx7 Wildtyp und Mutanten ScGrx7^{WP}, ScGrx7^{loop} und ScGrx7^{WP+loop}.

(a) Hanes-Diagramme der GSH-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen GSSCys-Konzentrationen. (b) Lineweaver-Burk-Diagramme der GSH-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen GSSCys-Konzentrationen zeigen ein Ping-Pong-Muster. (c) Lineweaver-Burk-Diagramme der GSSCys-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen GSH-Konzentrationen. Datenpunkte und

Fehlerbalken sind die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten, die in SigmaPlot 13 entsprechend der Hanes, Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee-Theorie aufgetragen wurden (teilweise nicht gezeigt). Errechnete $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ und $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ -Werte von den drei verschiedenen Plots wiesen gewöhnlich nicht mehr als 10 % Abweichung voneinander auf. Eingeklammerte Datenpunkte wurden von der Analyse ausgenommen. Wahre Kinetikkonstanten wurden von Sekundärdiagrammen in Anhang 3 errechnet und sind in Anhang 4 aufgelistet. Tabelle 13 zeigt ausgewählte k -Werte von Regressionsgeraden der Hanes-Plots. Siehe auch Anhang Liedgens *et al.* 2020 [96]



Anhang 3 Sekundärdiagramme des GSSCys-Tests für ScGrx7 Wildtyp und Mutanten ScGrx7^{WP}, ScGrx7^{loop} und ScGrx7^{WP+loop}.

(a) Sekundärdiagramme zeigen k_{cat}^{app} -Werte bei verschiedenen GSSCys- (links) und GSH-Konzentrationen (rechts). Dies erlaubt das Errechnen von wahren k_{cat} -Werten vom y-Achsenabschnitt ($1/k_{cat}$) und von wahren K_m -Werten vom x-Achsenabschnitt ($-1/k_m$). Wahre Kinetikkonstanten müssen allerdings aufgrund ihrer Nähe zum Ursprung mit Bedacht interpretiert werden. Dalzielkoeffizienten wurden aus der Steigung der Regressionsgeraden errechnet. (b) Sekundärdiagramme zeigen K_m^{app} -Werte bei verschiedenen GSSCys- (linke Spalten) und GSH-Konzentrationen (rechte Spalten). K_m^{app} und k_{cat}^{app} -Werte wurden von Regressionsgeraden der Hanes-Diagramme (Anhang 2) erhalten. Fehlerbalken sind die errechneten Standardabweichungen der Hyperbolen fits in Sigmaplot

13. Eingeklammerte Datenpunkte wurden von der Analyse ausgenommen. Wahre Dalzielkoeffizienten sind in Tabelle 13 aufgeführt. Siehe auch Anhang Liedgens *et al.* 2020 [96]

ScGrx7	[GSSCys] (μM)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}(\text{GSH})^{\text{a}}$ (s^{-1})		$K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSH})^{\text{a}}$ (μM)		$k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSH})$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
WT	25	18.4 ± 1.1	100 %	78.5 ± 34	100 %	275	100 %
WP	25	4.18 ± 0.66	23 %	32.6 ± 11	42 %	138	50 %
loop	25	0.14 ± 0.01	0.8 %	89.0 ± 9.7	113 %	1.5	0.6 %
WP+loop	25	0.025 ± 0.006	0.1 %	23.2 ± 4.8	30 %	1.1	0.4 %
WT	50	35.4 ± 1.0	100 %	126 ± 42	100 %	308	100 %
WP	50	8.12 ± 0.66	23 %	50.6 ± 9.4	40 %	163	53 %
loop	50	0.22 ± 0.03	0.6 %	158 ± 8.8	125 %	1.4	0.5 %
WP+loop	50	0.05 ± 0.015	0.1 %	46.9 ± 2.0	37 %	1.1	0.3 %
WT	100	67.4 ± 3.9	100 %	222 ± 9.4	100 %	305	100 %
WP	100	15.7 ± 1.4	23 %	81.4 ± 17	37 %	197	65 %
loop	100	0.42 ± 0.11	0.6 %	247 ± 59	111 %	1.7	0.6 %
WP+loop	100	0.098 ± 0.021	0.1 %	81.2 ± 25	37 %	1.2	0.4 %
WT	150	79.9 ± 27	100 %	286 ± 45	100 %	273	100 %
WP	150	26.0 ± 2.0	33 %	124 ± 25	43 %	214	78 %
loop	150	0.65 ± 0.14	0.8 %	350 ± 25	122 %	1.8	0.7 %
WP+loop	150	0.12 ± 0.02	0.2 %	87.0 ± 21	30 %	1.5	0.5 %

