

KRITISCHE ANALYSE DER EIGNUNG VON DIMEDON ZUR
SULFENSÄUREDETEKTION UND DER RELEVANZ VON
WASSERSTOFFPEROXID FÜR DIE WIRKUNG VON
ANTIMALARIAMITTELN
Doktorarbeit

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 29. Mai 2024

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 24. Juli 2024

Erstgutachter: Prof. Dr. Marcel Deponte

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bruce Morgan

eingereicht von: Eileen Anna Agnes Bischoff

Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität
Kaiserslautern-Landau zur Verleihung des akademischen Grades
“**Doktor der Naturwissenschaften**“ (**Dr. rer. nat.**) genehmigte Dissertation.

Kennung der Universitätsbibliothek Kaiserslautern: DE-386

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass der Inhalt der vorliegenden Dissertation eigenständig erarbeitet und verfasst wurde. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel wurden eindeutig und vollständig angegeben.

Ort, Datum

Unterschrift

Promotionskommission

Vorsitz:	Prof. Dr. Dr. Gereon Niedner-Schatteburg
Erstgutachter:	Prof. Dr. Marcel Deponte
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Bruce Morgan
Prüfer:	Prof. Dr. Sabine Becker

für Mama, Papa und Nadine

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	x
Zusammenfassung	xv
1 Einleitung	1
1.1 Kritische Analyse der Theorie des oxidativen Stresses	1
1.1.1 Sauerstoff als physiologischer- und pathophysiologischer Elektro- nenakzeptor	1
1.1.2 Die ursprüngliche und modifizierte Theorie des oxidativen Stresses nach Sies	3
1.2 Relevanz und Nachweis physiologischer Sulfensäuren und cyclischer Sulfe- nylamide	6
1.2.1 Eigenschaften und Relevanz von Sulfensäuren und cyclischen Sulfe- nylamiden	6
1.2.2 Detektion von Sulfensäuren und cyclischen Sulfenylamiden	7
1.3 Die Hypothese des oxidativen Stresses in der Malariaforschung	9
1.3.1 Malaria - Eine lebensbedrohliche Infektionskrankheit	9
1.3.2 Leberstadien - Wie eine Infektion zustande kommt	11
1.3.3 Asexuelle Blutstadien von <i>P. falciparum</i>	11
1.3.4 Die Infektion der <i>Anopheles</i> Mücke	14
1.3.5 Oxidative Stress Hypothese in <i>P. falciparum</i>	15
1.3.6 Physiologische Quellen von Superoxidanionen und Wasserstoffper- oxid in <i>P. falciparum</i> und antioxidative Systeme des Parasiten	18

1.3.7	<i>Rhodotorula gracilis</i> D-Aminosäure Oxidase: Wirkweise und Expression von <i>RGDAAO</i> als Transgen im pHBIRH-Vektor	20
1.4	Ziel der Arbeit	24
2	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Geräte	28
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.1.3	Plasmide und Oligonukleotide (DNA)	33
2.1.4	Bakterien- und <i>Plasmodium falciparum</i> Stämme	35
2.1.5	Reagenzien	39
2.1.6	Software	46
2.2	Methoden	47
2.2.1	Synthesevorschriften	47
2.2.2	Analytische Messmethoden	51
2.2.3	Kinetischen Analysen	55
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	61
2.2.5	Biochemische Methoden	70
2.2.6	<i>Plasmodium falciparum</i> Zellkultur und Charakterisierung	73
3	Ergebnisse	86
3.1	Kompetitive kinetische Analyse der Detektionsreaktion von Sulfensäuren und Sulfenylamiden	86
3.1.1	Stabilität und Löslichkeit von cyclischem <i>N</i> -Boc-Sulfenylamid	86
3.1.2	NMR-Analysen zur pH-abhängigen Ringöffnung von SA	87
3.1.3	Konzentrations- und pH-Abhängigkeit der Ringöffnung von SA in PBS-Puffer	89
3.1.4	Kinetische Analyse der Ringöffnungsreaktion mittels UV/Vis Spektroskopie	92

3.1.5	Kinetische Analyse der Reaktion von SA und Dimedon mittels ESI-MS/MS	93
3.1.6	Kinetische Stopped-flow Analyse der Reaktion von SA mit GSH und Dimedon als potenzielle Konkurrenz-Nukleophile	99
3.1.7	GSH Kompetitions-Assay mittels Reversed-Phase HPLC-Analyse	102
3.2	Untersuchung der oxidativen Stress-Hypothese in asexuellen Blutstadien von <i>P. falciparum</i>	106
3.2.1	Klonierung der pHBIRH Plasmide mit neuer IMS-Zielsequenz	106
3.2.2	Westernblot-Analyse zum Nachweis der Bildung des Redoxenzym <i>RgDAAO</i>	107
3.2.3	Quantitative Analyse der Blasticidin-abhängigen Bildung von <i>RgDAAO</i> für die transgenen Stämme mit Cyto <i>RgDAAO</i> ^{WT} oder MitoM <i>RgDAAO</i> ^{WT}	109
3.2.4	Lokalisation des Redoxenzym <i>RgDAAO</i> mittels Immunofluoreszenzmikroskopie	112
3.2.5	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte der transgenen Stämme mit <i>RgDAAO</i> ^{WT} oder <i>RgDAAO</i> ^{R285A} für Paraquat	119
4	Diskussion	132
4.1	Dimedon-Projekt	132
4.1.1	Reaktivität und Selektivität von Dimedon gegenüber Sulfensäuren unter Berücksichtigung potenzieller Konkurrenz-Elektrophile und Nukleophile	134
4.1.2	Reaktivität von Dimedon gegenüber SA und weiteren Konkurrenz-Nukleophilen	135
4.1.3	Kritische Beurteilung der physiologischen Relevanz der Dimedon Detektion	136
4.1.4	Fazit und Ausblick zum Dimedon-Projekt	138

4.2	<i>STRESS</i> istance-Projekt	140
4.2.1	Nachweis der Bildung rekombinanter <i>RgDAAO</i> in <i>P. falciparum</i> mittels Westernblotanalyse	140
4.2.2	Lokalisation des Redoxenzym <i>RgDAAO</i> mittels Immunofluores- zenzmikroskopie	142
4.2.3	Einfluss der kompartimentspezifischen Erhöhung der Wasserstoff- peroxidkonzentration auf die Sensitivität von <i>P. falciparum</i> gegen- über Paraquat als Positivkontrolle	143
4.2.4	Fazit und Ausblick zum <i>STRESS</i> istance-Projekt	153
	Anhang	155
	Wissenschaftlicher Werdegang	172
	Literaturverzeichnis	xix

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte	28
2.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.3	Zielsequenzen	33
2.4	Plasmide	34
2.5	Oligonukleotide	35
2.6	Bakterien Stämme	35
2.7	Wildtyp Stamm	36
2.8	Transgene Stämme	36
2.9	Chemikalien	39
2.10	Verwendete Selektionsantibiotika	44
2.11	Verwendete Antikörper	44
2.12	Verwendete Standardmarker	45
2.13	Verwendete Enzyme	45
2.14	Verwendete Kits	45
2.15	Verwendete Software	46
2.16	Zusammensetzung 1x PBS-Puffer (PBS 1)	53
2.17	Pipettierschema der pH-abhängigen Stabilitätsanalyse	53
2.18	Pipettierschema der massenspektrometrischen Untersuchung der Reaktion von SA und Dim in wasserfreiem ACN.	57
2.19	Zusammensetzung von 1x PBS-Puffer ohne K ⁺ -Ionen (PBS2)	59
2.20	Zusammensetzung des Reaktionsgemischs für einen Restriktionsverdau	62
2.21	Zusammensetzung des Reaktionsgemischs für einen analytischen Restrikti- onsverdau	62
2.22	Zusammensetzung des Reaktionsgemischs zur Ligation von DNA-Fragmenten	63
2.23	Pipettierschema für Sequenzierungen	66
3.1	Gemittelte pH-abhängige k_{obs} -Werte	92

Tabellenverzeichnis

3.2	pH- und pOH-Werte und zugehörige OH ⁻ -Konzentrationen	92
4.1	Vergleich ausgewählter Geschwindigkeitskonstanten	133

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformeln und Geschwindigkeitskonstanten ausgewählter C-nukleophiler Sulfensäure-Detektionsproben	8
1.2	Cyclisches Alkin BCN zur Detektion von Sulfensäuren	9
1.3	Lebenszyklus des Malaria Parasiten <i>Plasmodium falciparum</i>	14
1.4	Katalysezyklus von Peroxiredoxinen	19
1.5	Reaktionsmechanismus der <i>Rhodotorula gracilis</i> D-Aminosäure Oxidase	20
1.6	Aktives Zentrum der <i>RgDAAO</i>	21
1.7	Aufbau und Funktion des pHBIRH-Vektors	23
1.8	Mögliche Konkurrenzreaktionen der Detektionsreaktion zwischen Dimedon und Sulfensäureresten	25
2.1	Synthesemechanismus von <i>N</i> -Boc-Sulfenylamid	50
2.2	Prinzipieller Aufbau der Stopped-flow Apparatur	61
2.3	Klonierungsstrategie	67
2.4	Aufbau der pHBIRH-Konstrukte	68
2.5	Pipettierschema 96-Well Platten für IC ₅₀ -Messungen	79
3.1	pH-abhängige Ringöffnung von SA	88
3.2	Kinetische Analyse der pH-abhängigen Ringöffnungsreaktion von SA	91
3.3	Sekundärplot	93
3.4	Möglicher Reaktionsmechanismus der Umwandlung von SA zum Disulfid in wässriger Umgebung	96
3.5	Kinetische Analyse der direkten Reaktion zwischen SA und Dimedon	98
3.6	Kinetische Stopped-flow Analyse der Reaktion zwischen GSH und SA	101
3.7	Umkehrphasen-HPLC-Analysen	103
3.8	Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto, MitoM und IMS <i>RgDAAO</i> ^{WT} bzw. <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	108

3.9	Quantitative Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto <i>RgDAAO</i> ^{WT} und MitoM <i>RgDAAO</i> ^{WT} in Abhängigkeit von Blasticidin	111
3.10	Lokalisation der funktionalen oder inaktiven <i>RgDAAO</i> in den Stämmen 3D7 Cyto <i>RgDAAO</i> ^{WT} und 3D7 Cyto <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	113
3.11	Lokalisation der funktionalen <i>RgDAAO</i> im Stamm 3D7 DV <i>RgDAAO</i> ^{WT} .	115
3.12	Lokalisation der funktionalen oder inaktiven <i>RgDAAO</i> in den Stämmen 3D7 MitoM <i>RgDAAO</i> ^{WT} und 3D7 MitoM <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	116
3.13	Lokalisation der funktionalen oder inaktiven <i>RgDAAO</i> in den Stämmen 3D7 IMS <i>RgDAAO</i> ^{WT} und 3D7 IMS <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	117
3.14	Redoxzyklus von Paraquat	120
3.15	IC ₅₀ -Werte der Stämme 3D7 <i>RgDAAO</i> ^{WT} und 3D7 <i>RgDAAO</i> ^{R285A} verschiedener Kompartimente mit Paraquat und D-Alanin	121
3.16	IC ₅₀ -Werte der Stämme 3D7 <i>RgDAAO</i> ^{WT} und 3D7 <i>RgDAAO</i> ^{R285A} verschiedener Kompartimente mit Paraquat und D-Methionin	122
3.17	IC ₅₀ -Werte der Stämme 3D7 <i>RgDAAO</i> ^{WT} und 3D7 <i>RgDAAO</i> ^{R285A} verschiedener Kompartimente mit Paraquat und D-Valin	123
4.1	Zusammenfassung der kinetischen Analyse potenzieller Konkurrenzreaktionen zur Detektionsreaktion zwischen Dimedon und Sulfensäureresten . . .	132
4.2	Präadaptationshypothese von <i>P. falciparum</i> Parasiten transgener Stämme mit <i>RgDAAO</i> ^{WT}	151
S1	¹ H-NMR-Spektren von 60 mM SA in CD ₃ CN	155
S2	¹ H- ¹³ C-HSQC-NMR-Spektren von 60 mM SA in CD ₃ CN	156
S3	¹ H-NMR-Spektren von SA und Dim	157
S4	Analyse isosbestischer Punkte der pH-abhängigen Ringöffnung von SA . .	158
S5	Massenspektrometrische Analyse der wasserabhängigen Reaktion zwischen SA und Dimedon	159
S6	Fragmentationsanalyse der monomeren- und dimeren Thioether-Addukts .	160

S7	Kinetische massenspektrometrische Analyse der Reaktion zwischen der korrespondierenden Sulfensäure von SA und Dimedon in wässriger Umgebung	161
S8	Ergänzende Daten zu HPLC-Analysen	162
S9	Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto, MitoM und IMS <i>RgDAAO</i> ^{WT} bzw. <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	170
S10	Quantitative Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto <i>RgDAAO</i> ^{WT} und MitoM <i>RgDAAO</i> ^{WT} in Abhängigkeit der Blasticidinkonzentration	171

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
ν	Frequenz
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ANOVA	Analysis of variance, dt. Varianzanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATR	Attenuated total reflexion, dt. Abgeschwächte Totalreflexion
Bla	Blasticidin
bp	base pair, dt. Basenpaar
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>bsd</i>	Blastidin- <i>S</i> -Deaminase
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CD ₃ CN	deutertes Acetonitril
d	Duplett
dd	Duplett vom Duplett
ddH ₂ O	double-distilled water, dt. doppelt destilliertes Wasser
DC	Dünnschichtchromatographie

DCM	Dichlormethan
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid dt. Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
DTT	Dithiothreitol
DV	Digestive Vacuole, dt. Verdauungsvakuole
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
<i>e. g.</i>	<i>Exempli gratia</i>
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
em	Emmissionswellemlänge
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EMBOSS	European Molecular Biology Open Software Suite
eq	equivalent, dt. Äquivalent
ESI	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	und andere
EtOAc	Ethylacetat
Et ₂ O	Diethylether
ETC	Electron-Transport-Chain, dt. Elektronentransportkette
ex	Anregungswellenlänge
FP-IX	Ferriprotoporphyrin-IX
FT-IR	Fourier-Transformation-Infrarot Spektroskopie
g	Gramm

GFP	Green fluorescent protein, dt. Grün fluoreszierendes Protein
GlcN	Glucosamin
GlcN-6P	Glucosamin-6-phosphat
<i>glmS</i>	Glucosamin-6-phosphat Synthase
GOI	Gene of interest, dt. gewünschtes Gen
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HSP70	Heat-shock protein 60, dt. Hitzeschock-Protein 60
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Hz	Hertz
IF	Immunofluoreszenz
IR	Infrared, dt. Infrarot
IR-ATR	Infrared attenuated total reflection spectroscopy, dt. ATR-Infrarotspektroskopie
iRBC	infected red blood cell, dt. infiziertes rotes Blutkörperchen
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilo base, dt. Kilobasenpaar
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
LB	Lysogeny broth, dt. Lysogenie-Brühe
m	Multipllett
M	Molarität (Einheit: mol/l)
mM	Millimolar

Abkürzungsverzeichnis

m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Einheit Stoffmenge
mRNA	messenger-RNA
ms	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance, dt. Kernspinresonanz
ng	Nanogramm
ns	not significant, dt. nicht signifikant
nt	Nukleotid
O/N	over night, dt. über Nacht
<i>P. falciparum, Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PBS	Phosphate-buffered saline, dt. Phosphatpuffer
PTP 1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolen-Membran
Rf	Retarding front, dt. Retardierfront
<i>R. gracilis, Rg</i>	<i>Rhodotorula gracilis</i>
ROS	Reactive Oxygen Spezies, dt. Reaktive Sauerstoffspezies
s	singulett
SA	N-Boc-Sulfenylamid
SD	Standard deviation, dt. Standardabweichung

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Sodium dodecyl sulfate, dt. Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese
t	Triplett
<i>T. gondii, Tg</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA Puffer
TBS	Tris-buffered saline, dt. Tris-Puffer
TBS-TT	TrisPuffer mit Tween-20 und Triton
UV/VIS	UltraViolett VISible
V	Volt
v	Volumen
ValOMet	Valinmethylester
w	Gewicht
WB	Westernblot
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Dimedon-Projekt

Zur nukleophilen Detektion von Sulfensäuren werden üblicherweise Dimedon oder Dimedon Derivate eingesetzt. Allerdings haben qualitative Untersuchungen gezeigt, dass Dimedon ebenso mit cyclischen Sulfenylamiden reagiert. Unter physiologischen Bedingungen muss Dimedon zudem mit millimolaren Glutathionkonzentrationen konkurrieren, welches ebenfalls ein starkes Nukleophil ist. Um diese kompetitiven Reaktionen quantitativ zu analysieren, wurden die Reaktionskinetiken eines cyclischen Sulfenamid-Modellpeptids (SA) und der Sulfensäure von Glutathion mit Dimedon und Glutathion bestimmt. Da das cyclische Sulfenamid bei niedrigen pH-Werten stabil ist und keine Ringöffnung zur Sulfensäure stattfindet, konnte eine direkte Reaktion mit Dimedon eindeutig nachgewiesen werden. Die kinetischen Analysen ergaben vergleichbare Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen von Dimedon mit SA bzw. Dimedon und der aus SA gebildeten Sulfensäure. Die Geschwindigkeiten der Reaktionen des Konkurrenz-Nukleophils Glutathion mit SA oder der Sulfensäure übertreffen die Reaktionsgeschwindigkeiten mit Dimedon jedoch um mehrere Größenordnungen. Auch *in vitro* und intrazelluläre Analysen mit einem Modellperoxiredoxin stellen die Selektivität von Dimedon in Frage. Der bisher scheinbar erfolgreiche Einsatz von Dimedon als Detektionsprobe für Sulfensäuren *in vivo* muss daher auf alternative Reaktionswege oder auf die Detektion kinetisch konkurrierender Redoxspezies zurückzuführen sein. (übernommen aus [1])

STRESSistance-Projekt

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der oxidativen Stress-Hypothese im Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum*. Die Gesamtheit aus Hämoglobinabbau, Wachstum und DNA-Synthese verursachen eine metabolisch generierte oxidative Belastung. Durch effiziente Reduktionsmittel wie z. B. Thioredoxine oder Glutathion kann der Parasit das Redox-Gleichgewicht aufrechterhalten, er hat eine physiologische *STRESSistance*. Es wird außerdem vermutet, dass Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid eine bedeutende Rolle im Wirkmechanismus von Antimalariamitteln spielen. In dieser Arbeit sollten kompartimentspezifische Anpassungseffekte oder cytotoxische Effekte, verursacht durch Wasserstoffperoxid untersucht werden. Hierfür wurden transgene Parasiten verwendet, die das heterologe Redoxenzym *RgDAAO* im Cytosol, der Verdauungsvakuole oder der mitochondrialen Matrix bzw. dem mitochondrialen Intermembranraum enthalten. Durch exogene Zugabe von D-Aminosäuren wurden die Wasserstoffperoxidkonzentrationen kompartimentspezifisch erhöht. Zudem konnte die Expression des *RGDAAO*-Gens durch die Konzentration der Selektionsdroge Blasticidin reguliert werden. Zu jedem Konstrukt wurde als Negativkontrolle ein identisches Plasmid mit der Punktmutation R285A und somit inaktiver *RgDAAO* kloniert und transfiziert. Im ersten Schritt konnte die erfolgreiche Bildung der *RgDAAO* für die verschiedenen Stämme mit 3xHA-getaggten Konstrukten mittels Westernblotanalyse gezeigt werden. Auch die Titrierbarkeit des Systems durch Blasticidin konnte in einem Westernblot nachgewiesen werden, für den die Parasiten mit unterschiedlichen Blasticidin-Konzentrationen zwischen 4 und 50 µg/ml behandelt wurden. Ab 50 µg/ml Blasticidin kommt es zu cytotoxischen Effekten, da die zugehörige Kultur retardiert wächst. Die Lokalisation des heterologen Redoxenzyms *RgDAAO* in den vorgesehenen Kompartimenten wurde mittels Immunofluoreszenzmikroskopie (IFA) überprüft. Die korrekte Lokalisation wurde für die Kompartimente Cytosol und die mitochondriale Matrix beobachtet, wohingegen trotz erhöhtem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin, keine *RgDAAO* in der Verdauungsvakuole und dem mitochondrialen Intermembranraum nachgewiesen werden konnte. Schließlich wurden erste IC₅₀-Messungen mit

Paraquat als Positivkontrolle und verschiedenen D-Aminosäuren zur kompartimentspezifischen Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentrationen durch das Redoxenzym *RgDAAO* durchgeführt. Es konnten kompartimentspezifische Anpassungseffekte und potenzielle zytotoxische Effekte beobachtet werden.

Um die Studie zu vervollständigen und die Wirkmechanismen von Antimalariamitteln weiter zu untersuchen müssen nun mit Hilfe des etablierten Systems weitere IC_{50} -Messungen durchgeführt werden.

1 Einleitung

1.1 Kritische Analyse der Theorie des oxidativen Stresses

1.1.1 Sauerstoff als physiologischer- und pathophysiologischer Elektronenakzeptor

Molekularer Sauerstoff ist ein kleines, unpolares Molekül, welches sehr schnell durch biologische Membranen diffundiert [2], [3]. Molekularer Sauerstoff hat zwei ungepaarte Elektronen, wodurch er gezwungen ist Elektronen einzeln, nacheinander aufzunehmen. Das Reduktionspotenzial ist beim O_2 noch leicht negativ (-0,16 V) und die Elektronenaffinität niedrig. Daher kann es Elektronen nur von starken Reduktionsmitteln wie Metallzentren, Flavinen oder Quinonen aufnehmen. Molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor wird in einer Reduktionsreihe initial zu einem Superoxidanion reduziert, dieses wird in Folgereaktionen zu Wasserstoffperoxid, dem Hydroxylradikal und Wasser reduziert [3]. Die zur Reduktion von molekularem Sauerstoff in der Zelle benötigten Elektronen kommen meist aus der mitochondrialen Atmungskette [4], [5]. Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid werden auch von Xanthinoxidasen in den Peroxisomen gebildet [6]. Die membrangebundene NADPH Oxidase 2 (NOX2) bildet ebenfalls Superoxidanionen [7]. Als weitere endogene Quellen für die Bildung oxidierender Spezies werden Lipoxygenasen und das Cytochrom P-450-System genannt [5], [8]. Die genaue oxidative Spezies oder ein Reaktionsmechanismus wurden nicht genannt. Anstatt die entstehenden Spezies, wie Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid oder das Hydroxylradikal spezifisch zu benennen, werden sie als sogenannte reaktive Sauerstoffspezies, kurz "ROS" zusammengefasst. Dieser Sammelbegriff ist sehr unpassend und irreführend, da er verschiedene Oxidationsmittel mit unterschiedlichsten chemischen Eigenschaften [9], [10] in einem Wort vereinigt und somit jegliche Aussagekraft verliert. Ein weiteres in der Literatur inflationär verwendetes und zugleich nichtssagendes

Wort ist "oxidativer Stress". Wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben wird geht es beim Konzept des oxidativen Stresses um ein anhaltendes Redox-Ungleichgewicht, das es zu einer Akkumulation oxidierten Moleküle führt [11], [12]. Welche spezifischen Oxidationsmittel dabei genau beteiligt sind, welcher Reaktionsmechanismus zugrunde liegt oder welche oxidierten bzw. geschädigten Moleküle akkumulieren wird dabei meist nicht beantwortet. Die Begriffe ROS und oxidativer Stress werden häufig als Platzhalter für fehlendes oder unausgereiftes Wissen verwendet, was die Aussagekraft und die Zuverlässigkeit der zugrundeliegenden Daten erheblich schmälert, da keine exakten Aussagen getroffen werden müssen. Daher ist die Datenlage auf dem Gebiet der Redoxforschung zwar vielfältig aber zugleich sehr hypothetisch und undurchsichtig. Daher ist es wichtig die in der Literatur präsentierten Ergebnisse und Aussagen kritisch zu hinterfragen. Außerdem herrscht eine starre Einteilung in prooxidative und antioxidative Spezies, dabei ist auch diese Terminologie mehr irreführend als hilfreich. Vielmehr hat ein vermeintlich prooxidatives Molekül nicht ausschließlich pathophysiologische Eigenschaften und ein antioxidatives Molekül nicht nur physiologische Funktionen. So ist GSH basierend auf dieser Terminologie zunächst ein antioxidatives, reduzierendes Molekül, welches in erster Linie, mit enzymatischer Hilfe, schädliche Elektrophile beseitigt [13]. Überträgt es jedoch in Anwesenheit von Cu^{2+} Elektronen auf molekularen Sauerstoff führt es zur Bildung von Superoxidanionen, Hydroxylradikalen oder Wasserstoffperoxid [14]. Wasserstoffperoxid ist ein relativ stabiles ungeladenes Molekül, das biologische Membranen passieren kann. Es ist zwar ein starkes Oxidationsmittel, reagiert mit Biomolekülen jedoch sehr langsam, weshalb es häufig in Zellen akkumulieren kann [15]. Wasserstoffperoxid ist physiologisch als sekundärer Botenstoff aktiv, da er enzymatisch ort- und zeitspezifisch gebildet und abgebaut wird und auch selektiv mit Thiolen reagieren kann [9], [10]. Im Falle einer gestörten Redox-Metall-Homöostase, kann es zur heterolytischen Spaltung von Wasserstoffperoxid durch freie Metallionen kommen, was zur Bildung von Hydroxylradikalen führt. Diese Reaktion ist unter dem Namen Fenton-Reaktion bekannt [16], [17]. Hydroxylradikale sind im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid hochreaktive Spezies mit einer Existenzzeit von etwa