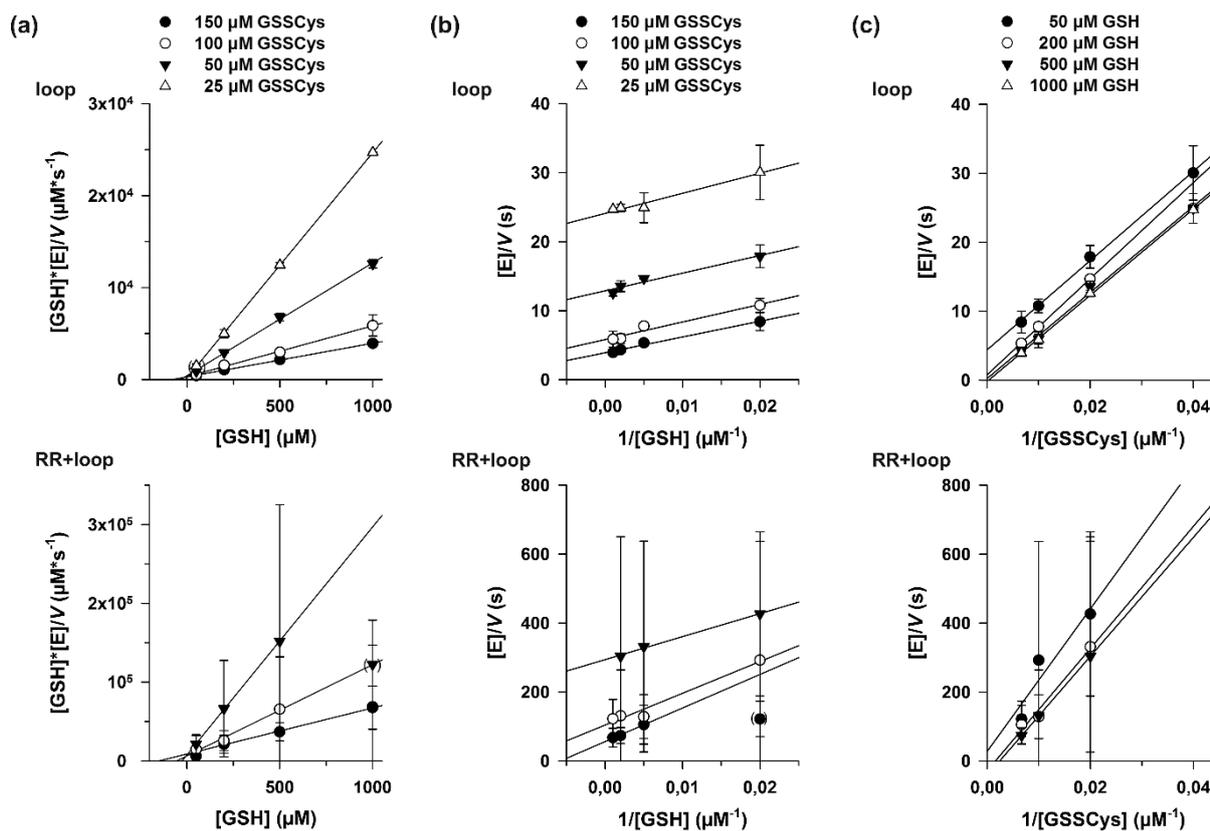
ScGrx7	[GSH] (μM)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}(\text{GSSCys})^{\text{a}}$ (s^{-1})		$K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSSCys})^{\text{a}}$ (μM)		$k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSSCys})$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
WT	50	22.0 ± 1.3	100 %	49.6 ± 15	100 %	475	100 %
WP	50	13.2 ± 1.1	60 %	100 ± 6.1	202 %	132	28 %
loop	50	0.11 ± 0.01	0.5 %	30.7 ± 6.0	62 %	3.8	0.8 %
WP+loop	50	0.066 ± 0.02	0.3 %	69.4 ± 13	140 %	1.0	0.2 %
WT	200	56.0 ± 7.9	100 %	84.0 ± 28	100 %	696	100 %
WP	200	41.2 ± 5.6	74 %	281 ± 43	335 %	147	21 %
loop	200	0.31 ± 0.06	0.6 %	76.4 ± 3.8	91 %	4.0	0.6 %
WP+loop	200	0.13 ± 0.04	0.2 %	150 ± 40	179 %	0.9	0.1 %
WT	500	139 ± 20	100 %	193 ± 37	100 %	727	100 %
WP	500	128 ± 36	92 %	750 ± 190	389 %	170	23 %
loop	500	0.61 ± 0.11	0.4 %	120 ± 34	62 %	5.3	0.7 %
WP+loop	500	0.25 ± 0.02	0.2 %	242 ± 36	125 %	1.0	0.1 %
WT	1000	239 ± 54	100 %	320 ± 91	100 %	757	100 %
WP	1000	175 ± 51	73 %	1036 ± 377	324 %	173	23 %
loop	1000	0.94 ± 0.38	0.4 %	170 ± 5.8	53 %	5.5	0.7 %
WP+loop	1000	0.69 ± 0.12	0.3 %	631 ± 38	197 %	1.1	0.1 %

Anhang 4 Ausgewählte $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ und $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ Werte von GSSCys-Tests mit ScGrx7^{WT}, ScGrx7^{WP}, ScGrx7^{loop} und ScGrx7^{WP+loop}.

Die hier gezeigten Daten wurden aus den Graphen Anhang 2 erhalten.

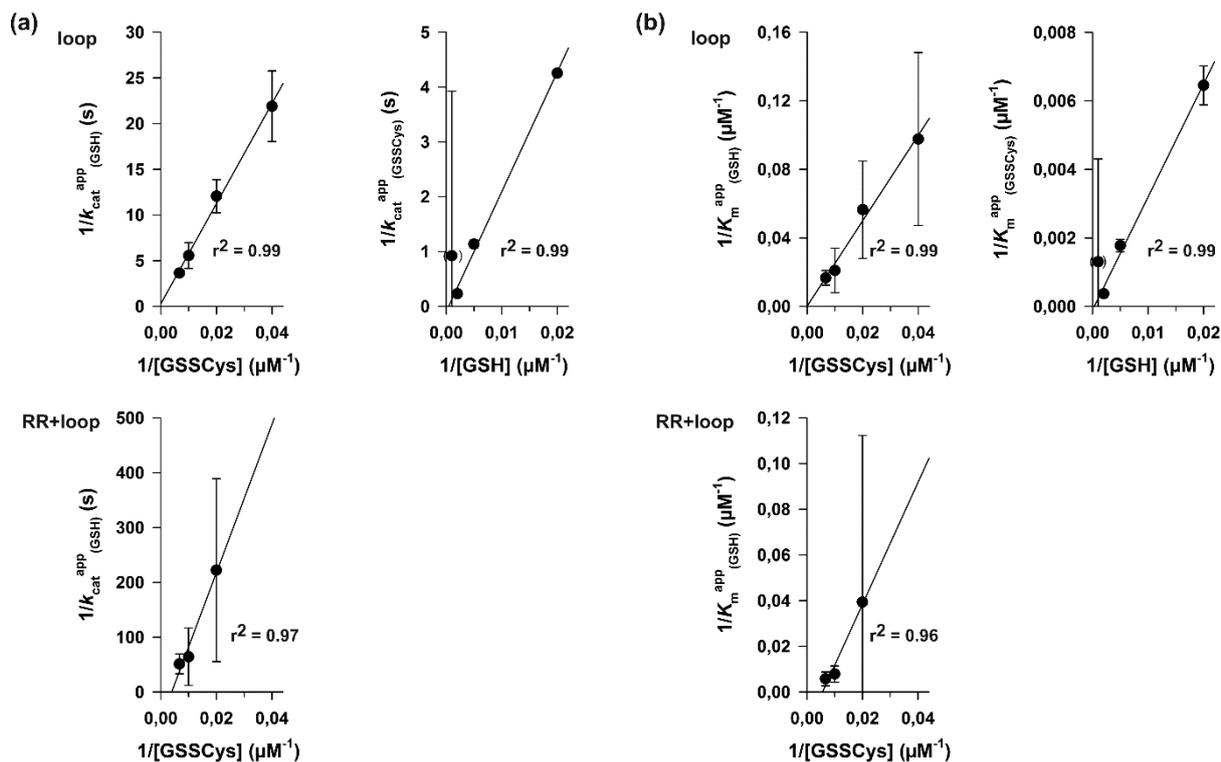
^a Mittelwert und Standardabweichung wurden aus drei biologisch unabhängigen Triplikaten errechnet.

Prozentangaben sind relativ zum Wildtypenzym.



Anhang 5 GSSCys-Test *steady-state* Kinetiken von HsGrx5^{loop} und HsGrx5^{RR+loop}.

(a) Hanes-Diagramme der GSH-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen GSSCys-Konzentrationen. (b) Lineweaver-Burk-Diagramme der GSH-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen GSSCys-Konzentrationen zeigen ein Ping-Pong-Muster. (c) Lineweaver-Burk-Diagramme der GSSCys-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen GSH-Konzentrationen. Datenpunkte und Fehlerbalken sind die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten, die in SigmaPlot 13 entsprechend der Hanes, Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee-Theorie aufgetragen wurden (Teilweise nicht gezeigt). Errechnete k_{cat}^{app} und K_m^{app} -Werte von den drei verschiedenen Plots wiesen gewöhnlich nicht mehr als 10 % Abweichung voneinander auf. Eingeklammerte Datenpunkte wurden von der Analyse ausgenommen. Wahre Kinetikkonstanten wurden von Sekundärdiagrammen in Anhang 6 errechnet und sind in Anhang 7 aufgelistet. Tabelle 13 zeigt ausgewählte k_{app} -Werte von Regressionsgeraden der Hanes-Plots. Die Aktivität von HsGrx5^{WT} und HsGrx5^{RR} sind ähnlich der der Negativkontrolle und konnten nicht analysiert werden. Siehe auch Anhang Liedgens *et al.* 2020 [96]



Anhang 6 Sekundärdiagramme des GSSCys-Tests für HsGrx5^{loop} und HsGrx5^{RR+loop}.

(a) Sekundärdiagramme zeigen k_{cat}^{app} -Werte bei verschiedenen GSSCys- (links) und GSH-Konzentrationen (rechts). Dies erlaubt das Errechnen von wahren k^{cat} -Werten vom y-Achsenabschnitt ($1/k_{cat}$) und von wahren K_m -Werten vom x-Achsenabschnitt ($-1/K_m$). Wahre Kinetikkonstanten müssen allerdings aufgrund ihrer Nähe zum Ursprung mit Bedacht interpretiert werden. Dalzielkoeffizienten wurden aus der Steigung der Regressionsgeraden errechnet. (b) Sekundärdiagramme zeigen K_m^{app} -Werte bei verschiedenen GSSCys- (linke Spalten) und GSH-Konzentrationen (rechte Spalten). K_m^{app} und k_{cat}^{app} -Werte wurden von Regressionsgeraden der Hanesdiagramme (Anhang 5) erhalten. Fehlerbalken sind die errechneten Standardabweichungen der Hyperbolen fits in Sigmaplot 13. Eingeklammerte Datenpunkte wurden von der Analyse ausgenommen. Wahre Dalzielkoeffizienten sind in Tabelle 13 aufgeführt. Siehe auch Anhang Liedgens *et al.* 2020 [96]

HsGrx5 ^b	[GSSCys] (μM)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}(\text{GSH})^{\text{a}}$ (s^{-1})		$K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSH})^{\text{a}}$ (μM)		$k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSH})$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
WT	25	/	0 %	/	0 %	<0.1	<2 %
RR	25	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	25	0.046 \pm 0.008	100 %	10.2 \pm 5.3	100 %	5.7	100 %
RR+loop	25	/	0 %	/	0 %	<0.1	<2 %
WT	50	0.004 \pm 0.002	<5 %	/	0 %	<0.2	<4 %
RR	50	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	50	0.083 \pm 0.012	100 %	17.7 \pm 8.9	100 %	5.4	100 %
RR+loop	50	0.004 \pm 0.003	5 %	25.4 \pm 47	144 %	0.1	1 %
WT	100	0.003 \pm 0.002	<2 %	/	0 %	<0.2	<5 %
RR	100	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	100	0.18 \pm 0.05	100 %	47.6 \pm 30	100 %	3.9	100 %
RR+loop	100	0.016 \pm 0.013	9 %	127 \pm 87	267 %	0.1	3 %
WT	150	0.003 \pm 0.002	<1 %	/	0 %	<0.2	<4 %
RR	150	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	150	0.27 \pm 0.02	100 %	59.9 \pm 15	100 %	4.8	100 %
RR+loop	150	0.019 \pm 0.007	7 %	174 \pm 91	290 %	0.1	3 %