10^{-8} - 10^{-9} s [8], die unspezifisch mit allen umliegenden Molekülen, wie DNA, Proteinen und Membranen reagieren [9], [10], [18]. Ein konkretes Beispiel ist das Addukt zwischen einem Hydroxylradikal und der DNA-Base Guanin, zum 8-OH-Guanin-Addukt [18]. Bezüglich der Schädigung von bestimmten Proteinen und Membranen durch Hydroxylradikale wurden keine Aussagen getroffen. Aus molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor entstehen Superoxidanionen oder Hydroperoxide, die neben Halogensauerstoffsäuren oder Peroxynitrit für oxidative Modifikationen von Protein-Cysteinylthiolen verantwortlich sind [19], [20], [10], [21]. Oxidative Modifikationen, die während eines Substratumsatzes oder enzymkatalysiert stattfinden sind oft hochgradig ortsspezifisch mit einer wichtigen Funktion im Katalysezyklus oder der Signalübertragung [22], [23], [24], [25]. Die initiale oxidative Modifikation ist meistens eine Sulfensäure, die abhängig vom Protein und der Mikroumgebung ebenfalls Funktionen in der Signaltransduktion haben kann [26]. Sulfensäuren können mit Hydroperoxiden in einer irreversiblen Hyperoxidation zu Sulfin- und Sulfonsäuren reagieren [27]. Die kinetische Analyse der Detektionsreaktion von Sulfensäuren mit Dimedon und potenzieller Konkurrenzreaktionen ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.1.2 Die ursprüngliche und modifizierte Theorie des oxidativen Stresses nach Sies

Freie Radikale wurden erstmals 1950 in Pflanzen, tierischen Organen und Geweben entdeckt [28] und augenscheinlich mit diversen Krankheiten [29] und dem Alterungsprozess [30] in Verbindung gebracht [31]. Um welche Radikale es sich dabei konkret handelt wurde nicht erwähnt. Auch nicht welche Rolle die undefinierten Radikale im Zusammenhang mit welchen Krankheiten oder dem Alterungsprozess tatsächlich spielen. Das Konzept des oxidativen Stresses wurde 1985 erstmals von Helmuth Sies und Enrique Cadenas im Einleitungskapitel des Buches "Oxidative Stress", benannt und beschrieben [11]. Oxidativer Stress war ursprünglich definiert als "Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Prooxidantien und Antioxidantien, welches zur Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Ersteren und damit potenziellen Schäden führt" (engl. "A disturbance in the prooxi-

dant–antioxidant balance in favor of the former, leading to potential damage.“) [11], [31]. Der Beginn unzähliger unkritischer Anwendungen des Konzepts und irreführender Studien mit unpräzise diskutierten Ergebnissen auf dem Gebiet der Redox-Forschung. Aufgrund der bedeutenden Rolle des Redox-Signaling erneuerte Sies 2007 die Definition des oxidativen Stresses zu: “Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien, was zu einer Störung der Redox-Signalübertragung und Kontrolle und/oder molekularen Schäden führt“ (engl. “An imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage.“) [32]. Basierend auf dieser Hypothese kommt es durch das kontinuierliche Ungleichgewicht, zugunsten der Oxidationsmittel, zu einer Akkumulation geschädigter, oxidiertes Moleküle, wie Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren [11], [12]. Eine präzise Definition der beteiligten Oxidationsmittel oder geschädigten Moleküle sowie konkrete Beschreibungen der zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen fehlen in den meisten Studien. Stattdessen wird das fehlende Wissen durch das Benutzen von Begriffen wie ROS oder oxidativer Stress übertüncht. Im Jahr 2017 verfasste Helmut Sies eine weitere Definition von oxidativem Eustress bzw. physiologischem oxidativem Stress, um deren Definitionen von der des oxidativen Distress, basierend auf Hans Selye’s Stress Theorie aus dem Jahre 1974, abzugrenzen [33], [34]. Oxidativer Eustress beschreibt eine milde Art von oxidativem Stress, wohingegen oxidativer Distress eine schwere Form des oxidativen Stresses repräsentiert [31], [32]. Die Definition des Konzepts befindet sich zwar in einem ständigen Wandel, trotzdem bleibt sie aufgrund fehlender Präzision undurchsichtig und bei unkritischer Anwendung irreführend. Sies beschreibt beispielsweise die Rolle von Wasserstoffperoxid im Rahmen der Definitionen von Eustress und Distress [35]. Beim oxidativen Eustress, der auch als physiologischer Stress bezeichnet wird, übernimmt Wasserstoffperoxid eine Redox-Signaling Funktion. Als Beispiele dafür nennt Sies unter anderem die reversible Cystein und Methionin Oxidation [35]. Fraglich bleibt wieso eine Definition von sogenanntem physiologischem bzw. mildem oxidativem Stress überhaupt notwendig ist. Es gibt keinen Unterschied zwischen sogenanntem Eustress und physio-

logischen Bedingungen unter denen Wasserstoffperoxid regulär gebildet wird. Außerdem ist laut Sies das Aufrechterhalten physiologischer Konzentrationen von Wasserstoffperoxid essentiell für die Steuerung von Lebensprozessen [35]. Zudem entsteht weder ein Ungleichgewicht zugunsten oxidierter Spezies, noch kommt es zur Akkumulation von Schäden, damit widerspricht Sies im Grunde genommen seiner eigenen Definition. Entstehen aus Wasserstoffperoxid jedoch Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion) verursachen diese Schäden an DNA, Proteinen oder Lipiden, Sies bezeichnet diesen Vorgang als oxidativen Distress oder exzessiven oxidativem Stress [35]. Auch bei dieser Aussage werden keine präzisen Angaben zu den entstehenden Schäden oder zugrunde liegenden Mechanismen gemacht, stattdessen werden fehlenden Informationen hinter dem Wort "oxidativer Distress" kaschiert. Außerdem sind Hydroxylradikale und Superoxidanionen sehr kurzlebige, instabile Spezies, die sich nicht akkumulieren können, daher sollte in diesem Zusammenhang unbedingt von Steady-State-Konzentrationen gesprochen werden [31]. Immerhin wird am Beispiel von Wasserstoffperoxid deutlich, dass eine strikte Abgrenzung zwischen oxidativen und antioxidativen Spezies falsch und irreführend ist. Ein weiteres Beispiel dafür ist das Tripeptid Glutathion (GSH), welches nicht nur sehr effektiv schädigende Elektrophile reduziert, sondern in Anwesenheit von Eisen- oder Kupferionen auch Elektronen auf molekularem Sauerstoff übertragen kann, wodurch Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid gebildet werden können [36], [37], [14], [38], [13]. Basierend auf Sies ursprünglicher Definition des oxidativen Stresses als andauerndes Redox-Ungleichgewicht [11], [12] das zur Anhäufung von bislang undefinierten oxidierten und geschädigten Molekülen führt wurde die Definition erneut angepasst: "Oxidativer Stress ist eine vorübergehende oder dauerhafte Erhöhung stationärer ROS-Konzentrationen, die zelluläre, insbesondere ROS-basierte Stoffwechsel- und Signalwege stören und zu oxidativen Veränderungen der Makromoleküle eines Organismus führen, die, wenn sie nicht kompensiert werden, zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose führen können" (engl. "Oxidative stress is a transient or long-term increase of steady-state ROS levels, disturbing cellular metabolic and signaling pathways, particularly ROS-based ones, and leading to oxidative modifica-

tions of an organism's macromolecules that, if not counterbalanced, may culminate in cell death via necrosis or apoptosis.“) [31].

1.2 Relevanz und Nachweis physiologischer Sulfensäuren und cyclischer Sulfenylamide

1.2.1 Eigenschaften und Relevanz von Sulfensäuren und cyclischen Sulfenylamiden

Cysteinylthiole von Proteinen werden durch verschiedenen oxidative Spezies modifiziert, darunter Wasserstoffperoxid und Superoxidationen, aber auch Disulfide, Peroxynitrit oder hypohalogene Säuren [19], [20], [10], [21]. Dabei wird unterschieden zwischen nicht-enzymatischen-, katalyseabhängigen- und enzymkatalysierten posttranslationalen Modifikationen von Protein Cysteinthiolen. Während hypochlorige Säure unspezifische Modifikationen verursacht [39], sind katalytisch relevante Thiolmodifikationen in Enzymen sehr spezifisch [22], [23], [24], [25]. Die initiale oxidative Modifikation ist die Cysteinylsulfensäure. Sulfensäuren sind sehr reaktive, instabile Spezies, die kurz nach der Bildung zu stabileren Oxidationsprodukten weiterreagieren. Die Oxidationszahl des Schwefelatoms der funktionellen Gruppe der Sulfensäure liegt bei 0, daher kann sie als Nukleophil oder als Elektrophil weiterreagieren [40]. Die Reduktion von Hydroperoxiden oder Peroxynitrit durch Peroxiredoxine und cysteinabhängige Glutathionperoxidasen führt zur Bildung einer Sulfensäure, die entweder mit einem weiteren Thiol zu einem Disulfid oder mit einem oder mehreren Äquivalenten Hydroperoxid zu Sulfin- oder Sulfonsäuren reagieren kann [41], [10], [27]. In seltenen Fällen können Sulfensäuren durch eine passende Mikroumgebung im aktiven Zentrum geringfügig stabilisiert werden. Die metastabile Cysteinylsulfensäure im aktiven Zentrum der Hefe-Glutathionperoxidase Gpx3 oxidiert Yap1, der die Transkription von gewissen Genen aktiviert [42], [43].

Aus Cysteinylsulfensäuren werden in reversiblen Reaktionen cyclische Sulfenylamide ge-

1.2. RELEVANZ UND NACHWEIS PHYSIOLOGISCHER SULFENSÄUREN UND CYCLISCHER SULFENYLAMIDE

bildet, indem das elektrophile Schwefelatom der Sulfensäuregruppe mit dem nukleophilen Amidstickstoffatom des Peptidrückgrats reagiert [44]. Während die Bildung von Cysteinylsulfensäuren als initiale oxidative Modifikation in Proteinen ein allgemein akzeptiertes Konzept ist, ist die Bildung und vor allem die physiologische Relevanz von cyclischen Sulfenylamiden in Proteinen eher kontrovers [44], [45], [46]. Cyclische Sulfenylamide kommen physiologisch selten vor. Beispiele dafür sind das cyclische Sulfenylamid in der humanen Proteintyrosinphosphatase 1B [47], die Protein-Tyrosin-Phosphatase α [48] und der *Bacillus subtilis* Peroxid Sensor und Transkriptionsfaktor OhrR [49]. Ein weiteres cyclisches Sulfenylamid wurde massenspektrometrisch für die rekombinante Peroxiredoxinmutante AhpC^{C165A} aus *Salmonella typhimurium* nachgewiesen [50], [45]. Bezüglich dessen wurde diskutiert, ob es sich bei dieser Proteinspezies nur um ein Artefakt handelt [50] oder ein passendes Beispiel darstellt, um die Selektivität der Detektionsproben für Sulfensäuren zu untersuchen [44]. (teilweise übernommen aus [1])

1.2.2 Detektion von Sulfensäuren und cyclischen Sulfenylamiden

Aufgrund der hohen Reaktivität und Kurzlebigkeit von Sulfensäuren und cyclischen Sulfenylamiden ist es sehr schwierig, diese zu detektieren. Daher werden selektive Detektionsproben verwendet, die mit den Sulfensäuren und cyclischen Sulfenylamiden zu Addukten reagieren, die anschließend massenspektrometrisch nachgewiesen werden können [44]. Die gängigste Detektionsprobe zum Nachweis von Sulfensäureresten ist das 1,3-Diketon Dimedon (5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion), welches 1974 erstmals zum Nachweis der Sulfensäure im Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet wurde [51]. Dimedon und Dimedonderivate wurden fortan als nukleophile Detektionsproben zum indirekten oder quantitativen Nachweis von Sulfensäuren in Proteinen und biologischen Proben verwendet [52], [53], [54], [55]. Es wurden sogar Vorhersagealgorithmen für das Vorhandensein von Sulfensäuren basierend auf bisherigen Daten verwendet [56], [57], [58], [59], [60]. In der Realität muss Dimedon in biologischen Proben mit zahlreichen anderen physiologischen Nukleophilen konkurrieren, die ebenfalls eine Reaktion mit Sulfensäuren

1.2. RELEVANZ UND NACHWEIS PHYSIOLOGISCHER SULFENSÄUREN UND CYCLISCHER SULFENYLAMIDE

eingehen können. Eines dieser in der Zelle hochkonzentrierten Nucleophile ist das cystein-haltige Tripeptid Glutathion [61], [62], [63], [64]. Auch für humanes Serumalbumin [65], AhpC^{C165A} [54] und ein Modelldipeptid [66] konnte die langsame Reaktion von Dimedon mit Sulfensäuren, mit Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung in der Größenord-nung $\leq 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gezeigt werden. Es wurde ebenfalls qualitativ nachgewiesen, dass auch nicht-peptidische cyclische Modellsulfenamide mit Dimedon reagieren und dabei das glei-che, massenspektrometrisch nicht unterscheidbare Thioetherprodukt bilden wie bei der Reaktion mit einer Sulfensäure [46].

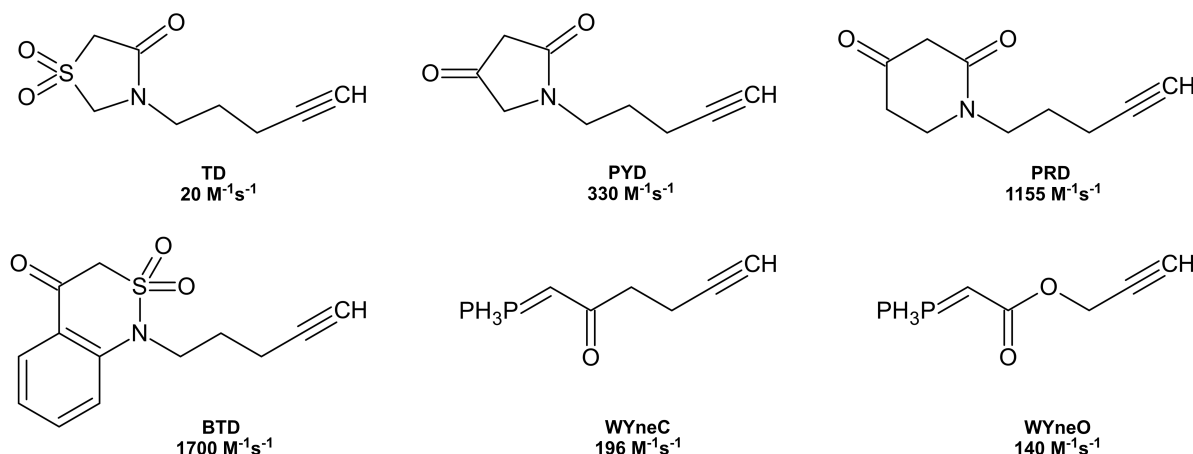


Abbildung 1.1: Strukturformeln und Geschwindigkeitskonstanten ausgewählter C-nucleophiler Sulfensäure-Detektionsproben. TD, PYD, PRD und BTD gehören zu den cyclischen Dimedon-basierten Detektionsproben für Sulfensäuren, WYneC und WYneO zu den Wittig-Reagenzien. Es findet ein nucleophiler Angriff des C-Nucleophils der Detektionsprobe am Schwefelatom der Sulfensäure statt [66], [67], [68].

Zudem ist Dimedon nicht selektiv gegenüber Sulfensäuren und kinetisch nicht fähig mit anderen Nucleophilen zu konkurrieren. Daher ist es unwahrscheinlich, dass mit Dime-don detektierte Reste immer eindeutig Cysteinylsulfensäuren zugeordnet werden können [69]. Es wurden bereits neue Dimedon-basierte C-nucleophile Proben, wie TD, PRD, PYD und BTD entwickelt, mit einer maximalen Geschwindigkeitskonstante von BTD mit $k=1700 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (siehe Abb. 1.1) [66], [67]. Durch die elektronenziehenden Grup-pen am C-Nucleophil in BTD wird die Reaktivität gegenüber der Sulfensäure gesteigert [67]. Ebenfalls entwickelte nucleophile Wittig-Detektionsproben, WY-neO und WY-neC

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

hatten Geschwindigkeitskonstanten zwischen 140 und 196 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ [68]. Daher ist fraglich welche Zielmoleküle mit diesen neu entwickelten Proben detektiert werden. Neben C-nukleophilen Proben zur Sulfensäuredetektion, werden auch gespannte cyclische Alkene und Alkine eingesetzt, die in pericyclischen Transfer-Reaktionen mit Sulfensäuren reagieren wie beispielsweise das gespannte Cycloocten BCN (Abb. 1.2) [22]. (teilweise übernommen aus [1])

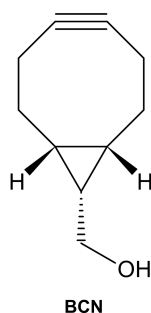


Abbildung 1.2: Cyclisches Alkin BCN zur Detektion von Sulfensäuren. Bei dieser Detektionsprobe kommt die Triebkraft der Reaktion mit Sulfensäuren aus der Ringspannung des cyclischen Alkins. Es findet eine pericyclische Transfer Reaktion zwischen BCN und der Sulfensäure statt [66], [44].

1.3 Die Hypothese des oxidativen Stresses in der Malariaforschung

1.3.1 Malaria - Eine lebensbedrohliche Infektionskrankheit

Malaria ist eine der bedrohlichsten Infektionskrankheiten weltweit und wird verursacht durch Parasiten der Gattung *Plasmodium*. Im Jahr 2022 lag die weltweite Infektionszahl bei 249 Millionen Fällen in 85 endemischen Ländern und Regionen. Die Zahl der Todesfälle durch Malaria lag 2022 bei ca. 608000 und ist leicht gefallen im Vergleich zum 2020 mit ca. 631000 Todesfällen [70]. *Plasmodien* sind einzellige Parasiten der Apicomplexa und nutzen ein breites Spektrum an Säugetieren, Vögeln oder Reptilien als Wirte [71], [72], wobei stets weibliche Mücken der Gattung *Anopheles* als Vektor dienen [73], [74], [75], [76].

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

Der Mensch kann durch fünf Arten von Erregern infiziert werden: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi*, der als einziger potenziell durch Zoonose von Makaken auf Menschen übertragen werden kann [77]. *Plasmodium falciparum* verursacht *Malaria tropica*, die häufigste Form von Malaria, die sich aufgrund des asynchronen Lebenszyklus des Parasiten, durch unregelmäßige Fieberschübe auszeichnet [76]. Die anfänglichen Symptome sind meist unspezifisch und Grippe-ähnlich mit Schüttelfrost und Kopfschmerzen, im späteren Krankheitsverlauf jedoch auch Anämien [73]. Zu den Risikogruppen zählen Kinder unter 5 Jahren, Schwangere, sowie immungeschwächte Personen, beispielsweise durch eine HIV-Infektion [78]. Sie haben ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf. Eine der schwersten Verlaufsformen ist die zerebrale Malaria, die durch die Zytoadhärenz der Parasiten im Gefäßsystems des Gehirns verursacht wird [79]. Es kommt zur Verstopfung der Gefäße und zu einer Entzündungsreaktion, die häufig im Koma oder tödlich endet [79]. Nach langen Jahren der Forschung konnte einige erfolgreiche Therapien zur Bekämpfung und Prävention der Malaria entwickelt werden. Aufgrund schnell auftretender Resistenzen werden Kombinationstherapien, sogenannte Artemisinin based combination therapies (ACTs) angewendet, für die ebenfalls von ersten Resistenzen berichtet wurde [80]. Die derzeit empfohlene ACT ist eine Kombination aus Dihydroartemisinin und Piperaquine (DHAP) [81]. Zur Vektorkontrolle empfiehlt die WHO mit den Insektizid-Kombinationen Pyrethroid-Chlorfenapyr bzw. Pyrethroid-Pyriproxyfen behandelte Bettnetze (Insecticide Treated Mosquito Nets, ITNs) [82] zur Insektentötung oder zur Regulierung des Wachstums und der Fortpflanzung der *Anopheles* Mücke [81]. Eine Pyrethroid-Resistenz ist bereits bekannt. Für Kinder in endemischen Regionen mit hoher Transmissionsgefahr werden die neuen Impfstoffe RTS,S/AS01 (RTS,S) [83] und R21/Matrix-M (R21) [84] empfohlen. Das ständige Aufkommen neuer Resistenzen des Parasiten gegen bereits entwickelte Behandlungsmethoden macht die Prävention und Heilung von Malaria zu einer schwierigen Aufgabe [70]. Es betont die Relevanz des Forschungsgebiets, das sich in einem ständigen Wandel befindet, und die Notwendigkeit immer neuer und aktueller Therapien.

1.3.2 Leberstadien - Wie eine Infektion zustande kommt

Alles beginnt mit dem Biss einer weiblichen, infizierten *Anopheles* Mücke, die während ihrer Blutmahlzeit Sporozoiten über den Speichel in die menschliche Haut injiziert [85]. Dort suchen diese gut beweglichen Parasitenstadien aktiv nach einem Blutgefäß [86], welches sie befallen können, um über den Blutstrom zu ihrem nächsten Ziel zu gelangen - der Leber [87]. In den Kapillargefäßen der Leber (Sinusoiden) heften sich die Sporozoiten an die Endothelzellen und bahnen sich ihren Weg vermutlich über Kupffer-Zellen hinein in das Leberparenchym, wo die eigentliche Infektion eines Hepatozyten startet [88], [89], [90]. Es bildet sich eine parasitophore Vakuole (PV) und eine parasitophore Vakuolen-Membran (PVM), die den Parasiten vom umgebenden Cytoplasma der Wirtszelle abgrenzt [91], [92]. Der Sporozoit differenziert sich anschließend in eine exoerythrozytäre Form (EEF) [93]. Durch massive DNA-Replikation bildet sich ein multinuklearer Schizont der tausende Tochternuklei beherbergt [94]. Erst nachdem die Spaltung der verzweigten Strukturen des Apicoplast und des Mitochondriums durch die Einstülpung der Parasiten-Plasma-Membran abgeschlossen ist, beginnt die Cytokinese und die Tochtermerozoiten entstehen [94]. Der Austritt aus dem Schizonten findet in Form von sogenannten Merosomen, Merozoit-gefüllten Vesikeln, statt, die erst im Blutkreislauf aufplatzen und die Merozoiten schließlich freisetzen [94], [95], [96]. Die beschriebenen Stadien sind in Abbildung 1.3 1-8 dargestellt.

1.3.3 Asexuelle Blutstadien von *P. falciparum*

Die nächste Zielzelle der freigesetzten Merozoiten sind Erythrozyten, in denen der intraerythrozytäre, asexuelle Lebenszyklus beginnt [97]. Die limonenförmigen Merozoiten haben mehrere besondere Merkmale, die bei der Invasion von Bedeutung sind [97]. Sie besitzen eine dichte Ummantelung aus dünnen Filamenten den Merozoite Surface Proteins (MSP), die in der Plasmamembran verankert sind [98], [99], [100], [101]. Somit kann sich der Merozoit leicht, in einer beliebigen Orientierung, an die Membran eines vorbeitreibenden

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

Erythrozyten anheften. Vor der Invasion richtet sich der Merozoit aktiv mit dem apicalen Komplex, einem speziellen Organell der Apicomplexa, nach vorne in Richtung der Erythrozytenmembran aus. Zur Invasion benötigte Proteine werden durch die apicalen sekretorischen Vesikel der Rhoptrien und der Micronemes abgegeben. Dadurch entsteht eine enge Verbindung, eine sogenannte Tight junction, durch die sich der Parasit aktiv in die Wirtszelle hineinzieht. Dabei wird der Filamentmantel des Merozoiten proteolytisch abgespalten und es bildet sich eine parasitophore Vakuole um den Parasiten aus, um sich vom Cytoplasma der Wirtszelle abzugrenzen [102], [101], [97]. Der Parasit entwickelt sich zu einem Ring-Stadium gefolgt vom Stadium des Trophozoiten, womit eine umfangreiche Umstrukturierung der Wirtszelle einhergeht. Es entstehen die sogenannten Maurer's Clefts, sekretorische Membranstrukturen, die dazu dienen parasitäre Proteine ins Cytosol der Wirtszelle und somit zur Oberfläche des Erythrozyten zu transportieren [103], [104]. Im Trophozoiten-Stadium bildet der Parasit außerdem Wölbungen und Ausbuchtungen auf der Erythrozyten-Oberfläche, die sogenannten Knobs [105], [106]. Wichtig ist in diesem Zusammenhang das *P. falciparum* Erythrocyte-Membrane-Protein1 (*PfEMP1*) aus der Familie der *var*-Gene, welches an die Oberfläche der Knobs transportiert wird [107], [108], [106]. Dort interagiert es mit den Rezeptoren im Endothel der Gefäßwand, wodurch die Cytoadhärenz an Gefäßwänden möglich wird und das Aussortieren der deformierten, parasitär befallenen Erythrozyten durch die Milz verhindert wird [109]. Auch die an der Oberflächen präsentierten Antigene werden durch einen ständigen Wechsel der exprimierten *var*-Gene permanent ausgetauscht. Auf diese Weise kann der Parasit das Immunsystem erfolgreich umgehen [110], [111]. Charakteristisch für den Trophozoiten ist zudem ein exzessiver Hämoglobin-Verdau des umgebenden Erythrozyten-Cytosols, in einem spezialisierten Lysosom, der Verdauungsvakuole [97]. Der Abbau von Hämoglobin, zur Gewinnung von Nährstoffen für das weitere Wachstum sowie zur Raumschaffung, führt zur Freisetzung von Häm, das für den Parasiten toxisch ist. Es wird in Form von kristallinem, polymerem Hämozoin in der Verdauungsvakuole detoxifiziert [112],[113], [114]. Der Trophozoit breitet sich immer weiter in der Wirtszelle aus und nimmt immer mehr Platz

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

ein, was auch mit der Elongation des Apicoplasten und des Mitochondriums verbunden ist [115], [97]. Anschließend geht der Parasit ins Schizonten-Stadium über, welches durch massive DNA-Replikation zur Ausbildung von 8-32 Tochnuklei während der Schizogonie geprägt ist [97], [96]. Der Apicoplast und das Mitochondrium wachsen weiter und schlingen sich um die Tochnuklei herum, bis sich schließlich zuerst der Apicoplast und dann das Mitochondrium teilt. Apicoplast und Mitochondrium ordnen sich paarweise den neuen Tochnuklei zu [115], [116]. Der intraerythrozytäre asexuelle Lebenszyklus wird nach 48 h mit der Cytokinese und einem aktiven Austritt der Merozoiten durch die parasitophore Vakuolenmembran sowie die Erythrozytenmembran in die Blutbahn abgeschlossen, wo die Merozoiten neue Erythrozyten infizieren können [117], [96]. Ein kleiner Anteil der Parasiten im Blustadium entwickelt sich zu männlichen und weiblichen Sexualstadien, den Gametocyten. Der Transkriptionsfaktor des *PFAP2-G* initiiert die Bildung von Gametocyten [118]. Es gibt fünf morphologische Stadien von Gametocyten, die sowohl im peripheren Blut, als auch im Knochenmark zu finden sind [119], [120]. Die voll entwickelten männlichen und weiblichen Gametocyten können dann bei einer weiteren Blutmahlzeit von einer weiblichen *Anopheles* Mücke wiederaufgenommen werden. Die beschriebenen Stadien sind in Abbildung 1.3 9-15 dargestellt.

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

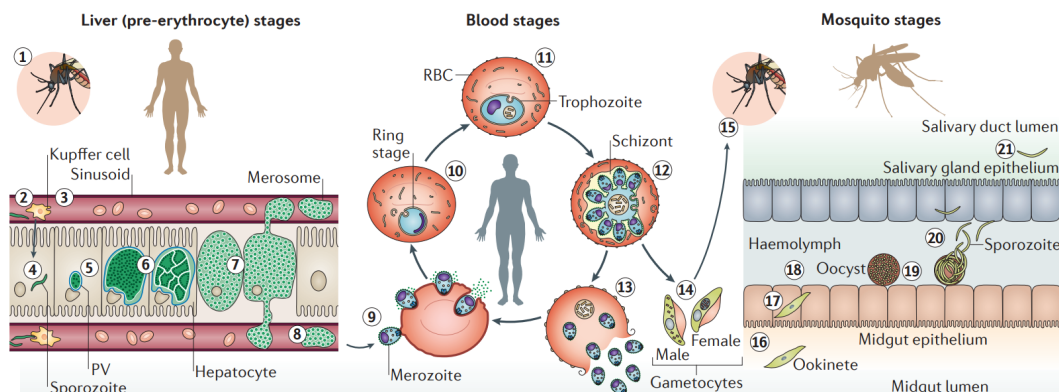


Abbildung 1.3: Lebenszyklus des Malaria Parasiten *Plasmodium falciparum*. Mit dem Stich der *Anopheles* Mücke (1) werden Sporozoiten in die Dermis eingeschleust und bahnen sich ihren Weg zu den Sinusoiden der Leber (2). Dort durchqueren sie Kupfer-Zellen (3) und gelangen durch das Endothelgewebe zu den Hepatozyten, wo die eigentliche Infektion beginnt (4). Im Hepatozyten entwickelt sich der Parasit in seiner PV zum Schizonten (5,6), der nach der Reife (7) lysiert und die Merozoiten in Form von Merosomen in die Sinusoiden freisetzt (8). Im Blutkreislauf angekommen beginnt der intraerythrozytäre asexuelle Lebenszyklus mit der Invasion des Merozoiten in den Erythrozyten (9). Es bildet sich erneut eine PV aus in der der Merozoit sich zunächst zum Ring (10), dann zum Trophozoit (11) und schließlich zum Schizonten (12) entwickelt, der nach seiner Ruptur bis zu 32 neue Merozoiten in die Blutbahn freisetzt (13). Ein kleiner Teil der Parasiten entwickelt sich zu männlichen und weiblichen Gametocyten (14), die während einer erneuten Blutmahlzeit der Mücken aufgenommen werden können (15). Im Mitteldarm der Mücke entwickeln sich die Gametocyten zu männlichen Mikrogameten und weiblichen Makrogameten, die eine Zygote bildet, wodurch eine Ookinete (16) entsteht. Dieses sehr bewegliche Stadium durchquert das Epithelgewebe des Mitteldarms (17) und es bildet sich an der Basallamina der äußeren Darmwand (18) eine Oocyste aus (19). Durch Ruptur der Oocyste werden tausende Sporozoiten in die Hämolymphe abgegeben (20) und bahnen sich ihren Weg zu den Speicheldrüsen, die sie nach dem Durchdringen des Epithels infizieren (21). Abbildung übernommen aus Niz *et al.* [96].

1.3.4 Die Infektion der *Anopheles* Mücke

Im Mitteldarm der Mücke angekommen ändern sich die Umgebungsbedingungen für die Parasitenstadien drastisch. Es kommt zu einem Temperaturabfall von 37 °C auf 20 °C und zu einem Anstieg des pH-Werts [121]. Als weiterer Auslöser der Gametogenese, bei der sich die Gametocyten zu Gameten weiterentwickeln, ist die Xanthurensäure [122]. Weibliche Gametocyten bilden Makrogameten, während sich die männlichen Gametocyten bei der Exflagellierung zu begeißelten Mikrogameten entwickeln [123]. Die gut beweglichen Mikrogameten suchen nach einer weiblichen Makrogamete und bilden mit ihr eine Zygote

[123], die sich zu einer ebenfalls hoch beweglichen, bananenförmigen Ookinete weiterentwickelt. Die Ookinete durchdringt das Epithelium des Mitteldarms und gelangt zur Basallamina der äußeren Darmwand wo sich aus der Ookinete eine Oocyste bildet [124]. Innerhalb der Oocyste vermehrt sich der Parasit und bildet tausende, bereits bewegliche Sporozoiten [125], die nach der Reifung der Oocyste und deren Ruptur in die Hämolymphe der Mücke freigesetzt werden. Sie werden auf passive Weise zu den Speicheldrüsen der Mücke transportiert und befallen diese umgehend [126]. Nun sind die Sporozoiten bereit durch eine weitere Blutmahlzeit erneut in den menschlichen Organismus zu gelangen und den Lebenszyklus zu wiederholen. Die beschriebenen Stadien sind in Abbildung 1.3 16-21 dargestellt.

1.3.5 Oxidative Stress Hypothese in *P. falciparum*

Asexuelle Blutstadien des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* leben in menschlichen Erythrocyten, die einen hohen Sauerstoffgehalt und damit eine prooxidative Umgebung mit sich bringen. Angeblich entstehen Superoxidanionen im Parasiten durch die Elektronentransportkette (ETC) in den Mitochondrien und durch den Hämoglobinverdau in der Verdauungsvakuole [127]. Es wird angenommen, dass Superoxidanionen anschließend durch die mitochondriale und cytosolische Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden und teilweise Hydroxylradikale durch die Fenton-Reaktion bilden, die zu oxidativen DNA-Schäden oder Lipid Peroxidation führen kann [128]. Um welche Art von DNA- oder Lipid-Schäden es sich genau handelt, wie diese genau zustande kommen und welche Schäden letztendlich akkumulieren erwähnt die Publikation nicht. Anhand dieses Beispiels zeigt sich, dass die Problematik des oxidativen Stress Konzepts auch in der Malariaforschung Einzug hält. Es wurde zwar benannt, dass es angeblich zu DNA-Schäden sowie Lipid Peroxidation durch Hydroxylradikale kommen kann, experimentell gezeigt wurde es jedoch nicht. Auf Basis des zuvor kritisch beschriebenen Konzepts der oxidativen Stress Hypothese nach Helmuth Sies [11], [12] wurden auch auf dem Gebiet der Redoxbiologie in der Malariaforschung zahlreiche wissenschaftlich unpräzise und un-

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

durchsichtige Studien veröffentlichen. Eines der Hauptprobleme im Zusammenhang mit der oxidativen Stress Hypothese ist wie bereits zuvor erwähnt die unspezifische Terminologie, da Begriffe wie oxidativer Stress oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) immer dann zum Einsatz kommen, wenn ein Mangel an präzisiertem Wissen herrscht. Die Datenlage ist daher meist hypothetisch und undurchsichtig anstatt durch experimentelle Ergebnisse nachgewiesen. Meist werden weder die beteiligten Spezies genannt, noch ein Einblick in den zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus gegeben. Die Studien geben keinen Aufschluss über akkumulierte oxidierte Moleküle oder die Schäden, die entstanden sind. Durch den Begriff ROS werden verschiedene Oxidationsmittel mit unterschiedlichsten Eigenschaften in einem Sammelbegriff zusammengefasst. Bei Wasserstoffperoxid handelt es sich um ein ungeladenes Teilchen, das durch Membranen und in Zellen diffundieren kann. Allerdings ist die Diffusion in Erythrozyten begrenzt, da sie vollgepackt sind mit Enzymen wie Katalase, Peroxiredoxinen und Glutathionperoxidasen, die die Wasserstoffperoxidkonzentration konstant im picomolaren Bereich halten [129]. Daraus resultiert ein äußerst hoher IC_{50} -Wert von 78 mM bei exogener Zugabe von Wasserstoffperoxid zu Kulturen von *P. falciparum* Blutstadien [130]. Im Gegensatz dazu kann das Elektrophil *tert*-Butylhydroperoxid mit seinen lipophilen Eigenschaften nicht von Katalase unschädlich gemacht werden, was zu einem erheblich niedrigeren IC_{50} -Wert von 81 μ M führt [130]. Auch der IC_{50} -Wert des Elektrophils Diamid befindet sich unter gleichen experimentellen Bedingungen im Bereich von 90 μ M reagiert jedoch verglichen zu *tert*-Butylhydroperoxiden nicht selektiv mit Thiolen was zu einer unspezifischen Bildung von Disulfidbindungen führt [131]. Diese Beispiele verdeutlichen, wie ausschlaggebend die chemischen Eigenschaften der einzelnen Elektronenakzeptoren und der zugehörigen Zielmoleküle sind. Daher ist es nicht hilfreich, alle Oxidationsmittel unter dem Namen ROS zusammenzufassen und deren individuelle Eigenschaften zu ignorieren. Ein weiterer irreführender Konsens auf dem Gebiet der Redoxbiologie ist eine starre Gruppierung in prooxidative und antioxidative Spezies, dabei können auch vermeintlich antioxidative Moleküle prooxidative Wirkungen entfalten. Dithiothreitol (DTT) als sogenanntes Antioxidans und Elektronendonator tötet *P. falciparum*

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

mit einem IC_{50} -Wert von $245 \mu\text{M}$ und führt zur Gelierung von Albumin, Hämolyse und Bildung von Methämoglobin [130]. Darüber hinaus können Oxidantien niedrig konzentriert Signaltransduktionskaskaden aktivieren, wie z.B. den Keap1-Nrf2-Signalweg, und damit die sogenannte antioxidative Kapazität einer Zelle steigern. Für diesen Fall hat Helmuth Sies wie bereits zuvor erwähnt eine Erweiterung seines Konzept vorgesehen, um „antioxidative“ Wirkungen „prooxidativer“ Spezies zu berücksichtigen und nennt sie „oxidativer Eustress“ [132]. Diese Erweiterung macht das Konzept jedoch nicht klarer oder weniger irreführend. Hilfreicher wäre es gewesen die Eigenschaften von sogenannten Antioxidantien und Prooxidantien als ambivalent anzusehen und spezifisch nach Molekül und Situation zu beurteilen, anstatt starr zu gruppieren. Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass basierend auf dem ursprünglichen Konzept ein kontinuierliches Redoxungleichgewicht vermutlich eine generelle Akkumulation von Schäden herbeiführt. Vielmehr handelt es sich unter physiologischen Bedingungen oftmals um spezifische und keine generellen Effekte bzw. Schäden, die spezifisch erläutert werden müssen, anstatt sie zu verallgemeinern. Ein Fokus auf spezifische anstatt auf generelle Effekte könnten eine Erklärung dafür sein, dass der Entzug von Katalase oder anderen Enzymen der Thioredoxin oder Glutathion Systeme nicht in einer generellen Akkumulation von Schäden bzw. oxidierten Molekülen resultiert [61]. Beispielsweise zeigen einige Studien, dass das Entziehen von Peroxiredoxinen in *P. falciparum* keine Auswirkungen auf die Entwicklung von Blutstadien hat [133], [134], [135]. Es wird also deutlich, dass die oxidative Stress Hypothese kritisch angewendet werden muss. Hilfreich dabei wäre eine präzise Terminologie und klare Definitionen. Zudem sollten nichtsagende Sammelbegriffe wie „ROS“ und „oxidativer Stress“ sowie die starre Gruppierung angeblicher Pro- und Antioxidantien vermieden werden. Anstattdessen wäre eine präzise Beschreibung der Forschungsergebnisse oder aufgestellter Hypothesen ausschlaggebend, wobei sowohl beteiligte reaktive Spezies und Zielmoleküle, zugrunde liegende Reaktionsmechanismen als auch daraus resultierende, akkumulierende Schäden spezifisch benannt werden.

1.3.6 Physiologische Quellen von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid in *P. falciparum* und antioxidative Systeme des Parasiten

Es wird vermutet, dass der intraerythrozytäre Lebenszyklus von *P. falciparum* durch den exzessiven Hämoglobinverdau im Trophozoiten und dem damit verbundenen Wachstum, sowie durch die DNA-Synthese, die überwiegend im Schizonten stattfindet, metabolisch erzeugten oxidativen Stress verursacht [127]. Die Entstehungsquellen von Superoxidanionen sind vermutlich die mitochondriale Elektronentransportkette, sowie der Hämoglobinabbau in der Verdauungsvakuole, bei dem die freiwerdenden Elektronen der Oxidation von Fe^{2+} in Hämoglobin zu Fe^{3+} auf molekularen Sauerstoff übertragen werden sollen [128]. In den Mitochondrien werden Superoxidanionen vermutlich durch die mitochondriale Superoxid-Dismutase *PfSOD2* zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid disproportioniert [136]. Jortzik *et al.* behaupten zudem, dass Superoxidanionen von der Verdauungsvakuole ins Cytosol transportiert werden, wo sie von der cytosolischen *P. falciparum* Superoxid-Dismutase 1 (*PfSOD1*) ebenfalls zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Diese Hypothese erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da Superoxidanionen bei einem pH von 5,5 in der Verdauungsvakuole vermutlich sehr reaktiv und nukleophil sind und kaum stabil genug, für einen Transport ins Cytosol. Unter physiologischen Bedingungen kommt es also zur Bildung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid. Es wird angenommen, dass der Parasit über effektive antioxidative Systeme verfügt, um das intrazelluläre Redoxgleichgewicht aufrecht zu erhalten - er hat eine physiologische Resistenz. Da der Parasit weder eine Katalase, noch eine Glutathionperoxidase bildet, sind Peroxiredoxine ein essentielles antioxidatives System, die das entstehende Wasserstoffperoxid zu Wasser reduzieren. Peroxiredoxine können anhand ihres Katalysezyklus in 1-Cys, 2-Cys und atypische 2-Cys Peroxiredoxine gruppiert werden [137] und folgen einem Katalysezyklus, der in Abbildung 1.4 dargestellt ist. In *P. falciparum* wurden fünf Peroxiredoxine identifiziert: Prx1a, Prx1m, Prx5/AOP, Prx6 und PrxQ/nPrx, wobei es sich bei Letzte-

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

rem um ein chromatin-assoziiertes, nukleares Peroxiredoxin handelt [128], [138]. In den asexuellen Blutstadien importiert der Parasit auch das humane Peroxiredoxin Prx2 und setzt dieses zur Beseitigung von Wasserstoffperoxid ein [139].

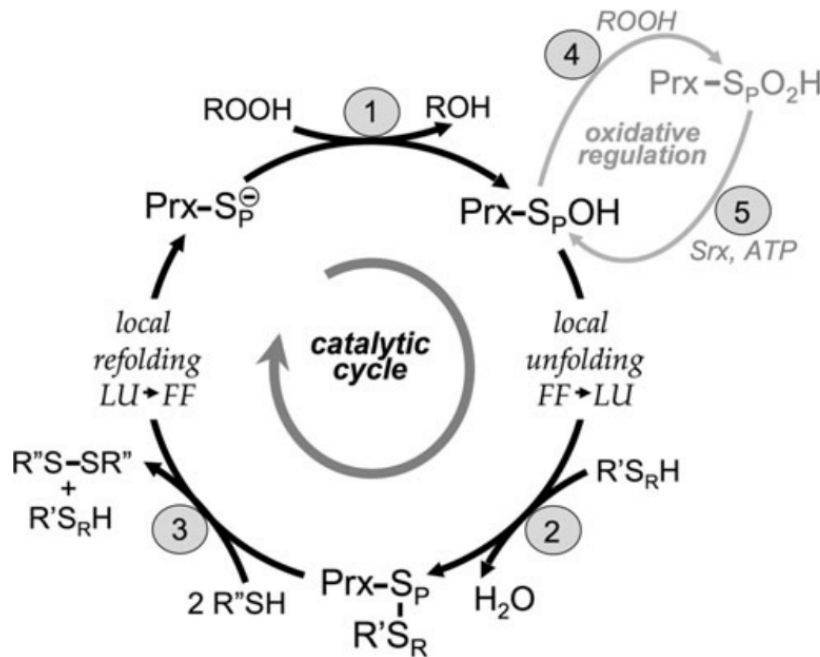


Abbildung 1.4: Katalysezyklus von Peroxiredoxinen. In der vollständig gefalteten Konformation (FF) greift das Thiolat des peroxidativen Cysteins (PrxS_p^-) ein Hydroperoxid (ROOH) nukleophil an, wobei der korrespondierende Alkohol (ROH) und die Sulfensäure des Peroxiredoxins (PrxS_pOH) entstehen (1). Letzere kann in einer Nebenreaktion durch weitere Oxidation zur Sulfinsäure ($\text{PrxS}_p\text{OS}_p\text{H}$) reagieren (4) und durch ein Sulfiredoxin (Srx), welches in *P. falciparum* jedoch nicht vorhanden ist, zur Sulfensäure zurückgebildet werden (5). Nach lokaler Entfaltung (LU) greift ein Thiol ($\text{R}'\text{S}_\text{R}\text{H}$) das oxidierte Peroxiredoxin an und bildet ein Disulfid (2). Durch Reaktion mit einem weiteren Thiol ($\text{R}''\text{SH}$) wird das Peroxiredoxin reduziert und geht wieder in die vollständig gefaltete Konformation über (3). Abbildung übernommen aus [140].

Das Antioxidant Protein PfaOP ist Teil der Prx5 Subfamilie [141] und ist sowohl im Cytosol, als auch im Apicoplast des Parasiten *P. falciparum* lokalisiert [142]. Es gehört zu den 1-Cys Peroxiredoxinen, da in dessen Katalysezyklus nur ein Cystein-Rest zum Einsatz kommt, dabei ist es an ein Glutathion/Glutaredoxin System gekoppelt [143], [144], [145], [146]. $\text{PfaOP}_{\text{red}}$ bildet durch Reaktion mit Hydroperoxiden oder Peroxynitrit eine katalytische Sulfensäure [143], [145], [147] (Abb. 1.4, Schritt (1)). Die $\text{PfaOP}^{\text{L109M}}$ -Sulfensäure

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

wurde in Bischoff *et al.* als Modell zur Untersuchung der Reaktivität einer katalytischen Sulfensäure verwendet [1]. Des Weiteren liegt die Glutathionkonzentration im Cytosol bei etwa 2 mM, wobei das Gleichgewicht einseitig bei GSH liegt, was die reduzierenden Bedingungen im Cytosol widerspiegelt [148]. Laut der Hypothese von Ginsburg *et al.* wird freies Häm (FP-IX) von GSH im Cytosol des Parasiten abgebaut [149]. Egan *et al.* konnten jedoch nachweisen, dass der überwiegende Teil des freien Häms in der Verdauungsvakuole verbleibt und dort zu Hämozoin polymerisiert.

1.3.7 *Rhodotorula gracilis* D-Aminosäure Oxidase: Wirkweise und Expression von *RGDAO* als Transgen im pHBIRH-Vektor

Die *Rhodotorula gracilis* D-Aminosäure-Oxidase ist ein Redoxenzym, das die Oxidation von D-Aminosäuren zu den korrespondierenden α -Ketosäuren, unter Verwendung des Cofaktors FAD katalysiert [150]. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.5 abgebildet.

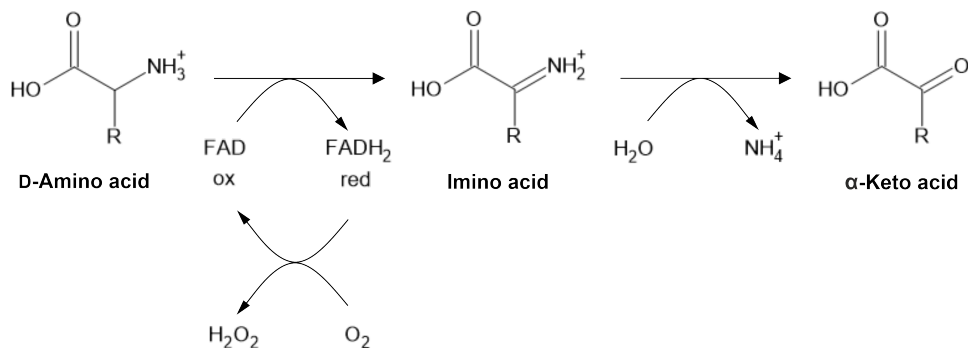


Abbildung 1.5: Reaktionsmechanismus der *Rhodotorula gracilis* D-Aminosäure Oxidase. Die D-Aminosäure wird zunächst zur Iminosäure oxidiert, die Elektronen werden dabei auf den Cofaktor FAD übertragen, der zu FADH₂ reduziert wird. Die Iminosäure reagiert mit Wasser zur α -Ketosäure, dabei wird ein Ammoniumion freigesetzt. Der Cofaktor wird zur oxidierten Form FAD regeneriert, indem beide Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, wodurch Wasserstoffperoxid gebildet wird.