HsGrx5 ^b	[GSH] (μM)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}(\text{GSSCys})^{\text{a}}$ (s^{-1})		$K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSSCys})^{\text{a}}$ (μM)		$k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{\text{m}}^{\text{app}}(\text{GSSCys})$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
WT	50	/	0 %	/	0 %	<0.1	<6 %
RR	50	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	50	0.24 \pm 0.00	100 %	156 \pm 19	100 %	1.5	100 %
RR+loop	50	/	0 %	/	0 %	<0.2	<12 %
WT	200	/	0 %	/	0 %	<0.1	<6 %
RR	200	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	200	0.88 \pm 0.06	100 %	563 \pm 58	100 %	1.6	100 %
RR+loop	200	/	0 %	/	0 %	<0.2	<12 %
WT	500	/	0 %	/	0 %	<0.2	<12 %
RR	500	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	500	4.33 \pm 0.21	100 %	2703 \pm 119	100 %	1.6	100 %
RR+loop	500	/	0 %	/	0 %	<0.2	<12 %
WT	1000	/	0 %	/	0 %	<0.1	<6 %
RR	1000	/	0 %	/	0 %	/	0 %
loop	1000	1.08 \pm 6.3	100 %	765 \pm 3811	100 %	1.7	100 %
RR+loop	1000	/	0 %	/	0 %	<0.2	<12 %

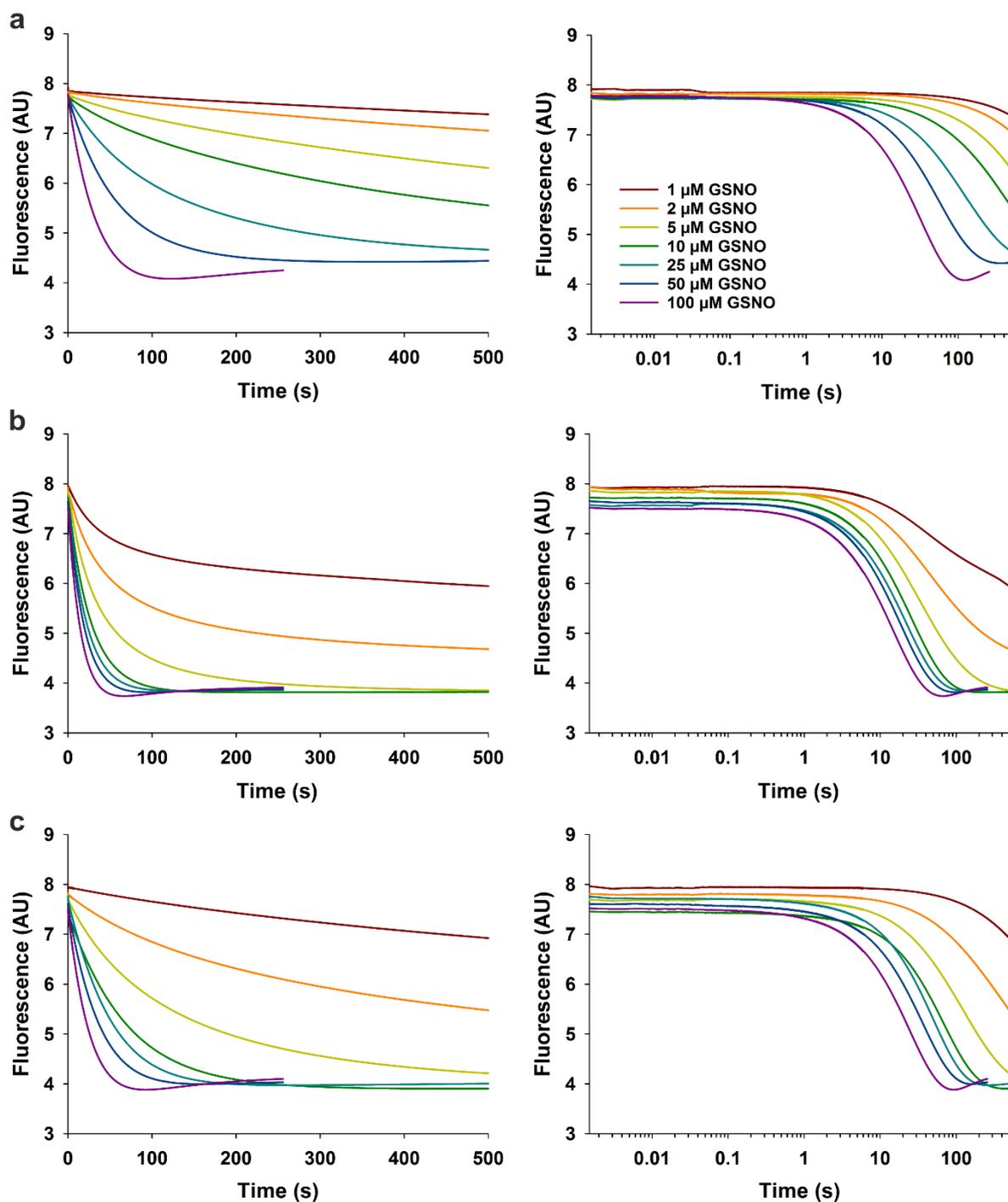
Anhang 7 Ausgewählte $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ und $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ Werte von GSSCys-Tests mit HsGrx5^{WT}, HsGrx5^{RR}, HsGrx5^{loop} und HsGrx5^{RR+loop}.

Die hier gezeigten Daten wurden aus den Graphen Anhang 5 erhalten.

^a Mittelwert und Standardabweichung wurden aus drei biologisch unabhängigen Triplikaten errechnet.

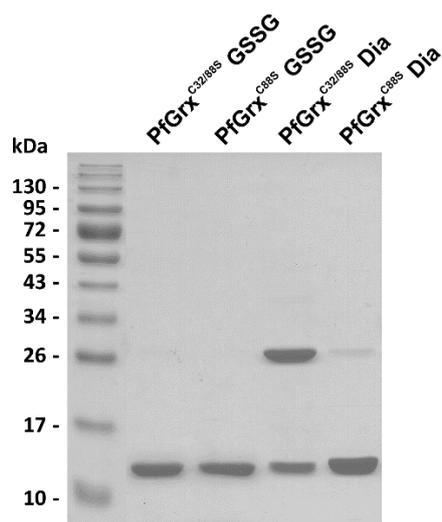
Prozentangaben sind relativ zum Wildtypenzym.

^b Abgesehen von HsGrx5 war die Aktivität der HsGrx5-Konstrukte ähnlich der der Negativkontrolle ohne Grx (Tendenz: HsGrx5^{RR+loop} > HsGrx5 > HsGrx5^{RR}).



Anhang 8 Primärdiagramme der Reaktion von roGFP2 mit GSNO und PfGrx.

a Reaktion von 1 μM roGFP2 mit 1-100 μM GSNO. **b** Reaktion von 1 μM roGFP2 und 1 μM PfGrx^{C88S} mit 1-100 μM GSNO. **c** Reaktion von 1 μM roGFP2 und 1 μM PfGrx^{C32/88S} mit 1-100 μM GSNO. Graphen wurden jeweils linear (links) und halblogarithmisch (rechts) aufgetragen. Alle Spuren wurden jeweils mit einer Exponentialfunktion gefittet und ein k_{obs} -Wert bestimmt. Diese k_{obs} -Werte wurden hiernach in Sekundärdiagrammen gegen ihre GSNO-Konzentration aufgetragen (Abbildung 13).



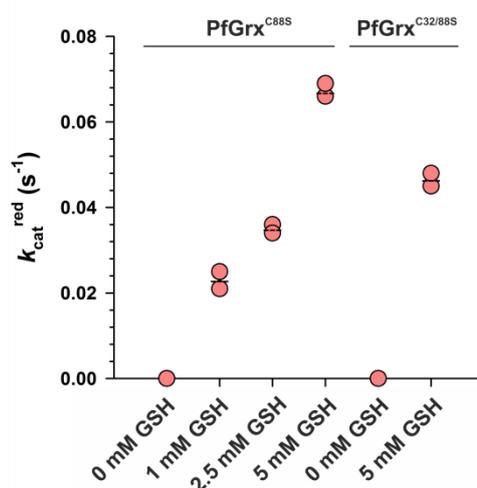
Anhang 9 Vorbehandlung von PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} mit Diamid oder GSSG.

Die erwartete Größe von PfGrx beträgt ca. 13 kDa. Die Behandlung von Monothiol-Grx mit Diamid führt zur Ausbildung eines Homodimers.

roGFP2 ^{WT} +	GSH (mM)	k_{red}^{cat} (s ⁻¹)		GSH (mM)	k_{red}^{cat} (s ⁻¹)
PfGrx ^{C88S}	0	0	PfGrx ^{C32/88S}	0	0
	1	0,023 ± 0,003		1	/
	2,5	0,035 ± 0,002		2,5	/
	5	0,067 ± 0,002		5	0,046 ± 0,002

Anhang 10 Angenähertes Sättigungsverhalten der Reduktion von roGFP2^{WT} durch PfGrx und GSH.

Die hier erhaltenen Werte wurden aus den hyperbolischen Fits aus Abbildung 25 und 26 erhalten und sind in Anhang 11 graphisch dargestellt.