Im ersten Reaktionsschritt wird die D-Aminosäure zur Iminosäure oxidiert, wobei die Elektronen auf den Cofaktor FAD übertragen werden, der daraufhin zu FADH₂ reduziert wird. Die Iminosäure wird im nächsten Reaktionsschritt mit einem Molekül Wasser im ak-

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

tiven Zentrum zur α -Ketosäure umgewandelt, wobei ein Ammoniumion freigesetzt wird. FADH_2 wird, durch Übertragung beider Elektronen auf molekularen Sauerstoff, zu FAD regeneriert. Es entsteht Wasserstoffperoxid [150]. In Abbildung 1.6 ist die Kristallstruktur des aktiven Zentrums mit den Resten Tyr²²³, Tyr²³⁸, Ser³³⁵, Arg²⁸⁵, Asn⁵⁴, Gln³³⁹ und dem Wassermolekül H_2O^{72} dargestellt [151]. Das Substrat ist im aktiven Zentrum wie folgt gebunden: Arg²⁸⁵ wechselwirkt elektrostatisch mit der Carboxylatgruppe des Substrats, beispielsweise D-Alanin und stabilisiert gleichzeitig die negative Ladung des Flavin Semicuinons das als Cofaktor dient [152].

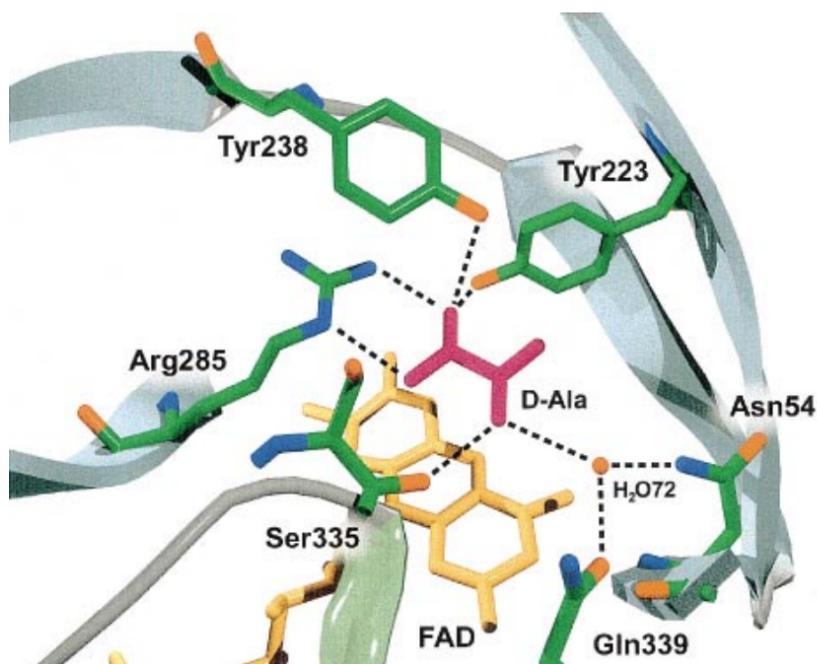


Abbildung 1.6: Aktives Zentrum der *RgDAAO*. Die Aminosäurereste im aktiven Zentrum der *RgDAAO* im Komplex mit D-Alanin und dem Cofaktor FAD. Die Wechselwirkungen zwischen Ligand und den aktiven Resten sind durch gestrichelte Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt. Abbildung übernommen aus Pilone *et al.* [151].

Eines der Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe des Substrats bildet Wasserstoffbrücken zu den Hydroxylgruppen der Reste Tyr²²³ und Tyr²³⁸ [152]. Die α -Aminogruppe des Substrats ist symmetrisch wasserstoffverbrückt mit dem Rückgrat des Ser³³⁵-Rests und dem Wassermolekül H_2O^{72} im aktiven Zentrum. Ser³³⁵ und H_2O^{72} dienen dabei als Akzep-

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

toren [152]. H_2O^{72} wird im aktiven Zentrum durch die Reste Asn⁵⁴ und Gln³³⁹ fixiert. Beide Gruppen sind nicht an der Säure-Base Katalyse beteiligt. Die Seitenkette des Substrats ragt in Richtung der hydrophoben Bindetasche des aktiven Zentrums [152]. Die beiden Tyrosin-Reste Tyr²²³ und Tyr²³⁸ dienen ausschließlich der Substratbindung und haben keine katalytische Funktion. Harris *et al.* haben gezeigt, dass durch Mutation der Tyrosin-Reste nur die Substratbindung aber nicht die Enzymaktivität beeinträchtigt wird [153]. Die Rolle von Arg²⁸⁵, einem der wenigen konservierten Reste im aktiven Zentrum der *RgDAAO*, scheint die richtige Orientierung und Ausrichtung des Substrats und des Cofaktors während der Katalyse zu sein. Arg²⁸⁵ stabilisiert die negative Ladung des N¹-C²=O Locus des Isoalloxazin-Rings des Flavins [152]. Zur Bindung von Substrat-Carboxylaten im komplexierten Enzym geht Arg²⁸⁵ vermutlich Konformationsänderungen ein [151], [152]. Es ist davon auszugehen, dass eine Mutation des Arg²⁸⁵ zu einer Destabilisierung der Orientierung von Substrat und Cofaktor führt. Die Fähigkeit der Stabilisierung des Flavin Semiquinons, sowie die Bindungsaffinität zum Substrat nimmt ab und die Mutationen des Arg²⁸⁵-Restes sind zwar katalytisch kompetent, führen aber zu einem ≈ 300 -fachen Anstieg des K_m -Werts sowie zu einer ≈ 500 -fach niedrigeren Turnover-Zahl [152]. Ein ähnlicher Abfall wurde in der Geschwindigkeit der Flavin Reduktion als geschwindigkeitsbestimmender Schritt beobachtet [152], [151], [150]. Durch die Mutation des Arg²⁸⁵-Restes beispielsweise zu Alanin (R285A) werden Redox-Eigenschaften verändert, die offenbar ausschlaggebend für die effektive enzymatische Funktion sind. Stämme, die Plasmide mit einer solchen Mutation durch Transfektion aufgenommen haben, wurden in dieser Arbeit als Negativkontrolle zum Vergleich mit transgenen Stämmen mit einer uneingeschränkt funktionsfähigen *RgDAAO* verwendet. In Abbildung 1.7 ist der Aufbau des pHBIRH-Vektors dargestellt [154]. Übliche genetische Werkzeuge bringen in *P. falciparum* einige Einschränkungen mit sich. Die DNA von *P. falciparum* ist geprägt von AT-reichen [155], repetitiven Sequenzen, was fehlerfreie Klonierungen in *E. coli* schwer gestaltet. Für eine transgene Expression werden eigentlich zwei Expressionskassetten auf einem Plasmid gebraucht, eine für das Transgen und eine für die Expression des Se-

1.3. DIE HYPOTHESE DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER MALARIAFORSCHUNG

lektionsmarkers. Hierfür ist jeweils ein separater Promoter und eine Terminatorsequenz notwendig. Das macht das Plasmid groß und instabil. Außerdem ist die Transkription oft nicht regulierbar, was es schwer macht, Phänotypen, die abhängig von der Menge an heterologem Protein sind, korrekt zu interpretieren und einzuordnen. Epp *et al.* entwickelten ein Plasmid-basiertes System zur Transgenexpression mit nur einem bidirektionalen Promotor, dem *var*-Intron, der sowohl die Expression des Transgens, hier des *RENILLA LUCIFERASE*-Gens, als auch die des Selektionsmarkers, des Blastocidin-*S*-Deaminase-Gens, steuert. Die Größe des Plasmids wird erheblich reduziert, wodurch die Stabilität des Konstrukts steigt. Zudem ist in diesem System die Anzahl der episomalen Plasmidkopien über die Konzentration des Selektionsantibiotikums Blastocidin regulierbar. Somit kann die Expression des Transgens um das 10-fache gesteigert werden [154]. Durch die Blastocidinkonzentration ist es möglich die Anzahl an episomalen Kopien des Plasmids streng zu kontrollieren und zu manipulieren. In Epp *et al.* konnte sowohl die episodale Coexpression des *RENILLA LUCIFERASE*- und des Blastocidin-*S*-Deaminase-Gens in stabil transformierten Parasiten gezeigt werden, als auch die Blastocidin-abhängige Regulierbarkeit der Expression des *RENILLA LUCIFERASE*-Gens [154].

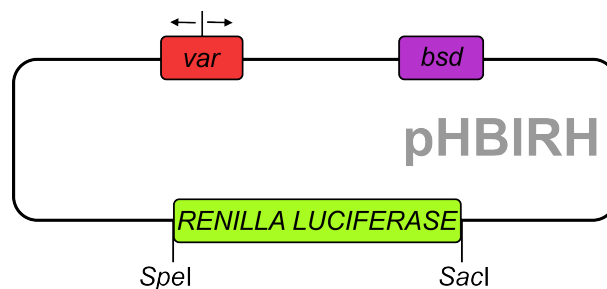


Abbildung 1.7: Aufbau und Funktion des pHBIRH-Vektors. Der pHBIRH Vektor besitzt einen bidirektionalen Promotor, das *var*-Intron, das gleichzeitig das Transgen, hier das *RENILLA LUCIFERASE*-Gen und den Selektionsmarker, das Blastocidin-*S*-Deaminase-Gen (*bsd*), exprimiert. Durch nur eine Expressionskassette wird das Plasmid kleiner und stabiler. Die Expression des *RENILLA LUCIFERASE*-Gens, das durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SacI* einfach durch ein anderes Transgen ausgetauscht werden kann (z.B. *RGDAO*), ist über die Blastocidinkonzentration regulierbar. Eine Erhöhung der Blastocidinkonzentration führt zu einer Selektion von Zellen, die mehrere Kopien des Plasmids tragen und kann die Expression des Transgens bis zu 10-fach erhöhen [154].

Anstatt des *RENILLA LUCIFERASE*-Gens, kann auch *RGDAAO* in diesem Plasmid als Transgen exprimiert und die Expression durch die Blasticidinkonzentration reguliert werden. So können insbesondere Phänotypen, die von der Konzentration des gebildeten Redox-Enzyms abhängen, zuverlässig untersucht werden. Durch exogene Zugabe von D-Aminosäuren steigt auch gleichzeitig die Konzentration an gebildetem Wasserstoffperoxid in Abhängigkeit von der gebildeten Enzymmenge von *RgDAAO* an (siehe Abb. 1.5). Die Kombination aus den Eigenschaften des pHBIRH-Vektors und des Redoxenzyms *RgDAAO* wurden in dieser Studie verwendet, um die Wasserstoffperoxidkonzentration, durch die Verwendung von Zielsequenzen kompartimentspezifisch im Rahmen eines titrierbaren Systems anzuheben .

1.4 Ziel der Arbeit

Dimedon und Dimedonderivate werden in der Literatur zur selektiven, nukleophilen Detektion von Cysteinyl-Sulfensäuren oder allgemein von Sulfensäureresten verwendet [22], [156], [157], [158], [54], [52]. Qualitative, massenspektrometrische Daten deuten darauf hin, dass Dimedon auch mit cyclischen Sulfenylamiden reagiert [46]. Somit stellen cyclische Sulfenylamide ein Konkurrenzelektrophil zu Sulfensäuren dar. Unter physiologischen Bedingungen muss Dimedon außerdem mit dem Nukleophil Glutathion (GSH) konkurrieren, das in der Zelle hochkonzentriert vorliegt ([159]). Die Detektion von Peptiden oder kleinen Modell-Molekülen mit Dimedon muss also nicht zwangsläufig auf eine Sulfensäure zurückzuführen sein. Da bisher nur qualitative und keine kinetischen Daten verfügbar waren, war es das Ziel dieser Arbeit eine quantitative, kinetische Analyse der in Abbildung 1.8 gezeigten möglichen Konkurrenzreaktionen hinsichtlich der Sulfensäuredetektion mit Dimedon durchzuführen und die fehlenden Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Cyclische Sulfenylamide (orange) stehen unter wässrigen Bedingungen im Gleichgewicht mit der korrespondierenden Sulfensäure (grün) [160]. Beide Spezies reagieren mit Dimedon unter unterschiedlichen Bedingungen zu einem Thioether (rot).

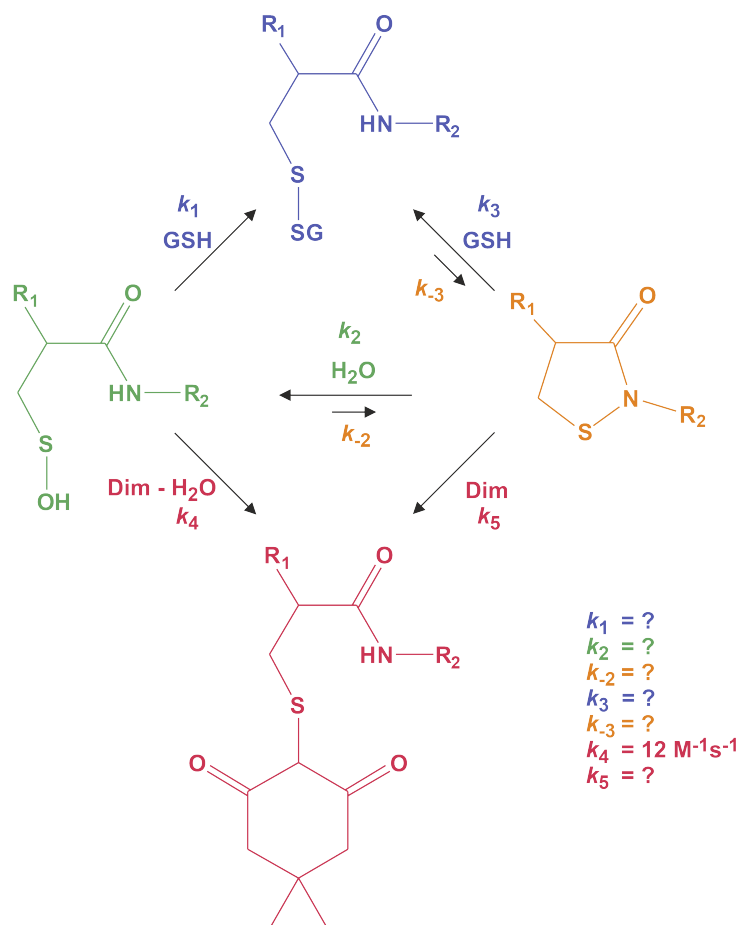


Abbildung 1.8: Potenzielle Konkurrenzreaktionen zur Detektionsreaktion zwischen Dimeredon und Sulfensäureresten. Cyclische Sulfenylamide (orange) stehen unter wässrigen Bedingungen im Gleichgewicht mit der korrespondierenden Sulfensäure (grün) [160]. Die in der Literatur als selektiv beschriebene Reaktion von Dimeredon und der Sulfensäure führt zur Bildung eines stabilen Thioethers (rot) [22], [156], [160]. Aus der Reaktion von Dimeredon und dem cyclischen Sulfenylamid geht die gleiche Verbindung hervor, beide sind massenspektrometrisch nicht unterscheidbar [46]. GSH als hochkonzentriertes, intrazelluläres Nukleophil reagiert mit cyclischen Sulfenylamiden und Sulfensäuren zu Disulfiden (blau) [159]. Die Relevanz der einzelnen Reaktionen und eine mögliche Konkurrenz zwischen den Reaktionen, hängt von den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten ab. Die Geschwindigkeitskonstante $k_4 = 12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ war bereits literaturbekannt [160].

Die Produktsignale sind massenspektrometrisch nicht unterscheidbar [46]. Retrospektiv ist es daher nicht möglich zu sagen, ob Dimeredon die Sulfensäure oder das cyclische Sulfenylamid als Konkurrenz-Elektrophil detektiert hat. Auch die Reaktion des cyclischen Sulfenylamids oder der korrespondierenden Sulfensäure mit dem hochkonzentrierten Nukleophil GSH zu einer Disulfid-Spezies (blau), ist eine potenzielle Konkurrenzreaktion, die

die Dateninterpretation der Dimedondetektion von Sulfensäuren verfälschen kann. Die Relevanz und der tatsächliche Einfluss der potenziellen Konkurrenzreaktionen (Abb.1.8) auf die Sulfensäuredetektion durch Dimedon hängt allein von den zugrunde liegenden Geschwindigkeitskonstanten und Konzentrationen der Reaktionspartner ab.

Außerdem sollte in dieser Arbeit die oxidative Stress-Hypothese in asexuellen Blutstadien des Malariaparasiten *P. falciparum* näher untersucht werden [127], [161]. Kompartimentspezifische Stressreaktionen sollen für das Cytosol, die Verdauungsvakuole, sowie für die mitochondriale Matrix und den mitochondrialen Intermembranraum identifiziert werden. Dabei sollten die Wasserstoffperoxidkonzentrationen in den verschiedenen Kompartimenten durch das episomal genetisch kodierte, heterologe Redoxenzym D-Aminosäureoxidase aus *Rhodotorula gracilis* durch Zugabe von D-Aminosäuren lokal erhöht werden. Als optimale Negativkontrolle wurden transgene Parasiten eingesetzt bei denen das aufgenommene Plasmid die Punktmutation R285A in der *RgDAAO* enthielt, wodurch das gebildete Enzym inaktiv blieb. Auf diese Weise sollten potentielle Effekte von Blasticidin und andere potentiell toxische Effekte, beispielsweise durch das gebildete Protein, identifiziert werden. Zunächst sollte die erfolgreiche Bildung der D-Aminosäureoxidase im Parasiten mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen werden. Durch Verwendung des pHBIRH-Plasmids, welches das Blasticidin-*S*-Deaminase-Gen (*bsd*) als Resistenzmarker und ein *var*-Intron als bidirektionalen Promotor besitzt, sind die Menge an gebildetem Protein und somit auch die daraus resultierenden Wasserstoffperoxidmengen potentiell titrierbar in Abhängigkeit von der Blasticidinkonzentration im Kulturmedium [154]. Daher sollte auch die Titrierbarkeit des Systems durch einen Blasticidin-abhängigen Westernblot für die Kompartimente Cytosol und die mitochondriale Matrix analysiert werden. Die Lokalisation des gebildeten Enzyms im gewünschten Kompartiment sollte mit Hilfe der Immunofluoreszenzmikroskopie durch einen *N*-terminalen oder zwischen Zielsequenz und Enzym lokalisierten 3xHA-Tag untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Relevanz von Wasserstoffperoxid für die Wirkmechanismen der Antimalariamitteln Atovaquon, Arte-

1.4. ZIEL DER ARBEIT

misinin und Chloroquin bedingungs- und kompartimentspezifisch bestimmt und mögliche Anpassungseffekte des Parasiten an die erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentration ermittelt werden. Dafür sollten zunächst IC_{50} -Messungen mit Paraquat als Positivkontrolle mit verschiedenen D-Aminosäuren durchgeführt werden. Langfristig sollte ein Assay zur Untersuchung der Wirkmechanismen von Antimalariamitteln etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Binärpumpe 1100/1200	Agilent
Digitaler Inkubator INCU Line	VWR
ESI-MS Amazon LTD	Bruker
Feinwaage ABT 120-5DNM	Kern
Gel- und Blot-Dokumentiersystem ECL CHEMOSTAR	Intas
Gas-Kartusche CV-360	CampingGaz
Filter	Sartorius
Heizblock Thermomixer R/C	Eppendorf
Hellfeld-Mikroskop AXIO Lab. A1	Zeiss
Horizontales Agarose-Minigel-System	Biostep
Inkubationsschüttler Innova 44/44R	New Brunswick
Inkubationsschüttler MaxQ 4450	Thermo scientific
Kälte-Umwälzthermostat Julabo F12-ED	Julabo
Konfokalmikroskop Axio Observer, LSM 880	Zeiss
Laminar flow Sterilwerkbank MSC-Advantage (<i>E. coli</i>)	Thermo scientific
Laminar flow Sterilwerkbank Safe 200 (<i>P. falciparum</i>)	Thermo scientific

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.1 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Gerät	Hersteller
Lichrospher 100 RP18, 125 x 4 mm, 5 µm reversed phase Säule	Macherey-Nagel
Magnetrührer	Heidolph
Metallheizblock MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Mikropipetten PIPETMAN (p2, p10, p20, p50, p200, p1000)	Gilson
Mikroplattenleser CLARIOstar	BMG Labtech
Mikrowelle	Severin
Mikrozentrifuge SU1550	Sunlab
Mini Trans-Blot Elektrophorese Zelle für Westernblot	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand and Clamps	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra vertikale Elektrophoresezelle	Bio-Rad
NanoDrop One ^c	Thermo Scientific
Netzgerät Mini 300 V	Major Science
Netzgerät PowerPac Basic	Bio-Rad
NMR Avance 400	Bruker
pH Elektrode Blueline 56 Electrode	SI Analytics
pH-Meter Basic Meter PB-11	Sartorius
Pipettierhelfer accu-jet pro und accu-jet S	Brand
Rocking Platform Duomax 1030	Heidolph
Rotlichtlampe	Petra Electric
Schmelzpunktgerät <i>SPM-x-300</i>	Müller

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.1 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Gerät	Hersteller
<i>Spektrum 100</i> FT-IR Spektrometer	Perkin-Elmer
Stopped-flow Spectrofluorometer SX-20	Applied Photophysics
ThermoMixer Schüttelinkubator	Eppendorf
Transfektionsgerät Nucleofactor II/2b	Lonza
Umwälzthermostat	Polyscience
UV/Vis Photometer V-650 Spectrophotometer	Jasco
UV-Tisch zur Agarose-Geldokumentation	Fröbel
Vertikaler Standautoklav VX-95	Systec
Vortex-Mixer	Heidolph Instruments
Wasserbad Aqualine 5 l	VWR
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld
Zelldichtemessgerät Ultrospec 10	Amersham Biosciences
Zentrifuge J-6B, Rotor JA10, JA-20	Beckmann
Zentrifuge Mikro 220/220R	Hettich
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
μ -Slide 8 Well Glass Bottom	ibidi
96-Well Platte mit Deckel, schwarz/transparenter Boden, TC-Oberfläche	Thermo Fisher
96-Well Platte mit Deckel, schwarz/transparenter Boden, TC-Oberfläche	Corning Falcon
Bottle-Top-Filter Steritop Durapore mit PVDF-Membran 0,22 μ m	Merck Millipore
Cryovials 2 ml	Greiner
Cryovials 2 ml	Sarstedt
Einmalhandschuhe ROTIPROTECT Nitril light Größe S	Carl Roth
Einmal-Spritze 50 ml	BD Plastipak
Elektroporationsküvette, Spaltbreite 2 mm, 400 μ l	VWR
Hochdruck CO ₂ -Gasflasche (99,99 %)	Alphagaz
Hochdruck N ₂ -Gasflasche (99,99 %)	Alphagaz
Immersionsöl	Carl Roth
Injekt Einmal-Spritze 2 ml mit Luer-Lock-Ansatz	Braun
Injekt Einmal-Spritze 2, 5, 10, 20 ml	Braun
Injekt-F 1 ml Spritze	Braun
Klebeband 30mm x 20m	Würth
Objektträger Superfrost Kanten geschliffen, 45°, weiß	Menzel
Parafilm	Sigma-Aldrich

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.2 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Material	Hersteller
Petrischale mit Nocken, 145/20 mm	Greiner
Petrischalen <i>E. coli</i>	Waldeck
Petrischalen mit Nocken, schwere Ausführung	Greiner
Pipettenspitzen gelb und blau	Starlab
Polystyrol-Küvetten	Sarstedt
Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL, Typnr. 104B-QS, Schichtdicke 10 mm	Hellma
Reaktionsgefäß mit Stehrand 50 ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Greiner Bio-One
SafeSeal Reagiergefäß Biosphere plus, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt
Sapphire Pipettenspitze 10 µl XL	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten 1, 5, 10, 25 und 50 ml	Sarstedt
Skalpell	Braun
Sonderkanülen STERICAN gelb 0,90 x 70 mm	Braun
Spritzenfilter Millex mit PVDF-Membran 0,22 µm	Merck Millipore
Transfermembran ROTI PVDF 0.45, 375 × 26.5 cm	Carl Roth
Vernichtungsbeutel 2 l	Sarstedt
Vernichtungsbeutel 40 l	Sarstedt
Whatman Papier 3 mm CHR	GE Healthcare
Zellstoff-Tücher, einlagig, fusselfrei	Kimtech

2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide (DNA)

Zielsequenzen

Tabelle 2.3: Zielsequenzen

Zielsequenz	Abkürzung
<i>PFPLASMEPSIN IV</i> ¹⁻⁷⁰ (<i>N</i> -terminale Sequenz von PF3D7_1407800 bzw. PF14_0075) [162]	DV ¹⁻⁷⁰ , DV
<i>PFHSP60</i> ¹⁻⁶⁸ (<i>N</i> -terminale Sequenz von PF3D7_1015600)	MitoM ¹⁻⁶⁸ , MitoM
<i>PFNADH-Cytochrom b5 Reduktase</i> ¹⁻⁴⁹ + GSGSGSGS Aminosäuresequenz (<i>N</i> -terminale Sequenz von PF3D7_1367500 bzw. PF13_0353)	IMS ¹⁻⁴⁹ , IMS

Die in Tabelle 2.3 eingeführten Abkürzungen wurden in den Tabellen 2.4 und 2.5, sowie im Text und in Abbildungen verwendet.