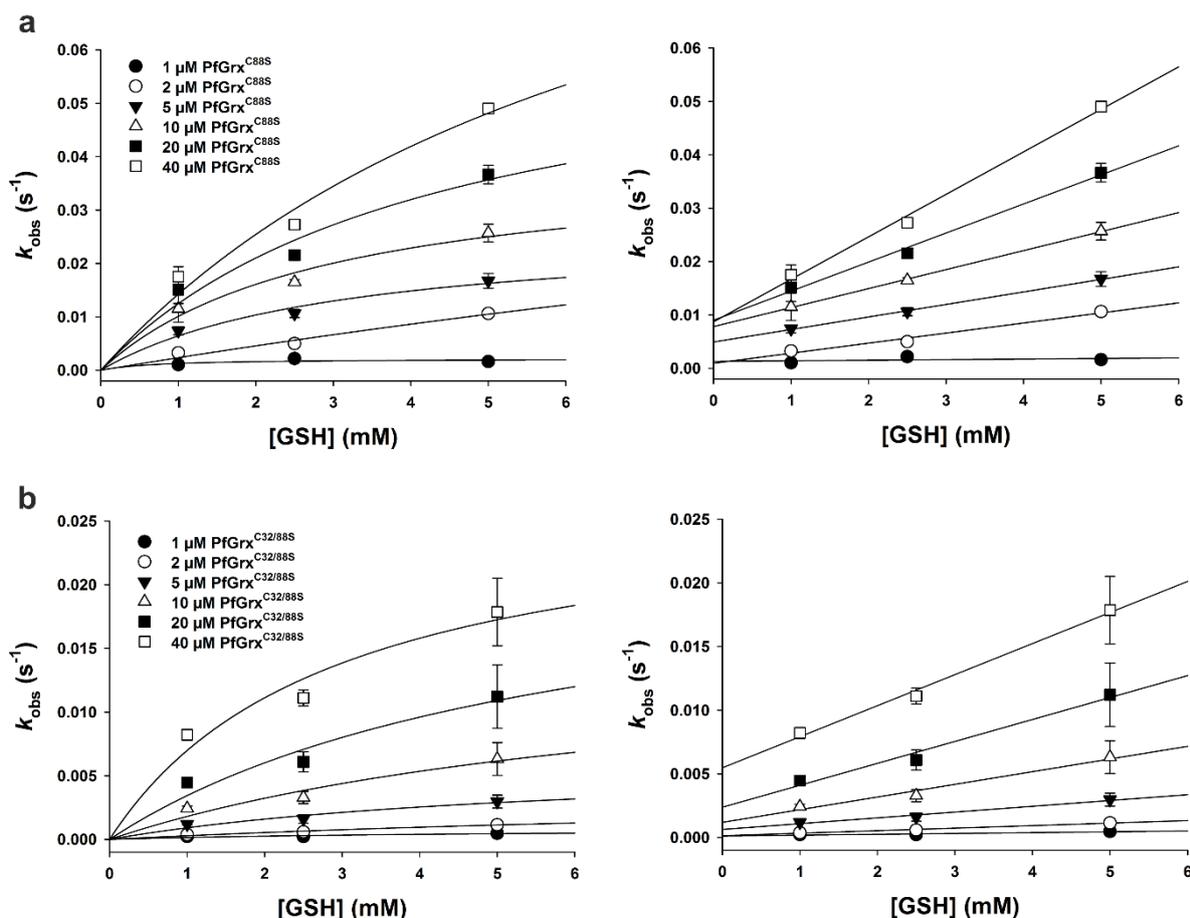
Anhang 11 Maximale Reaktionsgeschwindigkeit k_{cat} der Reduktion von roGFP2^{WT} durch PfGrx^{C88S} und PfGrx^{C32/88S} bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.

Die hier aufgetragenen Werte stellen die Sättigung der hyperbolischen Fits aus Abbildung 25 und 26 dar und sind in Anhang 10 zusammengefasst.

	$k_{\text{red}}^{\text{tert}} \text{ (M}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$
PfGrx ^{C88S}	$(7,3 \pm 0,7) \times 10^5$
PfGrx ^{C32/88S}	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^5$

Anhang 12 Reaktionskonstanten der Reaktion dritter Ordnung zwischen roGFP2, PfGrx und GSH.

Die aus Abbildung 25 und 26 erhaltenen k_{red} -Werte für verschiedene GSH Konzentrationen wurden gegen ihre GSH-Konzentration aufgetragen und linear gefittet (Abb. 27). Die so erhaltenen $k_{\text{red}}^{\text{tert}}$ beschreiben näherungsweise die Reaktionen dritter Ordnung zwischen oxidiertem roGFP2, reduziertem PfGrx und GSH.



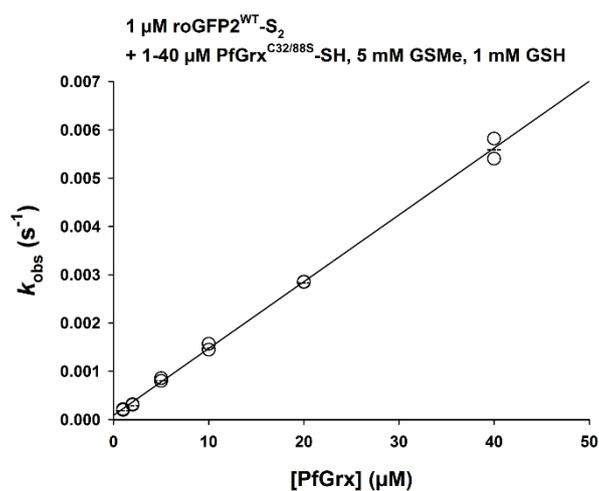
Anhang 13 Sekundärdiagramme der Reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2 mit reduziertem PfGrx und GSH, in Abhängigkeit von GSH aufgetragen.

Zu sehen sind die Sekundärdiagramme der Reaktion von roGFP2 mit (a) PfGrx^{C88S} und (b) PfGrx^{C32/88S}. Es wurde sowohl versucht die Punkte hyperbolisch (links), als auch linear (rechts) zu fitten. Aufgrund der wenigen Datenpunkte kann jedoch keine zuverlässige Aussage getroffen werden. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung von $n = 2$ Replikaten und somit nicht repräsentativ. Die Steigung $k_{\text{red}}^{\text{GSH}}$ und der y-Achsenabschnitt k_{red}^0 aus den Fitgeraden auf der rechten Seite wurden bestimmt und in Anhang 14 zusammengefasst.

roGFP2 ^{WT} + PfGrx (μM)	$k_{\text{red}}^{\text{GSH}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{red}^0 (s^{-1})
PfGrx ^{C88S}	1	$1,1 \times 10^{-4}$
	2	$1,9 \times 10^{-3}$
	5	$2,3 \times 10^{-3}$
	10	$3,6 \times 10^{-3}$
	20	$5,4 \times 10^{-3}$
	40	$8,0 \times 10^{-3}$
PfGrx ^{C32/88S}	1	$6, \times 10^{-5}$
	2	$2,0 \times 10^{-4}$
	5	$4,6 \times 10^{-4}$
	10	$1,0 \times 10^{-3}$
	20	$1,7 \times 10^{-3}$
	40	$2,4 \times 10^{-3}$