2.1. MATERIAL

Plasmide

Tabelle 2.4: Plasmide

Plasmid	Funktion	Referenz
pUC57 Simple Vektor	Klonierung in <i>E. coli</i>	GenScript
pUC57-IMS ¹⁻⁴⁹ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT}	Klonierung in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pUC57-IMS ¹⁻⁴⁹ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, R285A}	Klonierung in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pUC57-IMS ¹⁻⁴⁹ roGFP2- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT}	Klonierung in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pUC57-IMS ¹⁻⁴⁹ roGFP2- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, R285A}	Klonierung in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pHBIRH	Episomale Expression in <i>P. falciparum</i> , Amp Resistenz (AmpR.), bidirektionaler Promotor zur Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens in <i>P. falciparum</i>	[154]
pHBIRH-IMS ¹⁻⁴⁹ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT}	Enthält <i>RgDAAO</i> ^{2-365, WT} im mitochondrialen Intermembranraum, 3xHA-Tag zwischen Zielsequenz IMS ¹⁻⁴⁹ und <i>RGDAAO</i> ^{2-365, WT}	Diese Arbeit
pHBIRH-IMS ¹⁻⁴⁹ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, R285A}	Enthält <i>RgDAAO</i> ^{2-365, R285A} im mitochondrialen Intermembranraum, 3xHA-Tag zwischen Zielsequenz IMS ¹⁻⁴⁹ und <i>RGDAAO</i> ^{2-365, R285A}	Diese Arbeit
pHBIRH-IMS ¹⁻⁴⁹ roGFP2- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT}	Enthält <i>RgDAAO</i> ^{2-365, WT} im mitochondrialen Intermembranraum, roGFP2-Tag zwischen Zielsequenz IMS ¹⁻⁴⁹ und <i>RGDAAO</i> ^{2-365, WT}	Diese Arbeit
pHBIRH-IMS ¹⁻⁴⁹ roGFP2- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, R285A}	Enthält <i>RgDAAO</i> ^{2-365, R285A} im mitochondrialen Intermembranraum, roGFP2-Tag zwischen Zielsequenz IMS ¹⁻⁴⁹ und <i>RGDAAO</i> ^{2-365, R285A}	Diese Arbeit

Die Aminosäuresequenzen der Zielsequenzen wurden auf PlasmoDB unter der angegebenen Gen-ID recherchiert. Die Aminosäuresequenz der mRNA des *RGDAAO*-Gens (Z71657)

2.1. MATERIAL

wurde aus [163] entnommen. Im Folgenden wurde *RGDAAO*^{2-368, K367G, WT} als *RGDAAO*^{WT} und *RGDAAO*^{2-368, K367G, R285A} als *RGDAAO*^{R265A} abgekürzt.

Oligonukleotide

Ausgehend von bestehenden pUC57-Simple Plasmiden wurde in dieser Arbeit ausschließlich die alte IMS-Zielsequenz, die Dihydroorotatdehydrogenase, gegen die NADH-Cytochrom *b5* Reduktase ausgetauscht. Das Modul bestehend aus Zielsequenz, Tag und *RGDAAO* wurde mittels Restriktionsverdau mit *SpeI* und *SacI* isoliert und durch Ligation in den pHBRH Vektor eingefügt (siehe Abb. 2.3). Die Sequenz der fertigen pHBRH Konstrukte wurde vor der Transfektion in den *Pf3D7*^{WT} Stamm mit den in Tab. 2.5 angegebenen Sequenzierprimern überprüft. Die korrekten Sequenziererergebnisse sind im Anhang dargestellt. Klonierungsprimer wurden nicht benötigt.

Tabelle 2.5: Oligonukleotide

Sequenzier-Primer	Sequenz
<i>RgDAAO</i> ^{R285A} /s (#11)	GACATAATGTAGGATTAGCACCAG-CTAGAAGAGGTGG
<i>RgDAAO</i> ^{R285A} /as (#12)	CCACCTCTTCTAGCTGGTGCTAAT-CCTACATTATGTC
<i>RgDAAO</i> /seq/s (#19)	CATTACCAAGTTCAGAATGTCC
<i>RgDAAO</i> /seq/as (#20)	GTTCTAAACTTGTTACTGTTCTTC
roGFP2/seq/as (#30)	GTATACATTGTGACAGTTGTAG
roGFP2/seq2/as (#31)	CTAACAATACCATATGGTC

2.1.4 Bakterien- und *Plasmodium falciparum* Stämme

Tabelle 2.6: Bakterien Stämme

Bakterien-stamm	Funktion	Hersteller
XL1-Blue	Amplifizierung von Plasmiden (Klonierung, Transformation)	Stratagene

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.7: Wildtyp Stamm

<i>P. falciparum</i> Wildtyp Stamm	Charakteristik	Referenz
3D7	abgeleitet von NF54	[164]

Tabelle 2.8: Transgene Stämme

Transgene Stämme	Charakteristik
3D7 [pHBIRH]	episomale Expression in <i>P. falciparum</i> , als Negativkontrolle bei der Westernblotanalyse verwendet
3D7 [pHBIRH] Cyto 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT} , 3D7 Cyto <i>RgDAAO</i> ^{WT}	bidirektionaler Promotor zur cytosolischen Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens <i>RGDAAO</i> ^{WT} in <i>P. falciparum</i> , <i>N</i> -terminaler 3xHA-Tag (YPYDVDPDYA mit Glycin-Linker)
3D7 [pHBIRH] Cyto 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, R285A}], 3D7 Cyto <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	bidirektionaler Promotor zur cytosolischen Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens <i>RGDAAO</i> ^{R285A} in <i>P. falciparum</i> , <i>N</i> -terminaler 3xHA-Tag (YPYDVDPDYA mit Glycin-Linker)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle 2.8 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Transgene Stämme	Charakteristik
3D7 [pHBIRH] DV 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT} 3D7 DV <i>RgDAAO</i> ^{WT}	bidirektionaler Promotor zur cytosolischen Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens <i>RGDAAO</i> ^{WT} , Transport des Proteins in die Verdauungsvakuole von <i>P. falciparum</i> , 3xHA-Tag (YPYDVDPDYA mit Glycin-Linker) zwischen Zielsequenz DV ¹⁻⁷⁰ und <i>RGDAAO</i> ^{WT}
3D7 [pHBIRH] MitoM ¹⁻⁶⁸ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT} 3D7 MitoM <i>RgDAAO</i> ^{WT}	bidirektionaler Promotor zur cytosolischen Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens <i>RGDAAO</i> ^{WT} , Transport des Proteins in die mitochondriale Matrix von <i>P. falciparum</i> , 3xHA-Tag (YPYDVDPDYA mit Glycin-Linker) zwischen Zielsequenz MitoM ¹⁻⁶⁸ und <i>RGDAAO</i> ^{WT}

Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle 2.8 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Transgene Stämme	Charakteristik
3D7 [pHBIRH] MitoM ¹⁻⁶⁸ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, R285A} 3D7 MitoM <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	bidirektionaler Promotor zur cytosolischen Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens <i>RGDAAO</i> ^{R285A} , Transport des Proteins in die mitochondriale Matrix von <i>P. falciparum</i> , 3xHA-Tag (YPYDVDPDYA mit Glycin-Linker) zwischen Zielsequenz MitoM ¹⁻⁶⁸ und <i>RGDAAO</i> ^{R285A}
3D7 [pHBIRH] IMS ¹⁻⁴⁹ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, WT} 3D7 IMS <i>RgDAAO</i> ^{WT}	bidirektionaler Promotor zur cytosolischen Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens <i>RGDAAO</i> ^{WT} , Transport des Proteins in den mitochondrialen Intermembranraum von <i>P. falciparum</i> , 3xHA-Tag (YPYDVDPDYA mit Glycin-Linker) zwischen Zielsequenz IMS ¹⁻⁴⁹ und <i>RGDAAO</i> ^{WT}

Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle 2.8 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Transgene Stämme	Charakteristik
3D7 [pHBIRH IMS ¹⁻⁴⁹ 3xHA- <i>RGDAAO</i> ^{2-368, K367G, R285A}] 3D7 IMS <i>RgDAAO</i> ^{R285A}	bidirektionaler Promotor zur cytosolischen Expression des Selektionsmarkers <i>bsd</i> und des Transgens <i>RGDAAO</i> ^{R285A} , Transport des Proteins in den mitochondrialen Intermembranraum von <i>P. falciparum</i> , 3xHA-Tag (YPYDVPDYA mit Glycin-Linker) zwischen Zielsequenz IMS ¹⁻⁴⁹ und <i>RGDAAO</i> ^{R285A}

Der Stamm 3D7 [pHBIRH| DV 3xHA-*RGDAAO*^{2-365, R285A}] bzw. 3D7 DV *RgDAAO*^{R285A} konnte nicht rechtzeitig durch Transfektion des zugehörigen Plasmids erhalten werden.

2.1.5 Reagenzien

Chemikalien

Tabelle 2.9: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dioxan	Sigma-Aldrich
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC Hydrochlorid)	Fluorochem

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.9 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Chemikalie	Hersteller
1-Hydroxy-7-azabenzotriazol	Fluorochem
Aceton	Honeywell
Acetonitril	Fisher Scientific
Acrylamid/ Bisacrylamid Lösung 37,5:1 (30 % w/v)	Serva
Agar	Sigma-Aldrich
Agarose	Serva
AlbuMAXII	Gibco
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Calciumchlorid Dihydrat	Merck
Chloroform	Fischer scientific
Chloroform-d	Deutero
cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor	Roche
D-(+)-Glukose	Merck
DAPI	Carl Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure)	AppliChem
Gel Loading Dye Purple 6x, B7024A	New England Biolabs

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.9 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Chemikalie	Hersteller
Gel Loading Dye Orange 6x, B7022S	New England Biolabs
Glycin	Merck
D-Alanin	Sigma-Aldrich
D-Methionin	Sigma-Aldrich
D-Valin	Sigma-Aldrich
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Merck
DCM (Dichlormethan)	Acros Organics
Dimedon	TCI
DMF (Dimethylformamid)	Kraft
DMSO (Dimethylsulfoxid)	VWR
Luminol	Sigma-Aldrich
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich
Di-Natriumdihydrogenphosphat	Honeywell Fluka
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	VWR
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	Sigma-Aldrich
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
DMSO für Molekularbiologie (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DMSO-d6	VWR
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol (absolut)	VWR

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.9 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Chemikalie	Hersteller
Ethylacetat	Fischer scientific
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
Gel Lade-Puffer Lila 6x	New England Biolabs
Gel Lade-Puffer Orange 6x	New England Biolabs
Giemsa-Stammlösung	Carl Roth
Glutathion	Sigma-Aldrich
Glutathiondisulfid	Sigma-Aldrich
Glycerol	AppliChem
Hypoxanthin	c.c. pro
Imidazol	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Carl Roth
LB-Agar	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
L-Cystin	Carbolution
L-Valinmethylester	Carbolution
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Fischer scientific

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.9 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Chemikalie	Hersteller
Milchpulver (Blotting Grad)	Carl Roth
MitoTracker™ Orange CMTM Ros	Invitrogen
Natriumchlorid	Honeywell Fluka
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Fisher Chemical
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
n-Hexan	Chemsolute
PAGE GelRed, Nukleinsäure Gel-Färbung 10000x in Wasser	Biotium
Ponceau S	Serva
Pyridin extra trocken	Acros
rCutSmart 10x	NEB
Reinstwasser	StakPure Anlage
RPMI 1640 (25 mM HEPES, L-Glutamin)	Gibco
Salzsäure	VWR
Saponin	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
SYBR™ Green I Nukleinsäure Gel-Färbung 10000x Konzentrat in DMSO	Biozym
T4 DNA Ligase Puffer 10x mit 10 mM ATP, B0202S	NEB

Fortsetzung auf nächster Seite

2.1. MATERIAL

Tabelle 2.9 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Chemikalie	Hersteller
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Serva
TrisBase (Trihydroxymethylaminomethan Base)	Carl Roth
Triton X-100	Merck
Tween-20	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid	VWR
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Zellkultur Reagenzien

Tabelle 2.10: Verwendete Selektionsantibiotika

Selektionsantibiotikum	Stamm Konzentration	Finale Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml in 50 % Ethanol	100 μ g/ml	AppliChem
Blasticidin	10 mg/ml in HEPES Puffer	4, 10, 15, 20, 30, 40, 50 μ g/ml	Invivogen
Gentamicin	50 mg/ml in Wasser	2,7 μ g/ml	Carl Roth

Antikörper

Tabelle 2.11: Verwendete Antikörper

Antikörper	Quelle	Hersteller	Verdünnung
HA-Tag (C29F4) Rabbit mAB	Rabbit	Cell Signaling Technology	1:1000
α -Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate	Goat	Bio-Rad	1:5000
Anti-HA-Biotin High Affinity (3F10)	Rat	Roche	1:2000
Alexa Fluor TM 488 goat α -Rat IgG (H+L)	Goat	Invitogen	1:500

2.1. MATERIAL

Standardmarker

Tabelle 2.12: Verwendete Standardmarker

Marker	Hersteller	Verwendung
Color Protein Standard, broad range (#P7719S)	NEB	Polyacrylamid-Gele und SDS Gelelektrophorese, Westernblot
Quick Load 1 kb DNA Ladder (#N0468S)	NEB	Agarose-Gelelektrophorese
100 bp DNA Ladder (#N3231S)	NEB	Agarose-Gelelektrophorese

Enzyme

Tabelle 2.13: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme (<i>SpeI</i> -Hf, <i>NotI</i> -Hf, <i>BamHI</i> -Hf, <i>SacI</i> -Hf, <i>XmaI</i>)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs

Kits

Tabelle 2.14: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
QIAprep Spin MiniPrep Kit	QIAGEN
QIAprep MidiPrep Kit	QIAGEN
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2.1.6 Software

Tabelle 2.15: Verwendete Software

Programm	Quelle
ChemDraw	CambridgeSoft, PerkinElmer
ChemoStarTS	Imager Software von Intas ECL CHEMOSTAR
Citavi	Swiss Academic Software
Corel Draw Graphics Suite	Corel Corporation
EMBOSS Needle	EMBL
National Library of Medicine, GenBank	National Center for Biotechnology Information
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)
JustBio	https://www.justbio.com
MARS	BMG LabTech
Mestrenova	MestreLab
MS Office	Microsoft
NcBI Datenbank	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Plasmo DB	https://plasmodb.org/plasmo/app
Pro-Data SX	Applied Photophysics
Pro-Data Viewer	Applied Photophysics
ProtParam Tool	https://web.expasy.org/protparam
Reverse-Complement- and Clean-up-Tool	https://www.reverse-complement.com
Serial Cloner	Anibal Costa
SigmaPlot 13.0	Systat Software, Inc.
Spectra Manager	JASCO
Spectrum 6.3.5.	PerkinElmer

2.2 Methoden

2.2.1 Synthesevorschriften

Die im Folgenden beschriebene dreistufige Synthesevorschrift (Abb. 2.2.1) zur Gewinnung von *N*-Boc-Sulfenylamid wurde ursprünglich von Shiau *et al.* beschrieben [165]. Rudraraju *et al.* synthetisierten *N*-Boc-Sulfenylamid als Dipeptid-basierte Modellsubstanz, um die oxidierte Form der PTP1B nachzustellen und somit die nukleophile Bindung des Sulfenylamid-Restes durch strukturell unterschiedliche 1,3-Diketone zu untersuchen [166]. Gupta *et al.* verwendeten für die Synthese des Dipeptids eine Cbz- anstatt einer Boc-Schutzgruppe [66].

Synthese von *N*-Boc-L-Cystin

N-Boc-L-Cystin ((*S*)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-({(*R*)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-2-carboxyethyl}disulfanyl)-propansäure)

L-Cystin (1) (2,45 g, 10 mmol, 1 eq) und NaOH (3,2 g, 80 mmol, 8 eq) wurden in einem Gemisch aus H₂O (80 ml) und 1,4-Dioxan (20 ml) vorgelegt und in einem Wasser-Eis-Bad auf 0 °C gekühlt. Di-*tert*-butyldicarbonat (6,82 g, 30 mmol, 3 eq) wurde innerhalb von 10 min zur gekühlten Reaktionslösung zugegeben. Das Eisbad wurde anschließend entfernt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur (25 °C) für 24 h gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O (100 ml) versetzt und zweimal mit Diethylether (Et₂O, je 75 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl (ca. 75 ml) auf sauren pH eingestellt, dabei fiel ein weißes Präzipitat aus, welches mit Ethylacetat (EtOAc, je 50 ml) aus der wässrigen Phase extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O (50 ml) und NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Rohprodukt *N*-Boc-L-Cystin (2) unter Vakuum weiter getrocknet. Es wurde eine Ausbeute von bis zu 92 % (4,04 g) erreicht. Der Schmelzpunkt lag bei 145,5-147,5 °C, während ein R_f-Wert von 0,24 (2:8, MeOH:DCM) bestimmt wurde. Das reine Produkt wurde weiter

2.2. METHODEN

durch $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie, IR-ATR Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Die Analyseergebnisse sind unten angegeben. (übernommen aus [1], [167])

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz): δ 12,83 (s; 2H), 7,21 (d; $J=8,3$ Hz; 2H), 4,17 (td; $J=9,6$; 4,3 Hz; 2H), 3,10 (dd; $J=13,5$; 4,2 Hz; 2H), 2,88 (dd; $J=13,5$; 10,1 Hz; 2H), 1,38 (s; 18H).

IR-ATR: 3363, 2985, 1755, 1724, 1682, 1684, 1512, 1444, 1415, 1392, 1365, 1340, 1280, 1248, 1165, 1053, 1024, 928, 868, 835, 785, 754 cm^{-1} .

Masse: (ESI-TOF, $[\text{M}^+ \text{Na}]^+$) m/z simuliert ($\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$) Na_2^+ 485,10, gefunden 485,17.

Synthese von *N*-Boc-L-Cystin-L-Valinmethylester

N-Boc-L-Cystin-L-Valinmethylester

((2*S*,2*S'*)-Dimethyl- 2,2-(((2*R*,2*R'*)-3,3-Disulfanediylbis{2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-propanoyl})-bis(azanediyl))bis(3-methylbutanoat))

N-Boc-L-Cystin (2) (441,4 mg, 1 mmol, 1 eq) und L-Valinmethylester (376,1 mg, 2,2 mmol, 2,2 eq) wurden in einem Gemisch aus getrocknetem Dichlormethan (DCM, 10 ml) und getrocknetem Dimethylformamid (DMF, 5 ml) unter N_2 -Atmosphäre, vorgelegt und in einem Wasser-Eis-Bad auf 0 °C gekühlt. Zum gekühlten Reaktionsgemisch wurden nacheinander 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid (EDCI, 422,6 mg, 2,2 mmol, 2,2 eq), 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt, 299,4 mg, 2,2 mmol, 2,2 eq) und NaHCO_3 (185 mg, 2,2 mmol, 2,2 eq) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch für 24 h bei 25 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 1 M HCl (60 ml) versetzt und mit EtOAc (je 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das gewonnene Rohprodukt *N*-Boc-L-Cystin-L-Valinmethylester (3) wurde des Weiteren über eine Silica Gel 60 Säule gereinigt. Als Solventgemisch wurde

2.2. METHODEN

EtOAc:n-Hexan (1:1) verwendet. Es wurde eine Ausbeute von bis zu 49 % erreicht (1,2 g). Der Schmelzpunkt lag zwischen 131,5-134,3 °C. Der R_f -Wert lag bei 0,7 für das Solventgemisch EtOAc:n-Hexan (1:1). Das reine Produkt wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie, IR-ATR Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Die Analyseergebnisse sind unten angegeben. (übernommen aus [1], [167])

$^1\text{H-NMR}$: (DMSO, 400 MHz) δ 8,04 (d; $J=8,3$ Hz; 2H), 7,14 (d; $J=8,5$ Hz; 2H), 4,21 (m; 4H), 3,62 (d; $J=9,8$ Hz; 6H), 3,07 (dd; $J=13,1$; 4,2 Hz; 1H), 2,85 (dd; $J=13,1$; 10,2 Hz; 2H), 2,04 (dd; $J=13,2$; 6,6 Hz; 2H), 1,37 (s; 18H), 0,86 (t; $J=6,2$ Hz; 12H).

IR-ATR: 3338, 2972, 1741, 1685, 1666, 1545, 1516, 1437, 1392.31, 1367, 1311, 1271, 1248, 1209, 1159, 1138, 1043, 1018, 976, 912, 860, 779, 758 cm^{-1} .

Masse: (ESI-TOF, $[\text{M}^+ \text{Na}]^+$) m/z simuliert ($\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}_2$) Na^+ 689,28, gefunden 689,38.

Synthese *N*-Boc-Sulfenylamid

N-Boc-Sulfenylamid

(*S*)-Methyl 2-(*R*)-4-[(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino]-3-oxoiso-thiazolidin-2-yl-3-methylbutanoat (SA)

N-Boc-Cystin-L-Valinmethylester (3) (100 mg, 0,15 mmol, 1 eq) wurde in getrocknetem DCM (5 ml) vorgelegt und mit trockenem Pyridin (0,242 ml, 3 mmol, 20 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde, unter N_2 -Atmosphäre, in einem Kältebad aus 2-Propanol und Trockeneis auf -78 °C gekühlt und für 15 min gerührt. Danach wurde eine ebenfalls auf -78 °C vorgekühlte Lösung von Brom (13,5 μl , 0,27 mmol, 1,8 eq) in getrocknetem DCM langsam über einen Zeitraum von 30 min hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend innerhalb einer Stunde langsam auf 0 °C erwärmt. Danach wurde das restliche Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde weiter über eine Silica Gel 60 Säule gereinigt mit dem Laufmittelgemisch EtOAc:n-Hexan im Mischungsverhältnis 1:1. So konnte reines *N*-Boc-Sulfenylamid (4) mit einer Ausbeute von bis zu

2.2. METHODEN

89 % gewonnen werden. Der Schmelzpunkt lag zwischen 95 und 97 °C und der R_f -Wert lag bei 0,7 für das Solventgemisch EtOAc:n-Hexan im Mischungsverhältnis 1:1. Das reine Produkt wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie, IR-ATR Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Die Analyseergebnisse sind unten angegeben. (übernommen aus [1], [167])

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,30 (s; 1H), 4,68 (d; $J=8,8$ Hz; 1H), 4,58 (s; 1H), 3,90 (m; 1H), 3,76 (m; 3H), 3,38 (t; $J=11,5$ Hz; 1H), 2,22 (ddd; $J=22,1$; 12,1; 7,7 Hz; 1H), 1,46 (s; 9H), 0,96 (m; 6H).

IR-ATR: 3282 (O-H, N-H Valenz), 3010 (C-H Valenz), 2968, 2929, 2869, 1749 (C=O Valenz), 1710 (C=O Valenz), 1671, 1521, 1475, 1452, 1432, 1390, 1365, 1338, 1268, 1249, 1205, 1155, 1116, 1085, 1045, 1018, 950, 927, 877, 844, 821, 802, 790, 761, 692 cm^{-1} .

Masse: (ESI-TOF, $[\text{M}^+ \text{Na}]^+$) m/z simuliert $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5\text{SNa}^+$ 355,1298, gefunden 355,1545 und m/z simuliert $(\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5\text{S})_2\text{Na}^+$ 687,2704, gefunden 687,1358.

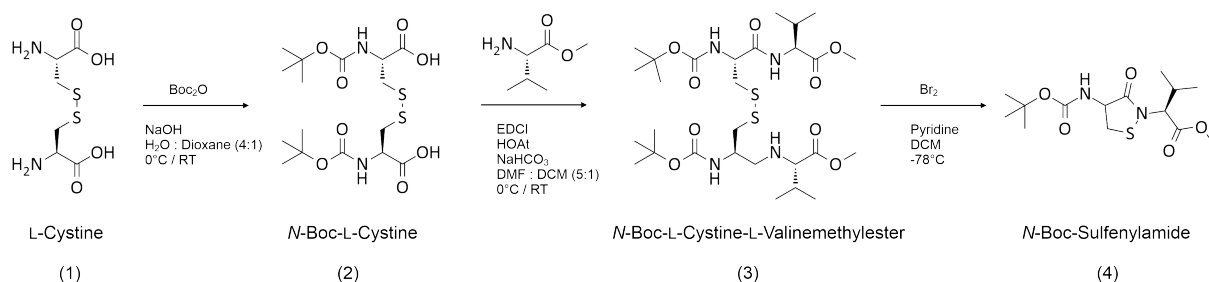


Abbildung 2.1: Synthesemechanismus von *N*-Boc-Sulfenylamid. *N*-Boc-L-Cystin (2) wurde ausgehend von L-Cystin (1) durch schützen der Aminogruppen mit der Boc-Schutzgruppe (Boc_2O) erhalten. Durch Kopplung von (2) mit L-Valinmethylester wurde die Vorstufe der gewünschten Modellsubstanz *N*-Boc-L-Cystin-L-Valinmethylester (3) erhalten. In einer Cyclisierungsreaktion wurde (3) unter Verwendung von Br_2 zu 2 eq *N*-Boc-Sulfenylamid (4) umgewandelt. Abbildung adaptiert aus [167], [1].