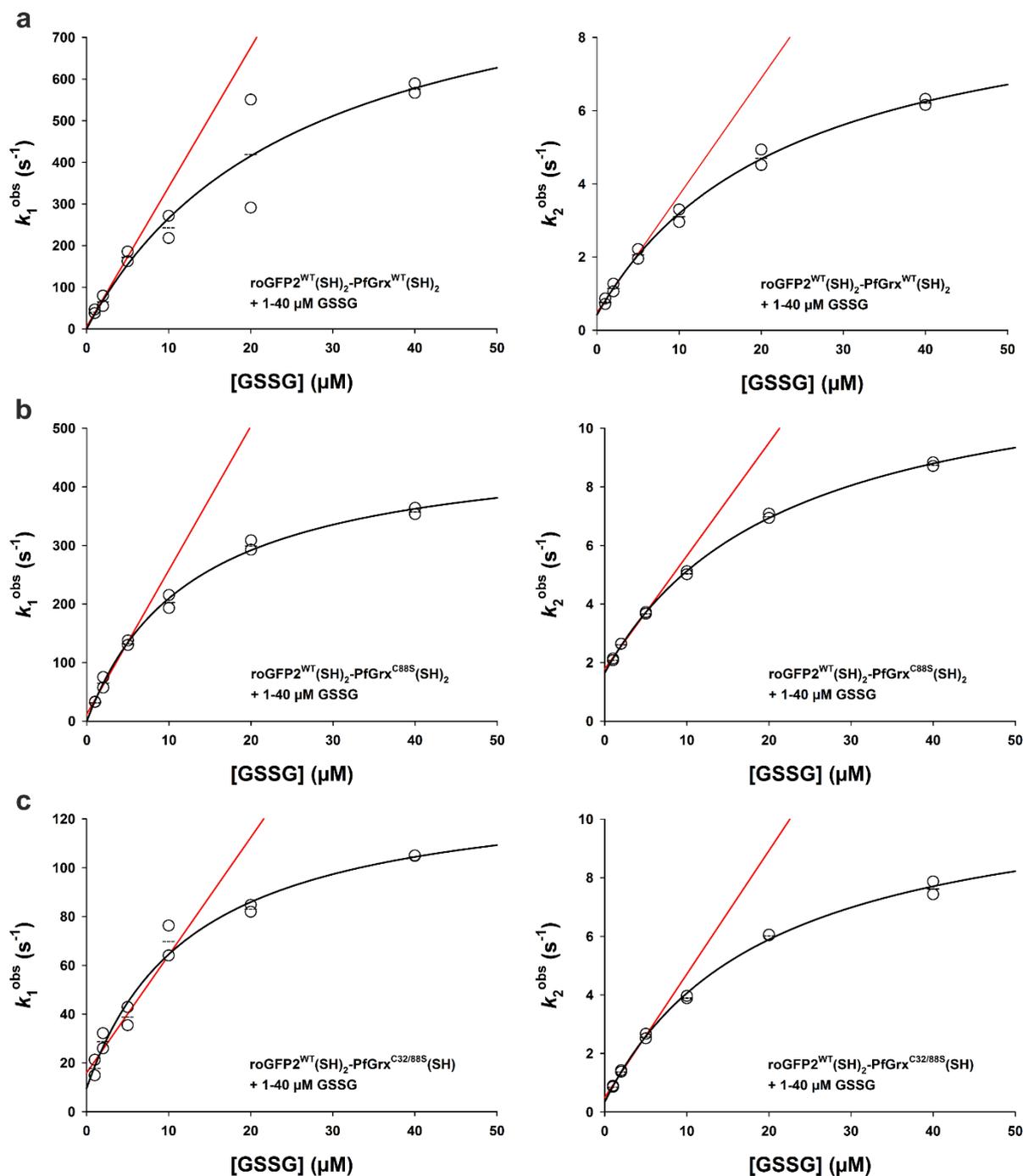
Anhang 14 Reaktionskonstanten der reduktiven Halbreaktion von oxidiertem roGFP2 mit reduziertem PfGrx und GSH, in Abhängigkeit von GSH.

Die Steigung $k_{\text{red}}^{\text{GSH}}$ und der y-Achsenabschnitt k_{red}^0 wurden aus den Fitgeraden in Anhang 13 (rechts) bestimmt.