Referenzwerte zu Ausbeute, Schmelztemperatur, R_f -Wert, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR und ESI-TOF Charakterisierung für die Substanzen 2, 3 und 4 (Abb. 2.2.1) sind in [166] zu finden.

2.2.2 Analytische Messmethoden

Die folgenden Analytischen Messmethoden wurden bereits in Bischoff *et al.* publiziert und inhaltlich aus [1] übernommen.

Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektren zur Charakterisierung der Syntheseprodukte wurden von Patrick de Martino Fumo (AK Gerhards, Physikalische Chemie, RPTU) gemessen, Dazu wurde das *Spectrum 100* FT-IR Spektrometer mit eingebauter ATR-Messzelle (Attenuated Total Reflection, abgeschwächte Totalreflexion) der Firma Perkin Elmer verwendet. Die Feststoffprobe (ca. 1 mg) wurde zur Messung auf ein diamantbeschichtetes Zinkselenid Fenster in der ATR-Messzelle aufgebracht. Die Auswertung erfolgte mit der Perkin Elmer Software Spectrum 6.3.5.

Schmelzpunktbestimmung

Der Schmelzpunkt wurde an dem Gerät *SPM-x-300* der Firma Müller bestimmt. Dafür wurde die Substanz (ca. 2 mg) in eine Glaskapillare gegeben und langsam geschmolzen. Die Temperatur bei der die Substanz vollständig geschmolzen vorlag wurde als Schmelzpunkt angenommen.

NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-Spektren und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren wurden mit dem NMR-Spektrometer NMR Avance 400 von Bruker gemessen. Alle NMR-Messungen wurden, falls nicht anders erwähnt, bei RT und 400 MHz in deuterierten Lösungsmitteln (siehe Tab. 2.9) durchgeführt. Die ^1H -NMR-Spektren wurden für je 1,5 min gemessen, während die Messzeit für ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren 28,5 min betrug. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind in den Synthesevorschriften 2.2.1, sowie im Anhang bei den jeweiligen Spektren zu finden (Abb. S1, S2, S3).

UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren unter aeroben Bedingungen wurden mit einem Jasco V-650 Spektrophotometer gemessen. Die Temperatur wurde dabei mit einem Julabo F12-ED Kühlthermostat konstant bei 25 °C gehalten. Die anaeroben Messungen wurden an einem SHIMADZU UV-1900 Spektrophotometer ohne Thermostat in einem anaeroben Zelt unter N₂ Atmosphäre mit 5 % H₂ durchgeführt. Vor der Messung wurde das Photometer durch Autozero auf Null gestellt, danach wurde die Küvette mit der Probe in den vorderen Strahlengang und die Referenz in den hinteren Strahlengang gestellt. Die Absorption der Referenzküvette wurde automatisch von der Probenabsorption subtrahiert. Für die Messung wurden die Quarz-Präzisionsküvetten SUPRASIL der Firma Hellma (Typ B. 104B-QS, Schichtdicke 10 mm) mit einem Absorptionsbereich zwischen 200-2200 nm und einem Gesamtvolumen von 0,5 ml gemessen. Für die Messungen wurde der Jasco Spectra Manager und für die Auswertung das Programm Jasco Spectra Analysis verwendet.

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurde eine 1 mM Stammlösung von Sulfenylamid (SA) in Acetonitril (ACN) hergestellt (3,32 mg in 10 ml ACN). Die Substanz ist in ACN stabil, wie zuvor mittels LC-MS nachgewiesen wurde [66]. Die Spektren wurden im Bereich von 200-350 nm gemessen. Um die Löslichkeit von SA in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS 1) (Tab. 2.16) zu gewährleisten, musste 33 % ACN als organisches Lösungsmittel zugegeben werden (siehe Pipettierschema Tab. 2.17). Um die gewünschte Endkonzentration von SA zu erhalten, wurde die 1 mM SA-Stammlösung entsprechend mit ACN verdünnt, sodass der finale Anteil an ACN im Reaktionsgemisch 33 % betrug.

Der PBS-Puffer wurde als letzte Komponente hinzugefügt, da durch den wässrigen Puffer bei pH 7,4 die Hydrolyse gestartet wurde. Unmittelbar nach dem gründlichen Vermischen aller Komponenten in der Küvette, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, wurde das erste UV/Vis-Spektrum gemessen. Danach wurden Spektren im Abstand von 30 s, über einen Zeitraum von 30-60 min gemessen.

2.2. METHODEN

Tabelle 2.16: Zusammensetzung 1x PBS-Puffer (PBS 1) [1].

Komponente	Molare Masse	Konzentration	Einwaage / 1 l
NaCl	58,44 g/mol	140 mM	8,18 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	177,95 g/mol	10 mM	1,78 g
KCl	74,56 g/mol	2,7 mM	0,20 g
KH ₂ PO ₄	136,09 g/mol	1,8 mM	0,24 g

Tabelle 2.17: Pipettierschema der pH-abhängigen Stabilitätsanalyse von SA [1].

Komponente	0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM
SA in ACN (1 mM)	25 µl	50 µl	100 µl
ACN	140 µl	115 µl	65 µl
1x PBS Puffer	335 µl	335 µl	335 µl

Die Gesamtmessdauer wurde an die Hydrolysegeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert angepasst. Die Messungen wurden bei pH 6,4, 6,9, 7,4 und 7,9 des PBS-Puffers durchgeführt. Für jeden pH-Wert wurde die SA-Konzentration zwischen 0,05 und 0,2 mM variiert, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion zu analysieren. Insgesamt wurden technische Triplikate von zwei unabhängigen Experimenten gemessen (n=2x3).

GSH-Dimedon Konkurrenzexperiment mittels HPLC-Analyse

Bei diesem Konkurrenzexperiment wurde die Glutathionsulfensäure GSOH durch tropfenweise Zugabe von H₂O₂ zu einer Lösung von Glutathion (GSH) und Dimedon (Dim) in PBS-Puffer bei pH 7,4 *in situ* gebildet. Anschließend wurde mittels HPLC-Analyse der bevorzugte Reaktionspartner von GSOH ermittelt. Eine Möglichkeit war die Reaktion zum GS-Dimedon Addukt (GSDim), durch Reaktion von GSOH mit Dimedon. Eine weitere mögliche Reaktion war die Bildung des Glutathiondisulfids (GSSG), durch Reaktion der Sulfensäure mit einem weiteren GSH-Molekül. Um die Konkurrenz zwischen GSH und Dimedon zu gewährleisten wurde immer 1 eq GSH mit 0,5 eq H₂O₂ umgesetzt, um nur 0,5 eq GSOH zu bilden. Daher standen 0,5 eq GSH neben Dimedon zur Reaktion mit GSOH zur Verfügung. HPLC-Messungen wurden mit einer Agilent 1100/1200 Bina-

ry Pumpe mittels Umkehrphasenchromatographie unter Verwendung einer Lichrospher 100 RP18, 125 x 4 mm, 5 μm Säule von Macherey-Nagel durchgeführt. Als Lösungsmittel A wurde Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure eingesetzt, Methanol wurde als Lösungsmittel B mit einem Gradienten von 5-55 % verwendet. Die Messzeit betrug 20 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min, gefolgt von einem 6-minütigen Nachlauf zum Spülen der Säule vor der Folgemessung. Das Injektionsvolumen der Probe betrug 20 μl . Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 27 °C durchgeführt. Die Signaldetektion der Retentionszeiten erfolgte bei 210, 220 und 280 nm. Zur Probenvorbereitung wurden 1 eq Glutathion (GSH) und eine variable Menge Dimedon (Dim) in PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst. 0,5 eq H_2O_2 wurde tropfenweise unter Rühren zugegeben, um *in situ* die Glutathionsulfensäure GSOH zu erzeugen. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 25 °C gerührt. Anschließend wurden die Proben ohne weitere Verdünnung mittels HPLC gemessen. Die Dim-Konzentration wurde bei einer konstanten GSH-Konzentration von 2 mM zwischen 1 und 25 mM variiert. Ebenso wurden Endpunktanalysen der Reaktionen für verschiedene GSH-Konzentration zwischen 0,1 und 12,5 mM bei konstantem Dim-Überschuss von 25 mM gemessen. Der H_2O_2 -Anteil entsprach immer 0,5 eq der GSH-Konzentration. Als Referenzmessungen wurden GSH, GSSG und Dimedon als Einzelsubstanzen gemessen, sowie Reaktionsgemische von GSH und Dimedon, GSH und H_2O_2 und Dimedon und H_2O_2 , um mögliche Nebenreaktionen zu erkennen. Die Experimente wurden in unabhängigen Duplikaten gemessen. Zur Bestätigung, dass im Konkurrenzexperiment kein GS-Dim-Addukt gebildet wurde, wurden zusätzliche Auswertungen der Primärdaten vorgenommen. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde die Fläche unter der Kurve des Dimedonsignals aus den Referenzmessungen für 1 mM, 10 mM und 25 mM Dimedon in PBS-Puffer (pH 7,4) bei 220 und 280 nm gegen die Dim-Konzentration aufgetragen. Die Flächen des Dimedonsignals aus den Endpunktmessungen der Dimedontitration wurden zur Kalibriergeraden hinzugefügt. Um die Menge an Dimedon zu quantifizieren, die nach der Endpunktmessung der GSH-Titration in den Proben vorhanden war, wurden basierend auf der Kalibriergeraden aus den Flächen der Dimedon-

Signale die Dimedon-Konzentrationen bei 220 und 280 nm berechnet. Die berechneten Dimedon-Konzentrationen wurden gegen die GSH-Konzentration aufgetragen und lagen entlang einer Parallelen zur x-Achse bei 25 mM Dim. Ein Verbrauch von Dimedon wurde demnach nicht beobachtet. Da eine GS-Dim-Adduktbildung ausgeschlossen werden konnte und somit nur GSSG als Produkt vorlag, wurde in Abbildung die Fläche unter der Kurve des GSSG-Signals bei 210 und 220 nm gegen die H_2O_2 -Konzentration aufgetragen und ein linearer Anstieg festgestellt. Die Probenvorbereitung des Derivatisierungsexperiments wurde ebenfalls wie oben beschrieben durchgeführt. Nach der Übernachtinkubation wurde das Reaktionsgemisch am Folgetag 30 min mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) behandelt.

2.2.3 Kinetischen Analysen

Die folgenden Kinetischen Analysen wurden bereits in Bischoff *et al.* publiziert und inhaltlich aus [1] übernommen.

Kinetische Analyse mittels UV/Vis Spektroskopie

Unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes [168] konnte die SA-Konzentration, die zur kinetischen Analyse benötigt wurde, berechnet werden. Dazu wurde der aus den Triplikaten zweier unabhängiger Experimente ermittelte Extinktionskoeffizient $\epsilon_{249\text{nm}} = 3,24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1], [167] und die zum Zeitpunkt 0 min gemessene Extinktion bei 249 nm verwendet. Zur Bestimmung der Reaktionsordnung wurden der natürliche Logarithmus $\ln [A]$ und der Quotient $1/[A]$ aus der SA-Konzentration bei 249 nm für jeden Messzeitpunkt berechnet. Ist die Reaktion 0. Ordnung, d. h. unabhängig von der Konzentration der beteiligten Reaktanten, so ergibt die Auftragung der Konzentration von SA gegen die Zeit eine Konstante. Trägt man $\ln [A]$ gegen die Zeit auf, so erhält man eine Gerade, deren Steigung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} entspricht, wenn es sich um eine Reaktion erster oder pseudoerster Ordnung handelt. Bei einer Reaktion zweiter Ordnung ergibt die Auftragung der reziproken Konzentration $1/[A]$ gegen die Zeit ebenfalls eine Gerade, deren Steigung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion entspricht. Die kinetische Analy-

se wurde mit dem Jasco Spectra Manager und SigmaPlot 13.0 gemacht. Die kinetische Analyse ergab eine Reaktion pseudoerster Ordnung für deren erste Reaktionsphase ein linearer Zusammenhang beobachtet wurde. Die Steigung des Fits der ersten Reaktionsphase mittels linearer Regression ergab einen pH-abhängigen k_{obs} -Wert. Die k_{obs} -Werte sind unabhängig von der SA-Konzentration [167], daher konnten k_{obs} -Werte des gleichen pH-Werts gemittelt werden.

Kinetische Analyse mittels Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurde ein Bruker amaZon LTD Spektrometer des Arbeitskreises Niedner-Schatteburg verwendet. Die Messungen wurden von Michael Lembach und Maximilian Luczak durchgeführt.

Reaktion von SA und Dim in ACN. Die Reaktion von SA mit Dim, wurde in ACN von Fisher Scientific mit < 30 ppm Wasser (0.57 mM H_2O) bei $\text{pH} \approx 5$ durchgeführt, um die Bildung der Sulfensäure zu vermeiden. Eine 1 mM SA-Stammlösung von SA, sowie eine 1 mM Dim-Stammlösung wurden verwendet, um deren Reaktion zu untersuchen. Die SA-Konzentration wurde konstant bei $0,1$ mM gehalten, während die Dim-Konzentration zwischen $0,05$ mM und $0,25$ mM variiert wurde (Abb. 2.18). Nach gründlichem Mischen wurde die Probe über eine Spritze in das ESI-MS Amazon LTD geleitet und 1 h bei 25 °C kontinuierlich im Kationenmodus gemessen. In einer weiteren Messreihe wurde die Dim-Konzentration konstant bei $0,1$ mM gehalten und die SA-Konzentration in drei Messungen zwischen $0,05$ und $0,2$ mM variiert (Abb.S5, Tab. 2.18).

Bei der Wassertitration (Abb. S5B) wurde die Bildung des Addukts aus $0,1$ mM SA und $0,1$ mM Dim in wasserfreiem ACN (über Molsieb getrocknet, Spuren von Wasser durch Rückstände im ESI-MS Messgerät) und nach Zugabe verschiedener Mengen H_2O zwischen 570 - 950 μM , wie oben beschrieben, gemessen.

Die 60-minütige Messung wurde in 6 Abschnitte von je 10 Minuten unterteilt. Für jeden Zeitabschnitt wurde ein gemittelttes Spektrum erstellt, also 6 Spektren pro Messung.

2.2. METHODEN

Tabelle 2.18: Pipettierschema der massenspektrometrischen Untersuchung der Reaktion von SA und Dim in wasserfreiem ACN [1]

[SA] (mM)	[Dim] (mM)	SA-Stammlösung (µl), (1 mM)	Dim-Stammlösung (µl), (1 mM)	ACN (µl)
0,1	0,05	100	50	850
0,1	0,1	100	100	800
0,1	0,15	100	150	750
0,1	0,2	100	200	700
0,1	0,25	100	250	650
0,05	0,1	50	100	850
0,2	0,1	200	100	700

Für jedes gemittelte Spektrum wurden die Intensitäten der beiden Eduktsignale bei 355 und 687 m/z und der Produktsignale bei 495 und 967 m/z bestimmt. Das Signal bei 827 m/z, das eine Mischform aus einem kovalenten SA-Dim-Addukt und einem weiteren SA-Molekül, beides an Na⁺-koordiniert darstellt, wurde zu gleichen Teilen (je 50 %) dem Edukt- und dem Produktsignal zugeordnet. Die Summe der Intensitäten aller vier Signale wurde als 100 % angenommen. Die prozentualen Anteile der Eduktsignale wurden für jeden Zeitabschnitt addiert, das Gleiche wurde mit den Produktsignalen gemacht. Die prozentuale Produktbildung wurde dann gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Die Daten wurden exponentiell gefittet (exponential rise to maximum, 1 Parameter). Die Kurvensteigung entspricht den k_{obs} -Werten der Reaktionen (Abb. 3.5B). Es wurden drei unabhängige Replikate gemessen. Die Datenpunkte jedes Zeitabschnitts wurden über alle Replikate gemittelt und die Standardabweichung (SD) berechnet. In einem Sekundärplot wurden die k_{obs} -Werte gegen die Dim-Konzentration aufgetragen und durch lineare Regression gefittet. Die Steigung der Geraden entspricht der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung (Abb. 3.5C).

Reaktion der Sulfensäure von SA mit Dim in 33 % ACN und 67 % PBS. Die Geschwindigkeit der Reaktion von SA bzw. der *in situ* geformten Sulfensäure und Dim in wässriger Lösung aus 33 % ACN und 67 % PBS pH 7,4 ist bereits literaturbekannt [66]. Die Kinetik der Reaktion wurde zusätzlich massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden aus der ablaufenden Reaktion, zu den angegebenen Zeitpunkten (Abb. S7A), Proben entnommen, 1:10 mit ACN verdünnt und direkt für 60 s gemessen. Die Intensität des entstehenden Adduktsignals wurde aus den gemittelten Massenspektren bestimmt und gegen die Zeit der Probenentnahme aufgetragen (Abb. S7A). Die Steigungen der exponentiellen Fits (exponential rise to maximum) ergab die k_{obs} -Werte der Messungen. Die Reaktion wurde für eine konstante SA-Konzentration von 0,1 mM und Dim-Konzentrationen zwischen 0,5 und 2,0 mM in 33 % ACN (enthält 570 μM H_2O) und 67 % PBS1 pH 7,4 durchgeführt. Die k_{obs} -Werte aus Panel A wurden gegen die entsprechende Dim-Konzentration aufgetragen und mittels linearer Regression gefittet. Die Steigung der Geraden ergab die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, die mit einem Wert von $k=15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vergleichbar zum literaturbekannten Wert von $k=12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [160] ist (Abb. S7B).

Fragmentierungsexperiment. Um die Bildung kovalenter Addukte zwischen Dimedon und SA bzw. der Sulfensäure nachzuweisen, wurden Fragmentierungen der Ausgangssignale bei 495 m/z (Monomer aus SA-Dim koordiniert an Na^+) und 967 m/z (Dimer aus SA-Dim koordiniert an Na^+) in ACN (enthält 0.57 mM H_2O) durchgeführt. Die Ausgangssignale wurden im Kationenmodus isoliert und durch Anlegen einer Spannung von 1 V fragmentiert. Die resultierenden Signale und Fragmentationsmuster sind in Abbildung S6 dargestellt.

Ringöffnungsreaktion von SA in PBS2 ohne K^+ -Ionen und ACN. Zur massenspektrometrischen Untersuchung des Reaktionsverlaufs von 0,1 mM SA in 33 % ACN und 67 % PBS-Puffer pH 7,4 wurden dem Reaktionsgemisch 0, 4, 8, 11, 16, 24 und 30 min nach Beginn der Hydrolyse je 100 μl entnommen. Diese wurden schnellstmöglich 1:10 mit

2.2. METHODEN

Acetonitril auf 10 μM verdünnt bei 25 $^{\circ}\text{C}$ für 1 min im Kationenmodus gemessen. Für die Messungen wurde PBS-Puffer ohne K^+ -Ionen (PBS2, Tab. 2.19 verwendet. Als Referenz wurde ein Spektrum von PBS2 ohne SA gemessen, um Puffersignale von Reaktionssignalen zu unterscheiden.

Tabelle 2.19: 1x PBS-Puffer ohne K^+ -Ionen (PBS2). Für eine identische Ionenstärke zu PBS1 wurden KCl und KH_2PO_4 durch eine angepasste Mengen an NaCl und $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ ersetzt [1].

Chemikalie	Molare Masse	c	Einwaage/ 1 l
NaCl	58,44 g/mol	141,8 mM	8,34 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	177,95 g/mol	10,0 mM	1,78 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	138,00 g/mol	1,8 mM	0,25 g

Kinetische Analysen mittels Stopped-flow Spektroskopie

Sehr schnell ablaufende Reaktionen zwischen SA, GSH und Dimedon wurden mittels Stopped-Flow Absorptionsmessungen an einem Applied Photophysics SX-20 Spektrometer bei 25 $^{\circ}\text{C}$ untersucht.

Die Absorptionsänderung wurde bei 249 nm in einer Zeitspanne von 50 s gemessen. Für die ersten 2 s wurde die Messfrequenz auf 10000 Datenpunkte erhöht, da die ersten Millisekunden für die Bestimmung der kinetischen Rate entscheidend sind. Für die restlichen 48 Sekunden wurde die Anzahl der Datenpunkte auf 2000 reduziert. Jede Messung wurde in technischen Triplikaten gemessen und gemittelt. Als Messsoftware wurde das Programm Pro Data SX und für die Auswertung der Pro Data Viewer verwendet.

Reaktion zwischen SA und GSH in 50 % ACN und PBS1 50 %. Zunächst wurde die Absorption bei 249 nm für die Reaktion zwischen 100 μM SA und 50-500 μM GSH in 50 % ACN und 50 % PBS bei pH 7,4 untersucht. SA in Spritze 1 wurde in ACN gelöst, während GSH, gelöst in PBS pH 7,4, sich in Spritze 2 befand. Da die Reagenzien in der Reaktionskammer immer im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, war die Konzentration der Reaktionspartner in der Spritze immer doppelt so hoch, wie die gewünschte, angegebene.

ne Endkonzentration. Damit Absorptionsänderung bei 249 nm ausschließlich auf SA und nicht auf GSH zurückzuführen ist, wurden die Messwerte um die Absorption von GSH in 50 % ACN und 50 % PBS, in Abwesenheit von SA, korrigiert. Die SA-Absorption wurde anschließend zur Konzentration umgerechnet und halblogarithmisch gegen die Zeit in s aufgetragen. Zur kinetischen Analyse wurde die erste Reaktionsphase durch lineare Regression gefittet, um die zugehörigen k_{obs} -Werte zu bestimmen. Eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung wurde, für zwei unabhängige Replikate, durch Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die GSH-Konzentration aus der resultierenden Geradensteigung ermittelt (Abb. 3.6B).

Eine weitere Referenzmessung wurde mit den verwendeten Lösungsmitteln ACN und dem PBS-Puffer durchgeführt, um mögliche Lösungsmittelleffekte, wie Fällung oder Unlöslichkeit auszuschließen. Zusätzlich wurde die Ringöffnung von SA in ACN und PBS-Puffer bei pH 7,4 in Abwesenheit von GSH gemessen, die um die Referenzwerte von Acetonitril und PBS-Puffer korrigiert wurde.

Kompetitionsreaktion zwischen SA, GSH und Dim. Für das Konkurrenzexperiment mittels Stopped-flow Analyse zwischen SA, GSH und Dim wurden wie oben beschrieben folgende Negativkontrollen gemessen: 1,0 mM GSH in PBS und ACN, 0,1 mM Dim in ACN und PBS, 0,1 mM Dim in ACN und 1,0 mM GSH in PBS. Zudem wurde die Reaktion von 0,1 mM SA in ACN und PBS, sowie die Reaktion von 0,1 mM SA in ACN und 0,1 mM Dim in PBS gemessen. Auch die Reaktion zwischen 0,1 mM SA in ACN und 1,0 mM GSH in PBS in Abwesenheit von Dim wurde analysiert. Zwischen Dim und GSH wurde keine Reaktion beobachtet. Daher wurden für das Konkurrenzexperiment diese beiden Komponenten in PBS gelöst und zusammen in Spritze 2 gegeben und mit SA in ACN in Spritze 1 gemessen (Abb. 3.6C). Für alle genannten Proben wurde jeweils ein Absorptionsspektrum zwischen 200 und 350 nm gemessen, sowie ein Absorptionsspektrum bei 249 nm unter oben genannten Parametern (Abb. 3.6C).