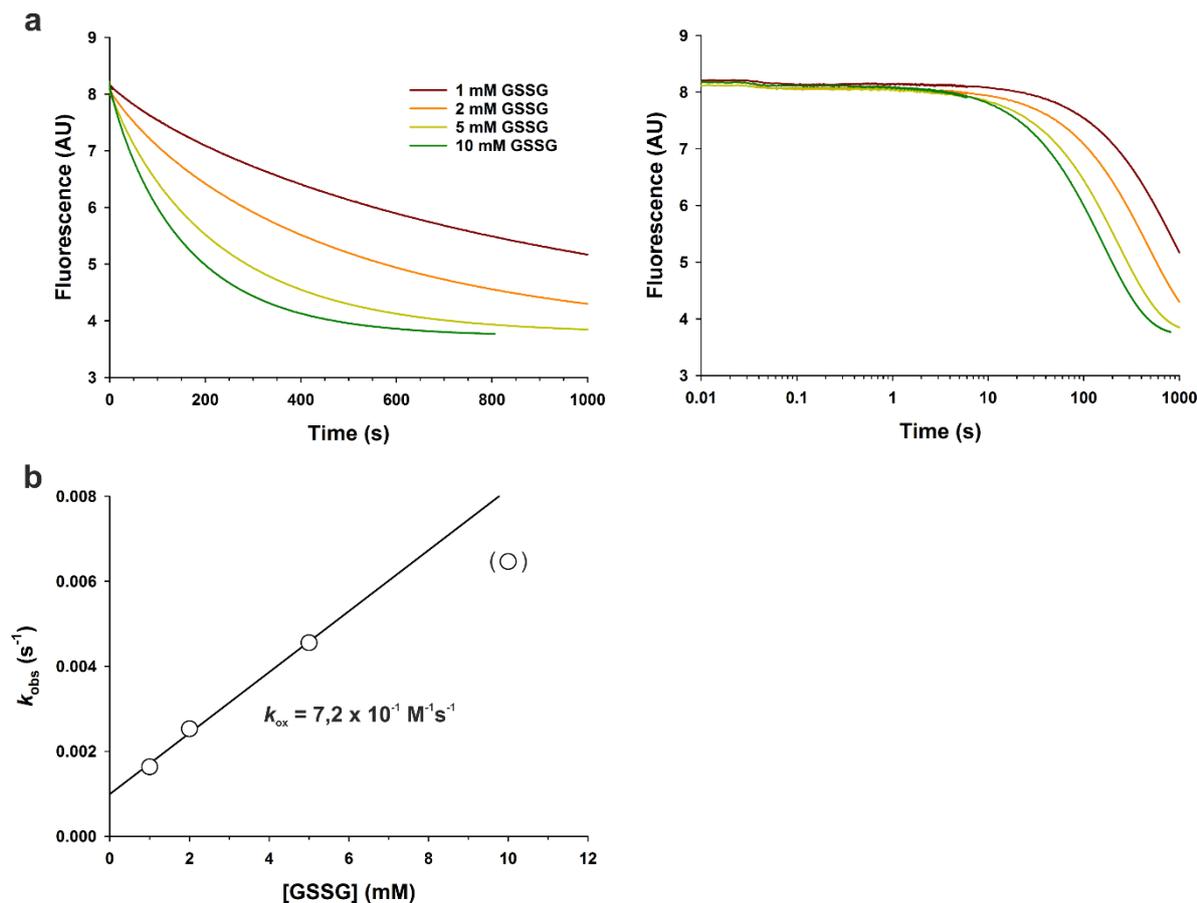
Anhang 15 Wettbewerbstest bei der reduktiven Halbreaktion von roGFP2 durch PfGrx^{C32/88S} durch GSMe.

Der Reaktion von 1 μM oxidiertem roGFP2WT mit 1-40 μM PfGrx^{C32/88S} wurden 1 mM GSH, 5 mM GSMe, 125 μM NADPH und 0,2 U/ml GR beigeetzt.



Anhang 16 Sekundärdiagramme der Reaktion von roGFP2-PfGrx-Fusionskonstrukten mit GSSG.

Die aus den Primärdiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werten für links die schnelle ansteigende erste Phase und rechts die langsamer abfallende zweite Phase (vergleiche Abbildung 34) wurden in Sekundärdiagrammen gegen die GSSG-Konzentration aufgetragen. Es reagierten stets roGFP2^{WT}-PfGrx^{WT} (a), roGFP2^{WT}-PfGrx^{C88S} (b) oder roGFP2^{WT}-PfGrx^{C32/88S} (c) mit 1-40 μM GSSG. Die roten Linien zeigen Regressionsgerade durch die ersten drei Punkte des Graphen und wurden als k_{ox} für die Reaktion zweiter Ordnung von PfGrx mit GSSG interpretiert. In schwarz wurde ebenfalls eine hyperbole Funktion durch alle Punkte gefittet, deren Grenzwert k_{cat} als maximale Übertragungsgeschwindigkeit der Gluthathionylierung von PfGrx auf roGFP2 interpretiert wurde in einer Reaktion erster Ordnung.



Anhang 17 Reaktion von reduziertem roGFP2^{WT} mit GSSG.

a Primärdiagramme der Reaktion von reduziertem roGFP2^{WT} mit 1-10 mM GSSG in linearer (links) und halblogarithmischer (rechts) Auftragung. Die Primärgraphen wurden exponentiell gefittet und ein k_{obs} -Wert für jede GSSG-Konzentration bestimmt. Die Reaktion von roGFP2^{WT} mit 25 mM GSSG resultierte in einer sofortigen Präzipitation der Proteinlösung und konnte somit nicht aufgenommen werden. **b** Die aus den Primärdiagrammen erhaltenen k_{obs} -Werte wurden gegen ihre GSSG-Konzentration in ein Sekundärdiagramm aufgetragen. Die Steigung eines linearen Fits durch die ersten drei Punkte ergab den k_{ox} -Wert ($= 7,2 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) dieser Reaktion zweiter Ordnung. Das Sättigungsverhalten und die Präzipitation bei 25 mM GSSG sind vermutlich durch den steigenden pH-Wert der Lösung bei sehr großen GSSG-Konzentrationen zu erklären.

Curriculum Vitae

Fabian Geissel

Beruflicher Werdegang

02/2019 – 09/2022

● **Doktorand im Fachbereich Chemie**

TU Kaiserslautern | 67663 Kaiserslautern

- » *Kultivierung verschiedener Zelllinien (z. B. E. coli, S. cerevisiae, P. falciparum)*
- » *Untersuchung kinetischer und mechanistischer Eigenschaften von Redoxproteinen*
- » *Angestrebter Abschluss: Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)*

Ausbildung

10/2013 – 10/2018

● **Studium: Biophysik**

TU Kaiserslautern | 67663 Kaiserslautern

- » *Abschluss: Diplom Biophysik*

07/2004 – 04/2013

● **Abitur**

Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium | 67433 Neustadt

- » *Abschluss: Abitur*