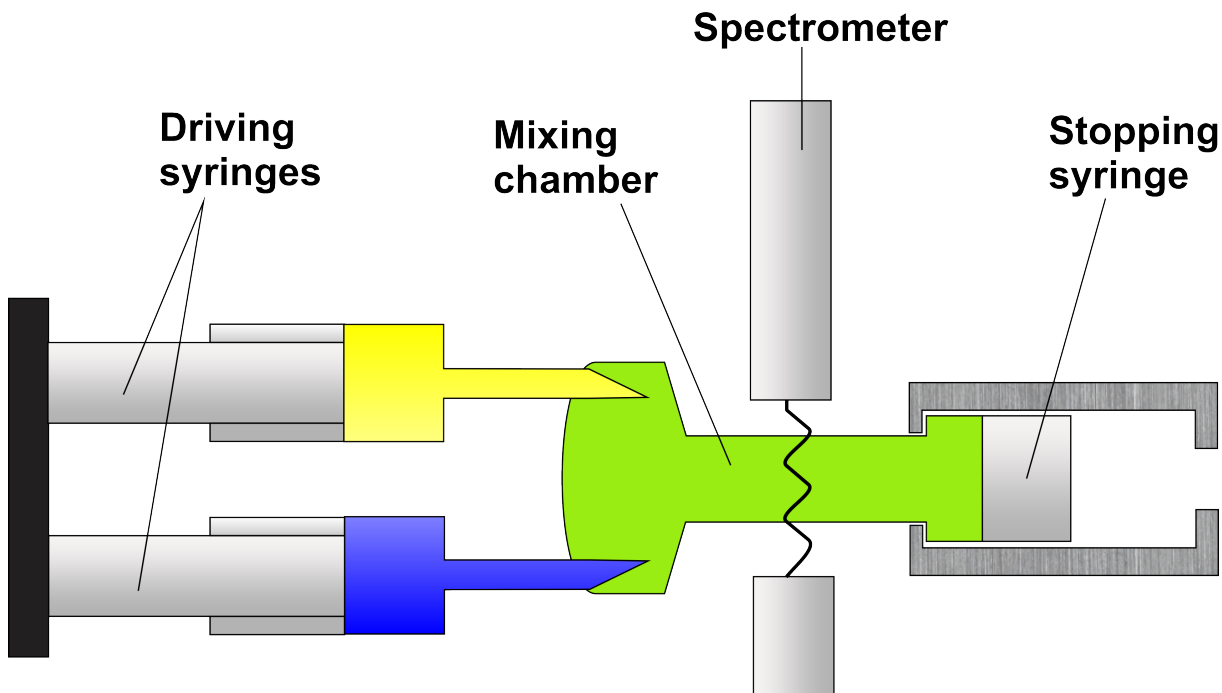


Abbildung 2.2: Prinzipieller Aufbau der Stopped-flow Apparatur. Die Stopped-flow-Methode dient zur kinetischen und mechanistischen Analyse sehr schneller Reaktionen. Die Reaktanden befinden sich zu Beginn in zwei voneinander getrennten Spritzen (Driving syringes, gelb und blau). Diese werden in der Mischkammer (Mixing chamber, grün) zusammengeführt und durch eine Stoppspritze (Stopping syringe) abrupt abgebremst, wodurch die Reaktion gestartet wird. Die Messung der Absorption oder Fluoreszenz (Spectrometer) wird direkt mit dem Mischvorgang gestartet, wobei nur eine geringe Totzeit von 2 ms entsteht.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau (Tab. 2.20) wurde durchgeführt, um benötigte Überhänge an DNA-Fragmenten für die nachfolgende Ligation zu erzeugen oder, um in einem analytischen Restriktionsverdau (Tab. 2.21) die Korrektheit eines Plasmids nach Klonierung zu prüfen. Der Restriktionsverdau wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente, wie zuvor beschrieben, durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.4). Zur Isolierung eines DNA-Fragments, wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.4). Bei einem analytischen Restriktionsverdau wurden manchmal auch 3 Restriktionsenzyme verwen-

2.2. METHODEN

det, um ein eindeutigeres Ergebnis bezüglich der Korrektheit des Plasmids zu erhalten. Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen. Der Puffer wurden so gewählt, dass alle verwendeten Restriktionsenzyme die maximale Aktivität von 100 % aufwiesen.

Tabelle 2.20: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs für einen Restriktionsverdau

Komponente	50 µl Ansatz
Plasmid	1 µg
Restriktionsenzym 1	1 µl (20 units/ml)
Restriktionsenzym 2	1 µl (20 units/ml)
rCutSmart Puffer (10x)	5 µl (1x)
ddH ₂ O (nukleasefrei)	auf 50 µl auffüllen

Tabelle 2.21: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs für einen analytischen Restriktionsverdau

Komponente	50 µl Ansatz
Plasmid	0,5 µg
Restriktionsenzym 1	0,5 µl (10 units/ml)
Restriktionsenzym 2	0,5 µl (10 units/ml)
Restriktionsenzym 3 (optional)	0,5 µl (10 units/ml)
rCutSmart Puffer (10x)	5 µl (1x)
ddH ₂ O (nukleasefrei)	auf 50 µl auffüllen

Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente ihrer Größe nach auf-trennen. Die Agarose (1 % oder 2 % (w/v)) wurde in TAE-Puffer vorgelegt und durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Danach wurde GelRed in der Verdünnung 1:10000 hinzu-gegeben und die Flüssigkeit in eine horizontale Gelkammer etwa 3-5 mm dick ausgegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in ein horizontales Gelelektrophorese-Gerät gesetzt und mit TAE-Puffer aufgefüllt. Dann wurde das Gel mit den zu analysierenden Proben beladen (5-10 µl pro Geltasche), die zuvor durch 6x Gel Loading Dye Purple/-Orange beschwert wurden. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurde entweder die Quick Load

2.2. METHODEN

1 kb DNA Ladder oder die 100 bp DNA Ladder von NEB als Marker verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 90-120 V für 30-60 min. Die Banden der DNA-Fragmente konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht und analysiert werden.

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

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Nach einem Restriktionsverdau wurde das Reaktionsgemisch auf einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem Wizard SV Gel und PCR *Clean-Up* System aufgereinigt und konnte bei -20 °C gelagert werden.

Ligation

Durch Restriktionsverdau an gleichen Schnittstellen konnten an einem DNA-Fragment und einem Plasmid identische Überhänge erzeugt werden. Das einzufügende DNA-Fragment (Insert) konnte durch Ligation mit der T4 DNA Ligase mit dem Plasmid zusammengefügt werden. Ligationen wurden für 2 h bei RT durchgeführt. Die Zusammensetzung einer Ligation kann Tabelle 15 entnommen werden.

Tabelle 2.22: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs zur Ligation von DNA-Fragmenten

Komponente	20 µl Ansatz
T4 DNA Ligase	1 µl
T4 Ligase Puffer (10x)	2 µl (1x)
Vektor	1-10 ng
Insert	1-10 ng
ddH ₂ O (nukleasefrei)	auf 20 µl auffüllen

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA verwendet. Sie wurden aus *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*-Zellen) durch die hier beschriebene Vorbehandlung gewonnen. In einer Vorkultur wurden 10 ml LB-Medium mit einem Aliquot chemisch kompetenter Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 170 rpm kultiviert. Am Folgetag wurden 500 ml LB-Medium mit 4 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 20 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (2600 x g, 15 min, 4 °C), der Überstand entfernt und das Pellet in 150 ml eisgekühltem TF1-Puffer resuspendiert und 15 min in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2600 x g, 15 min, 4 °C) wurden die Zellen in 10 ml eisgekühltem TF2-Puffer resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots der chemisch kompetenten Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und 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, steril filtrieren (0,22 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, steril filtrieren (0,2 µm Filter)

Transformation, Kultivierung und Selektion von *E. coli*

Plasmide wurden in XL1-Blue chemisch kompetenten Zellen vervielfältigt. Dazu wurden 3-5 µl Plasmid aus aufgereinigter Plasmid-DNA oder Ligation mit 30-50 µl chemisch kompetenten XL1-Blue Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock für exakt 90 s bei 42 °C durchgeführt und die Zellen sofort für 5 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in der 10-fachen Menge vorgewärmtem LB-Medium resuspendiert und 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 50 µl entfernt. Die Zellen wurden im Restvolumen resuspen-

diert und vollständig auf der LB-Agarplatte ausgestrichen. Zur Selektion der Zellen mit pHBIRH Plasmiden wurden Agarplatten mit Ampicillin (Amp, 100 µg/ml) als Antibiotikum verwendet. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und je nach Wachstum der Kolonien nach 16-18 h herausgenommen und bei 4 °C gelagert.

Plasmid-DNA-Isolierung

Zur Isolierung der Plasmide wurde eine Mini-Übernacht-Kultur vorbereitet. Dazu wurde eine einzelne Kolonie der transformierten *E-coli*-Zellen, die die entsprechende Plasmid-DNA enthalten gepickt und damit 5 ml LB-Medium mit Ampicillin als Antibiotikum (Verdünnung 1:1000, 100 µg/ml) angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm in einem MaxQ4450 Schüttelinkubator kultiviert. Zur Aufreinigung wurden 2 ml der Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (13000 x g, 30 s, 4 °C). Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Zellpellet in 100 µl eisgekühltem Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Puffer P2 zugegeben und zur Zellyse fünfmal vorsichtig invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Puffer P3 und erneutem 5-maligem Invertieren wurde der pH-Wert neutralisiert. Unerwünschte genomische DNA und andere Zellfragmente wurden präzipitiert und durch Zentrifugation (13000 x g, 10 min, 4 °C) vom Überstand getrennt. Die Plasmid DNA wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 600 µl 2-Propanol durch 5-maliges Invertieren präzipitiert und zentrifugiert (13000 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde unter Rotlicht für ca. 1 h getrocknet und in 30 µl ddH₂O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

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

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

Puffer P3 1,8 M KAc, pH=5,2 (Essigsäure)

2.2. METHODEN

Vereinzelt wurde zur Plasmid DNA-Isolierung auch das QIAprep Spin MiniPrep Kit von QIAGEN für Mini-Übernacht Kulturen benutzt. Für Midi Übernachtskulturen wurde ausschließlich das QIAprep MidiPrep Kit von QIAGEN verwendet. Beide Kits wurden nach Hersteller-Protokoll eingesetzt.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Thermo Scientific NanoDrop One^c bestimmt. Das Gerät ermittelt die Konzentration durch die Absorption bei 280 nm. Die Qualität wird durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm (A_{260}/A_{280}) berechnet und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch Sanger Sequenzierung von Microsynth Seqlab GmbH durchgeführt. Das zugehörige Pipettierschema ist in Tabelle 2.23 dargestellt.

Tabelle 2.23: Pipettierschema für Sequenzierungen

	Volumen
Primer (1:20)	6 μ l
DNA	2 μ l (ca. 80 ng/ μ l)
ddH ₂ O	4 μ l
total	12 μ l

Klonierungsstrategie

Ausgehend von den bereits vorhandenen pUC57-Simple Plasmiden (Tab. 2.4) wurden ausschließlich die in dieser Arbeit selbst ausgeführten Klonierungsschritte beschrieben. Der pUC57-Simple-Vektor besitzt einen Ampicillin-Resistenzmarker, womit eine Selektion auf das gewünschte Plasmid bei einer Übernacht-Kultur oder einer Transformation in XL1-Blue kompetenten *E. coli*-Zellen möglich ist. Zur Transfektion in *P. falciparum* ist der pUC57-Simple-Vektor ungeeignet.

2.2. METHODEN

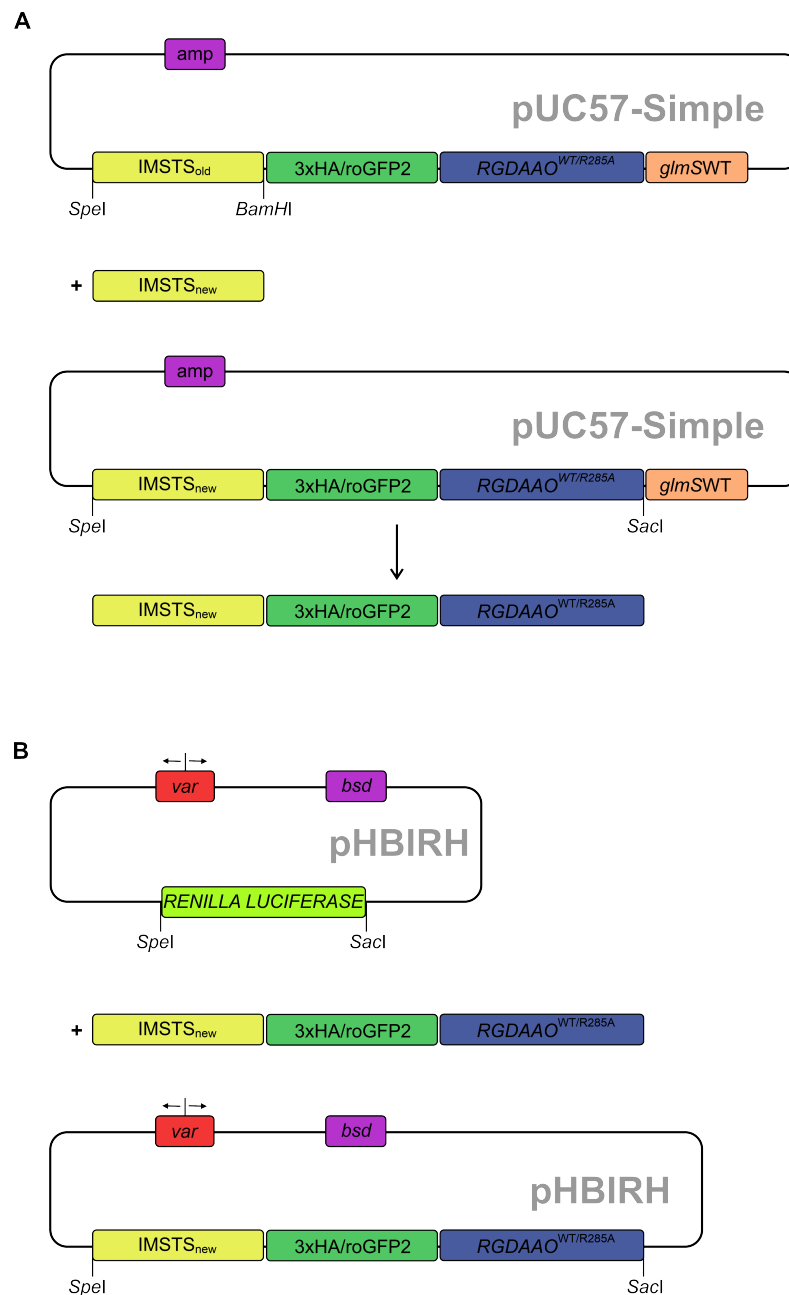


Abbildung 2.3: Klonierungsstrategie zum Austausch der IMS-Zielsequenz. A) Die Klonierung beginnt im pUC57-Simple-Vektor durch Verdau des Plasmids mit *SacI* und *BamHI*, wodurch IMS_{old} entfernt wurde. IMS_{new} wurde in den pUC57-Simple-Vektor ligiert und das Modul bestehend aus IMS_{new} , 3xHA- oder roGFP2-Tag und $RGDAAO^{WT}$ bzw. $RGDAAO^{R285A}$ mittels Restriktionsverdau mit *SpeI* und *SacI* aus dem Vektor herausgeschnitten. B) Aus dem pHBIRH-Vektor wurde das Gen codierend für die Renilla-Luciferase durch Verdau mit *SpeI* und *SacI* entfernt und mit dem Modul aus A zum gewünschten Plasmid ligiert.

Daher wurde das benötigte Modul bestehend aus der neuen Zielsequenz, dem Tag und dem

2.2. METHODEN

$RGDAAO^{WT}$ - bzw. $RGDAAO^{R285A}$ -Gen durch die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *SacI* ausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 2.3A). Zur Transfektion in den *P. falciparum* 3D7 WT Stamm wurde für alle Konstrukte der pHBIRH-Vektor verwendet (Abb. 1.7) der im zweiten Schritt (Abb. 2.3B) mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SacI* verdaut wurde, um das *RENILLA LUCIFERASE*-Gen zu entfernen. Abschließend wurde das Modul aus dem pUC57-Simple-Vektor mittels Ligation in den pHBIRH-Vektor eingefügt. Auf diese Weise wurden vier neue Konstrukte generiert: IMS 3xHA $RgDAAO^{WT}$, IMS 3xHA $RgDAAO^{R285A}$, IMS roGFP2 $RgDAAO^{WT}$ und IMS roGFP2 $RgDAAO^{R285A}$. In dieser Arbeit werden nur Experimente mit 3xHA-Konstrukten gezeigt. Die roGFP2-Konstrukte mit neuer IMS-Zielsequenz wurden kloniert (Tab. 2.4) und korrekt sequenziert (siehe Anhang: 4.2.4), aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verwendet. Der allgemeine Aufbau der Konstrukte ist in Abbildung 2.4 gezeigt.

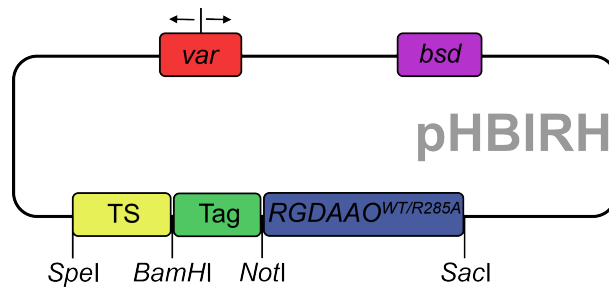


Abbildung 2.4: Aufbau der pHBIRH-Konstrukte. Der pHBIRH-Vektor verfügt über das *var*-Intron (rot), einen bidirektionalen Promotor, der es erlaubt beides mit nur einer Expressionskassette zu exprimieren, das Transgen (dunkelblau), hier *RGDAAO* und den Selektionsmarker, hier Blasticidin-*S*-Deaminase (*bsd*, lila). Die Transkription des Gens *RGDAAO* ist über *bsd* konzentrationsabhängig titrierbar ([154]). In Form eines modularen Aufbaus besitzen die pHBIRH-Konstrukte in der Regel eine Zielsequenz (TS, gelb), einen 3xHA-/oder roGFP2-Tag (grün) und das Gen $RGDAAO^{WT}$ bzw. $RGDAAO^{R285A}$ codierend für das heterologe Redoxenzym $RgDAAO^{WT}$ bzw. für die inaktive Form des Enzyms $RgDAAO^{R285A}$. Begrenzt wird das Modul durch die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *SacI*.

Der pHBIRH-Vektor enthält das Blasticidin-*S*-Desaminase-Gen (*bsd*) als Selektionsmarker und einen bidirektionalen Promotor, das *var* Intron aus *P. falciparum*. Eingeschlossen von den Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *SacI* befindet sich ein modularer Plasmidabschnitt bestehend aus der Zielsequenz (TS), dem Tag (3xHA oder roGFP2) und dem Gen codierend für das heterologe Enzym (*GOI*). Die Zielsequenz wird abgegrenzt durch

2.2. METHODEN

die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *BamHI*, der Tag von *BamHI* und *NotI*, das *GOI* wiederum durch *NotI* und *SacI*. Für das Cytosol wurde keine Zielsequenz angehängt. Um das gebildete Redoxenzym *RgDAAO* in die Verdauungsvakuole einzuschleusen, wurde die Zielsequenz von Plasmepsin IV verwendet. Plasmepsin IV ist eine Protease in der Verdauungsvakuole, die Hämoglobin spaltet [162], [169], [170]. Für die mitochondriale Matrix wurde die *N*-terminale Präsequenz des Hitzeschockproteins 60 verwendet, welches in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist [171] [63]. Die Dihydroorotatdehydrogenase ist ein mitochondriales Enzym, welches in *P. falciparum* an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Es wurde zuerst als Zielsequenz für den mitochondrialen Intermembranraum verwendet. Als neue IMS-Zielsequenz wurde die mitochondriale NADH-Cytochrom *b5*-Reduktase eingesetzt. Als Tag wurde ein 3xHA- oder roGFP2-Tag verwendet. Für die Konstrukte ohne Zielsequenz Cyto *RgDAAO*^{WT/R285A} ist der Tag *N*-terminal, wohingegen er für die anderen Konstrukte zwischen Zielsequenz und *RGDAAO*^{WT} bzw. *RGDAAO*^{R285A} lokalisiert war. *RGDAAO*^{WT/R285A} war das zu exprimierende Transgen. Die Konstrukte mit inaktiver *RgDAAO* (durch Einführen einer Punktmutation des Arginin Restes 285 zu Alanin) wurden als optimale Negativkontrollen mit Zielsequenzen für alle Kompartimente kloniert. Durch Verwendung des pHBIRH-Vektors wurde ein titrierbares System erhalten, in dem die gebildete Enzymmenge der *RgDAAO* in Abhängigkeit von der Blasticidin-Konzentration [154] gesteuert werden konnte. In dieser Arbeit werden nur Experimente mit Stämmen gezeigt, die Konstrukte mit 3xHA-Tag enthalten. Die verwendeten Restriktionsenzyme, die Ligase (Tab. 2.13) und entsprechende Puffer (Tab. 2.9), sowie die Zusammensetzung von Restriktionsverdau (Tabellen: 2.20, 2.21) und Ligation (Tab. 2.22) sind im Material und Methodenteil (Abschnitte: 2.2.4, 2.2.2) zu finden.

2.2.5 Biochemische Methoden

Polyacrylamid-Gele und SDS-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteingemische ihrer Größe nach aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden 10 %ige Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von *P. falciparum*-Lysaten verwendet. Wie bereits beschrieben wurden die *P. falciparum* Proben nach der Magnetsäulenisolierung 1:5 mit 5x Lämmli-Puffer mit 500 mM DTT verdünnt, 5 min bei 95 °C gekocht und bei -80 °C gelagert. Die *P. falciparum*-Lysate wurden vorm Beladen erneut 5 min bei 95 °C aufgeköcht und danach für 2-3 min bei 15000 rpm (21380 x g) zentrifugiert. Pro Geltasche wurden abhängig von der Parasitendichte 5-12,5 µl des Lysatüberstands geladen, angepasst an die Parasitenzahl/µl der Probe. Dadurch, dass nur der Überstand geladen wurde, konnten unspezifische Banden von Proteinen aus dem Zellpellet im späteren Westernblot vermindert werden. Als Marker wurde der Color Protein Standard verwendet. Nach dem Beladen des Gels wurden die Proben bei 200 V und 25 A pro Gel für 1 h bei RT aufgetrennt und danach einmal in ddH₂O gewaschen.

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

Trenngel 10 %: 4 ml ddH₂O, 3,0 ml 30 % Acrylamid Mix, 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8), 0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,004 ml TEMED

Sammelgel 5 %: 1,4 ml ddH₂O, 0,33 ml 30 % Acrylamid Mix, 0,25 ml Sammelgelpuffer (1 M Tris, pH 6,8) 0,02 ml 10 % SDS, 0,02 ml 10 % APS, 0,002 ml TEMED

Magnetsäulen-Isolierung von *P. falciparum*

Die zu isolierende Kultur mit hoher Parasitämie > 5 % wurde mit 5 % D-Sorbitol synchronisiert [172] und zeitnah auf eine 40 ml Kultur vergrößert. An Tag 1 oder 3 nach der Synchronisation konnte die Magnetsäulenisolierung durchgeführt werden, nämlich dann,

2.2. METHODEN

wenn sich die Parasiten bei hoher Parasitämie im Trophozoiten bzw. Schizontenstadium befanden. Nur diese Stadien des Parasiten enthalten eisenhaltiges Hämозoin, wodurch es möglich war die Parasiten mittels einer Magnetsäule zu isolieren und anzureichern. Zunächst wurde die Magnetsäule über den Dreiwegehahn mit incomplete RPMI-Medium gespült, bis das autoklavierte, entgaste ddH₂O, in dem die Säule gelagert wurde, vollständig ausgespült war. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zu keinem Zeitpunkt Luftblasen in der Spritze oder der Magnetsäule bildeten. Die Säule wurde anschließend in den Vario MACS Magneten eingespannt und mindestens 5 min mit vollständigem RPMI-Medium äquilibriert. Die 40 ml Kultur wurde resuspendiert und sukzessive auf die Magnetsäule aufgetragen, dabei durfte die Säule niemals trocken laufen. Der Dreiwegehahn war nur so weit geöffnet, dass die Fließgeschwindigkeit 1 Tropfen/s betrug. Nachdem die Kultur die Säule durchlaufen hatte, wurde nochmals mit 20 ml incomplete RPMI-Medium gespült und der Dreiwegehahn geschlossen. Der Durchlauf wurde in einem Abfallgefäß unter der Säule gesammelt und verworfen. Die Magnetsäule wurde aus dem Magnetfeld genommen und die Parasiten wurden mit 14 ml incomplete RPMI-Medium bei maximaler Durchlaufgeschwindigkeit eluiert. Die Magnetsäule wurde danach zunächst mit 20 ml incomplete RPMI-Medium gespült und war damit für eine weitere Extraktion äquilibriert. Abschließend wurde die Säule mit 50 ml autoklaviertem, entgastem ddH₂O gespült und in Gleichem gelagert. Das Eluat wurde für 10 min bei RT und 755 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Direkt aus dem Pellet wurden 2 µl entnommen und in 5 µl PBS-Puffer auf einem Objektträger ausgestrichen und mit Giemsa angefärbt. Dies diente zur Kontrolle der Parasitämie. Das restliche Pellet wurde in 80 µl PBS-Puffer mit Protease Inhibitor resuspendiert und 1 µl der Zellsuspension wurde 1:500 mit PBS-Puffer gemischt, um die Parasitenzahl in einer Neubauer Kammer zu bestimmen. Der Rest der Zellsuspension (80 µl) wurde mit 5x Lämmli-Puffer (20 µl) versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht. Der Lämmli-Puffer enthielt zusätzlich 500 mM DTT (7,36 mg/100 µl). Das Lysat wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

PBS-Puffer: PBS-Puffer mit einer cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor-Tablette pro 50 ml PBS-Puffer, pH=7,4

Westernblot

Die durch Magnetsäulenisolierung gewonnenen Lysatproben mussten zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Dabei wurden, basierend auf Zählungen in der Neubauer Kammer pro Lysatprobe jeweils 3×10^7 Parasiten geladen. Das Acrylamidgel wurde kurz in ddH₂O gewaschen und anschließend in einem Wet-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert um die Hydrophobizität zu reduzieren und anschließend zusammen mit Fibre Pads, Filterpapier und Acrylamidgel in Blotting Puffer äquilibriert. Dann wurde die Blotting Kammer in der Halterung aus einem Fibre Pad, zwei Filterpapieren (Whatman Papier), dem Acrylamidgel, der PVDF-Membran und erneut zwei Filterpapieren zusammengesetzt und die Luftblasen entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass die Membran in Richtung Kathode und das Acrylamidgel Richtung Anode ausgerichtet war. Es wurde 1,5 h bei RT, 200 V und 200 mA je Gel geblottet. Die Blotting Kammer wurde vorsichtig auseinander gebaut und die Membran einmal mit ddH₂O gewaschen, wobei die proteinbehaftete Seite der Membran nach oben gerichtet war. Das Acrylamidgel wurde entsorgt. Anschließend wurde die Membran 1 min mit Ponceaulösung angefärbt, kurz mit ddH₂O gewaschen bis der Hintergrund entfärbt war und danach eingescannt. Dann wurde die Membran auf einer Schüttelplattform 1 h in TBS gewaschen und anschließend eineinhalb Stunden in 5 % Blocking Lösung (30-50 ml) geschüttelt.

Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C im Schüttler. Am Folgetag wurde die Membran zweimal je 10 min in TBST-TT gewaschen, sowie 1 mal 10 min in TBS. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls 1 h bei 4 °C im Schüttler. Die Membran wurde danach noch 1 mal 10 min in TBS und zweimal je 10 min in TBS-TT gewaschen und anschließend wieder in TBS überführt. Danach wurde ein Bild des Westernblots mit dem ECL Chemostar aufgenommen. Die Chemilumineszenz

2.2. METHODEN

wurde durch die Entwicklerlösungen 1 und 2 erzeugt, die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt wurden. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 30 s und 1 min.

10x Blotting Puffer (1 l): 247,6 mM Tris-Base, 1,93 M Glycerin in ddH₂O

1x Blotting Puffer (1 l): 10 % (v/v) 10x Blotting Puffer,
20 % (v/v) Methanol in ddH₂O

Ponceau-Lösung: 0,1 % (w/v) Ponceau S, 1 % (v/v) acetic acid in ddH₂O

TBS-Puffer: 20 mM Tris Base, 150,58 mM NaCl, pH 7,4 (HCl) in ddH₂O

TBS-TT: 20 mM Tris Base, 150,58 mM NaCl, 0,2 % Triton X-100, 0,05 % Tween20, pH 7,4 (HCl) in ddH₂O

Blocking Puffer: 5 % Milchpulver in TBS-Puffer

Chemilumineszenz Entwicklerlösung 1 (ECL Tom I): 40 ml ddH₂O, 5 ml 1 M Tris pH 8,5, 0,5 ml Luminol, 0,22 ml p-Cumarinsäure, ddH₂O auf 50 ml auffüllen

Chemilumineszenz Entwicklerlösung 2 (ECL Tom II): 40 ml ddH₂O, 5 ml 1 M Tris pH 8,5, 30 µl 30 % H₂O₂, ddH₂O auf 50 ml auffüllen

Luminol-Stammlösung: 0,44 g Luminol in 10 ml DMSO

p-Cumarinsäure: 0,15 g in 10 ml DMSO

2.2.6 *Plasmodium falciparum* Zellkultur und Charakterisierung

Auftauen von *P. falciparum* Kulturen

Das Cryo-Vial mit bis zu 1 ml Plasmodienkultur, wurde dem Lagertank mit flüssigem Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C vollständig aufgetaut. Die Kultur wurde in ein 15 ml Falcon überführt und anschließend tropfenweise mit 0,2 Volumenanteilen von Auftaulösung 1 behandelt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach jedem Tropfen wurde das Falcon vorsichtig geschüttelt. Als nächstes wurden 10 Volumenanteile von Auf-

taulösung 2 ebenfalls tropfenweise zur Kultur zugegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde tropfenweise mit 10 Volumenanteilen Auftaulösung 3 behandelt und erneut zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit vollständigem RPMI-Medium gewaschen. In einer frischen Petrischale wurden 7 ml vollständiges RPMI-Medium vorgelegt und das Zellpellet in weiteren 6,5 ml vollständigem RPMI-Medium resuspendiert und in die Petrischale überführt. Die Blutmenge wurde auf 500 µl angepasst.

Auftaulösung 1: 12 % (w/v) NaCl

Auftaulösung 2: 1,6 % (w/v) NaCl

Auftaulösung 3: 0,9 % (w/v) NaCl, 0,2 (w/v) Glucose

Kultivierung asexueller Blutstadien von *P. falciparum*

Die Wirtszellen asexueller Blutstadien des Parasiten *P. falciparum* sind menschliche Erythrozyten. Die Parasiten wurden, falls nicht anders angegeben, in 14 ml RPMI-Medium, welches mit 200 µM Hypoxanthin, 2,7 µg/ml Gentamicin und 0,45 % (w/v) AlbuMAXII supplementiert wurde und menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe A+ kultiviert. Der Hämatokrit lag bei 3,6 %. Die Parasiten wurden in sterilen Petrischalen mit Luftventilen in einem Inkubator bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und unter einer kontinuierlichen Begasung mit 5 % CO₂, 5 % O₂ und 90 % N₂ kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilarbeitsbank durchgeführt. Täglich aber mindestens jeden 2. Tag wurden 10 ml altes Medium von der Kultur entfernt und mit 10,5 ml frischem, vollständigem RPMI-Medium resuspendiert. So konnten Verdunstungseffekte kompensiert werden. Um die Plasmodienkulturen immer zwischen einer Parasitämie von 0,1-10 % zu halten wurden Blutausstriche angefertigt und die Parasitämie überprüft. Daraufhin wurden die Kulturen entsprechend verdünnt. Dabei wurde je nach gewünschter Parasitämie ein bestimmter Anteil der Resuspension zurück in die Petrischale überführt und frisches vollständiges RPMI-Medium bis zu einem Gesamtvolumen von

2.2. METHODEN

14 ml sowie Blut bis zu einem Endvolumen von 500 μ l hinzugefügt. Alle verwendeten Stämme, außer der 3D7 WT Stamm hatten eine Blastocidin Resistenz und wurden deshalb unter ständiger Zugabe von Blastocidin (4 oder 15 μ g/ml) kultiviert.

RPMI-Medium only: 25 mM HEPES, 5,6 mM Na₂HPO₄, 23,8 mM NaHCO₃, 2,05 mM Gln, 11,1 mM Glucose (2 g/l)

Complete RPMI-Medium: Hypoxanthin 200 μ M, Gentamicin 2,7 μ g/ml, 0,45 % (w/v) AlbuMAXII in RPMI-Medium only

Ausstriche, Giemsa-Färbung und Abschätzung der Parasitämie

Zur Bestimmung der Parasitämie wurde der Kultur zunächst 4 μ l Blut vom Plattenboden der Petrischale entnommen und auf einem Objektträger aufgebracht. Nach mehrfachem auf und ab pipettieren war der Blutstropfen homogen durchmischt und konnte mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen werden. Nachdem die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurden sie in einem Methanol Bad für 30 s fixiert und erneut getrocknet. In einem Giemsa-Färbebad (10 % (v/v) in ddH₂O) wurden die Ausstriche 30 min bei RT gefärbt und anschließend unter fließendem Wasser gründlich abgespült und getrocknet. Durch die Giemsa-Färbung war die DNA des Parasiten blau-violett angefärbt, wodurch unter dem Mikroskop durch Zählen der infizierten Erythrozyten (iRBCs) und der nicht infizierten Erythrozyten (RBCs) das Verhältnis von iRBCs/RBCs gebildet und damit die Parasitämie der Kultur rechnerisch bestimmt werden konnte. Je mehr Zellen insgesamt gezählt wurden, umso genauer war die ermittelte Parasitämie.

Einfrieren von *P. falciparum* Kulturen (Cryo-Preservation)

Bei einer Parasitämie von etwa 3 % Ringstadien, konnte bis zu 1 ml der Kultur in einem Cryo-Vial in einem Tank mit flüssigem Stickstoff konserviert werden. Dafür wurde die Kul-

tur in ein 15 ml Falcon überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Blutpellet wurde in einem Volumenäquivalent Einfrierlösung tropfenweise unter schütteln resuspendiert. Das Gemisch wurde möglichst schnell in ein Cryo-Vial überführt und direkt in flüssigem Stickstoff konserviert.

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

Synchronisierung

Die Synchronisierung der Parasiten erfolgte nach einer Methode, die 1979 von Lambros und Vanderberg entwickelt wurde [172]. Die zu synchronisierende Kultur wurde resuspendiert und vollständig in ein 15 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 300 x g, RT) wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit der 10-fachen Menge 5 % D-Sorbitol resuspendiert. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT wurde erneut zentrifugiert (5 min, 300 x g, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2-mal mit vollständigem RPMI-Medium gewaschen. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet erneut in 7 ml vollständigem RPMI-Medium aufgenommen und in eine frische Petrischale, in der bereits 7 ml vollständiges RPMI-Medium vorgelegt wurden, resuspendiert. Nur die Ringstadien überleben diese D-Sorbitol Behandlung.

Sterilisierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA, die durch eine Midi-Präparation gewonnen wurde, musste vor der Transfektion sterilisiert werden. Dafür wurde die Plasmid-DNA zunächst mit 0,1 Volumenanteilen Natriumacetat-Puffer (NaAc-Puffer) angesäuert und anschließend mit 2,5 Volumenanteilen eisgekühltem, 100 %igem Ethanol ausgefällt und über Nacht bei -20 °C weiter präzipitiert. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA bei 20000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank getrocknet. Die DNA konnte direkt für

eine Transfektion in *Plasmodium falciparum* verwendet werden.

NaAc-Puffer: 3 M Natriumacetat mit Essigsäure auf pH=4,7 einstellen

Transfektion

Die Transfektion in *P. falciparum* wurde nach dem Protokoll von Deitsch *et al.* [173] durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine *P. falciparum* 3D7 WT-Kultur wie zuvor beschrieben mit D-Sorbitol synchronisiert. Am Folgetag wurde die synchrone Schizonten-Kultur auf eine Parasitämie von 1 % eingestellt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. In einer frischen Petrischale wurden 100 µl der infizierten Erythrozyten zu 7 ml vollständigem RPMI-Medium gegeben. Außerdem wurden 2 ml uninfizierte Erythrozyten zweimal in je 6 ml eiskaltem, incomplete Cytomix gewaschen (300 x g, 5 min). Dann wurden 400 µl der uninfizierten Erythrozyten mit 400 µl unvollständigem Cytomix gemischt, in dem zuvor 100 µg der sterilen Plasmid-DNA gelöst wurde. Das Gemisch wurde anschließend in zwei Elektroporationsküvetten eingefüllt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Elektroporation mit dem Programm U-033 des Nucleofactor II/2 b in die Erythrozyten transfiziert. Die Küvetten wurden danach erneut 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Erythrocyten mit je 4 ml vollständigem RPMI-Medium, durch Ausspülen beider Küvetten, in ein 15 ml Falcon überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (300 x g, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 6 ml vollständigem RPMI-Medium resuspendiert und mit den 100 µl infizierten Erythrozyten in 7 ml vollständigem RPMI-Medium vermischt. Am Folgetag wurde durch einen Giemsa-Blutausstrich geprüft, ob Ringstadien in der Kultur vorliegen und somit die Invasion der Merozoiten in die DNA-beladenen Erythrozyten erfolgreich war. Die Kultur wurde mit 10 ml vollständigem RPMI-Medium gewaschen, um lysierte Erythrozyten und Zellfragmente zu entfernen und anschließend in eine neue Kulturschale überführt. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde der Hämatokrit auf 3,6 % eingestellt und das Selektionsantibiotikum für das Plasmid, Blastocidin, wurde sukzessive verabreicht, zunächst 2 µg/ml, dann 4 µg/ml. Alle

2.2. METHODEN

zwei Tage wurden 10 ml frisches Medium mit entsprechender Menge Blasticidin verabreicht und einmal pro Woche 100 μ l frische Erythrocyten. Es überlebten nur Parasiten, die das Plasmid aufgenommen haben. Nach 2-6 Wochen war die Kultur sichtbar mit Parasiten infiziert und konnte zur Absicherung, wie zuvor beschrieben, eingefroren werden.

incomplete Cytomix: 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, pH=7,6 (KOH)

Complete RPMI-Medium: Hypoxanthin 200 μ M, Gentamicin 2,7 μ g/ml, 0,45 % (w/v) AlbuMAXII in RPMI-Medium only

IC₅₀-Bestimmung mit SYBR green I

Zunächst wurden Blutausstriche für die entsprechenden Kulturen angefertigt und anschließend die Parasitämie bestimmt. Die Kulturen wurden auf eine Parasitämie von 0,5 % eingestellt und bei 300 g für 5 min bei RT zentrifugiert. In einem 15 ml Falcon wurden für jede zu untersuchende Kultur 9 ml AlbuMAXII-freies RPMI-Medium und 1 ml 2x AlbuMAXII (10 g AlbuMAXII auf 100 ml RPMI only) gemischt. AlbuMAXII muss dabei doppelt konzentriert sein, da es später in der 96-Well Platte zu einer weiteren 1:1 Verdünnung kommt. In allen 96-Wells wurde eine identische, finale AlbuMAXII Konzentration von 0,45 % (w/v) erreicht. Um einen Hämatokrit von 3 % zu erreichen wurden von jeder Kultur nun 300 μ l des zentrifugierten Pellets hinzugegeben. Je nach gewünschter Blasticidin-Konzentration wurden zusätzlich entweder 8 oder 30 μ g/ml Blasticidin zugegeben. Die D-Aminosäure wurde ebenso in doppelter Konzentration hinzugefügt und lag bei 10 mM. Für die äußeren Wells wurden uninfizierte Erythrozyten verwendet, dafür wurden 300 μ l Erythrozyten ebenfalls in 9 ml AlbuMAXII-freiem RPMI-Medium und 1 ml 2x AlbuMAXII zu einem Hämatokrit von 3 % verdünnt, jedoch ohne Zugabe von Blasticidin oder D-Aminosäuren. Zur *RgDAAO*^{WT}- und *RgDAAO*^{R285A}-Kultur, die für die Negativkontrolle ohne D-Aminosäure verwendet wurde, wurde natürlich keine D-Aminosäure zugegeben. Auf einer 96-Well Platte wurden die IC₅₀ Werte der Kulturen

2.2. METHODEN

immer paarweise bestimmt, jeweils für den *RgDAAO*^{WT}-Stamm und den Stamm mit der Punktmutante als optimale Negativkontrolle *RgDAAO*^{R285A}, wie Abbildung 2.5 zeigt.

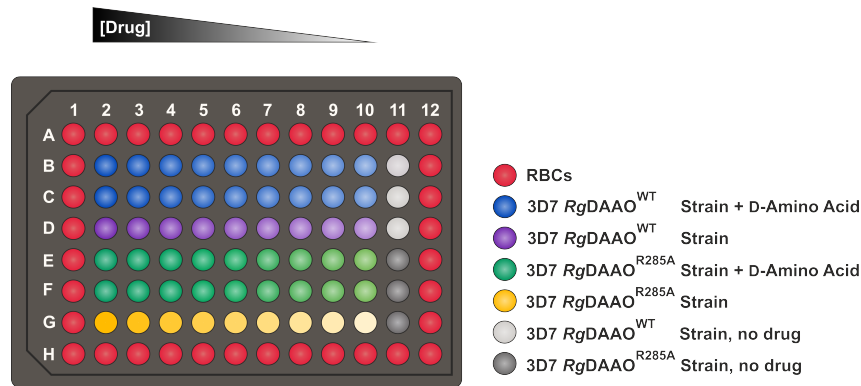


Abbildung 2.5: Pipettierschema 96-Well Platten für IC_{50} -Messungen. Nachdem 50 μ l AlbuMAXII-freies RPMI-Medium in allen Wells vorgelegt wurde, wurden in die äußeren Wells 50 μ l uninfizierte Erythrocyten, die wie zuvor beschrieben in 9 ml RPMI only und 1 ml AlbumaxII zu einem Hämatokrit von 3 % vorverdünnt wurden, hinzugegeben (rote Wells). In Spalte B2-G2 wurden je 25 μ l der Paraquat-Stammlösung in (40 mM) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Je 25 μ l wurden nach dem Mischen aufgenommen und in Spalte B3-G3 gegeben und erneut gemischt. Diese Verdünnungsreihe von 1:3 Verdünnungsschritten wurde bis Spalte B10-G10 fortgesetzt, wo die 25 μ l verworfen wurden. Die finale Paraquatkonzentration lag zwischen 6667 μ M Paraquat in Spalte B2-G2 und 1 μ M in Spalte B10-G10. In die Reihen B und C wurde jeweils der, mit der D-Aminosäure behandelte Stamm mit *RgDAAO*^{WT} (dunkelblaue Wells) und in Reihe D der Stamm mit *RgDAAO*^{WT} ohne D-Aminosäure als Negativkontrolle (lilane Wells) gegeben. In die Reihen E und F wurde, der mit D-Aminosäure behandelte Stamm mit *RgDAAO*^{R285A} (grüne Wells), sowie die Negativkontrolle ohne D-Aminosäure in Reihe G (gelbe Wells) gegeben. In Spalte 11 befand sich die Negativkontrolle infizierter Erythrozyten des Stamms mit *RgDAAO*^{WT} (hellgraue Wells) bzw. des Stamms mit *RgDAAO*^{R285A} (dunkelgraue Wells) ohne Paraquat aber mit D-Aminosäure in den Wells B11, C11, E11 und F11, auf die alle Messwerte normalisiert wurden. Der finale Hämatokrit bei einem Gesamtvolumen von 100 μ l lag bei 1,5 %, die AlbumaxII-Konzentration lag in allen Wells bei 0,45 % (w/v), die Parasitämie bei 0,5 %.

In den sterilen 96-Well Platten wurden im ersten Schritt 50 μ l AlbuMAXII-freies RPMI-Medium mit einer 8 Kanal Pipette in allen Wells vorgelegt. In die äußeren Wells wurden zusätzlich je 50 μ l RBCs, die wie zuvor beschrieben in 9 ml RPMI only und 1 ml AlbumaxII zu einem Hämatokrit von 3 % vorverdünnt wurden, pipettiert (siehe Abb. 2.5). Diese dienen als Kontrolle für die Hintergrundfluoreszenz oder Autofluoreszenz, die bei einem finalen Hämatokrit von 1,5 % von den Erythrozyten ausgeht. Die Stammlö-

2.2. METHODEN

sung von Paraquat wurde mit AlbuMAXII-freiem RPMI-Medium hergestellt und steril filtriert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 40 mM. Je 25 μ l der 40 mM Paraquat-Stammlösung wurden in die Wells B2-G2 pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren mit dem Medium gemischt. Je 25 μ l der Mischung wurden in Spalte 3 überführt und dort ebenfalls durch Auf- und Abpipettieren mit dem Medium gemischt. Dieser Vorgang wurde bis Spalte 10 wiederholt, die überschüssigen 25 μ l entsorgt und somit eine Verdünnungsreihe erzeugt. Die finale Paraquatkonzentration liegt zwischen 6667 μ M Paraquat in Spalte B2-G2 und 1 μ M in Spalte B10-G10. In Spalte 11 wurde eine Negativkontrolle mit infizierten Erythrozyten ohne Paraquat eingebaut. Diese dient zudem zur Normalisierung des parasitären Wachstums in den Wells mit Paraquat (Spalte 2-10) in Relation zum Wachstum ohne Paraquat in Spalte 11.

Abschließend wurden die Spalten 2-11 noch gemäß Abbildung 2.5 mit jeweils 50 μ l Kultur, die wie zuvor beschrieben in 9 ml RPMI only Medium und 1 ml 2x AlbumaxII auf einen Hämatokrit von 3 % vorverdünnt wurde, aufs finale Volumen von 100 μ l aufgefüllt. Dabei befindet sich in den Reihen B und C jeweils der mit der D-Aminosäure behandelte Stamm mit *RgDAAO*^{WT}, in Reihe D der unbehandelte Stamm mit *RgDAAO*^{WT} als Negativkontrolle. In den Reihen E und F wurde, der mit D-Aminosäure behandelte Stamm mit inaktivem Enzym *RgDAAO*^{R285A}, sowie die Negativkontrolle ohne D-Aminosäure in Reihe G. Der finale Hämatokrit war in allen Wells identisch und lag bei 1,5 %, die Parasitämie lag bei 0,5 %. Die Platten wurden für 72 h bei 37 °C und in einer Atmosphäre aus 5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Abschließend wurden die Platten einzeln mit Parafilm versiegelt und mindestens für 1 h bei -80 °C eingefroren. Mindestens eine halbe Stunde vor der Zellyse wurden die Platten bei RT aufgetaut. Mit dem Programm "Lysebufferinjection_SYBRgreen1assay" des CLARIOstar Mikroplattenlesers wurden je 100 μ l Lyse Puffer pro Well injiziert, gefolgt von 2 min horizontalem Schütteln. Anschließend wurde die 96-Well Platte 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Mit dem Protokoll "SYBRgreen1assay" wurde die Fluoreszenz-Intensität für jedes einzelne Well gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 485 nm, die Emissionswellenlänge

2.2. METHODEN

lag bei 535 nm. Der Gain wurde für jede Platte neu adjustiert bezüglich des Wells mit der höchsten Fluoreszenz und lag zwischen 1200-1400, ebenso der Focus, der immer zwischen 7,9 und 8,1 mm lag. Die Messungen wurden bei RT durchgeführt. Zur Analyse der Daten wurde das Template IC50_Template_Control verwendet. Durch das Template wurden die Rohdaten um die Hintergrund-Fluoreszenz der uninfizierten Erythrozyten (äußere Wells) korrigiert und die Daten bezüglich des Wachstums der infizierten Erythrozyten ohne Paraquat in Spalte 11 normalisiert. Die finalen Datenpunkte wurden in Sigma Plot mit einer 4 Parameter Hill-Funktion in eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve gefittet.

Tris-Puffer, 20 mM: 242,28 nm Tris, 100 ml ddH₂O, pH 7,5 (HCl)

Saponin-Stammlösung 0,4 % (2 ml): Saponin 0,4 % (w/v) (40 mg) in Tris HCl 20 mM (pH 7,5, 10 ml)

IC₅₀-Lyse-Puffer (100 ml): Tris HCl 20 mM (pH: 7.5, 98 ml), EDTA 5 mM (186,12 mg), Triton X-100 0.08 % (v/v) (80 µl), Saponin 0.008 % (w/v) (2 ml)

AlbuMAXII-freies RPMI-Medium: Hypoxanthin 200 µM, Gentamicin 2,7 µg/ml in RPMI-Medium only

2x AlbuMAXII: 10 g Albumax auf 100 ml RPMI only

Paraquat-Stammlösung: 40 mM Paraquat in AlbuMAXII-freiem Medium.

Probenvorbereitung für die Immunofluoreszenzmikroskopie

Immunofluoreszenz-Assays wurden nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von Dr. Julien Guizetti des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt. Die Proben wurden in ibidi µ-Slide 8 Well Imaging Dishes mit Glasboden fixiert. Alle verwendeten Reagenzien und Waschsubstanzen wurden vor Verwendung auf 37 °C vorgewärmt. Das Auf- und Abpipettieren wurde immer in derselben Kammerecke vorgenommen, um unnötige Kratzer auf der Probenoberfläche zu verhindern. Der Fixierungsprozess dauerte 2 Tage. An Tag 1 wurde der Glasboden der einzelnen Kammern mit 80 µl Concanavalin A komplett be-

2.2. METHODEN

deckt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Das Concanavalin A wurde entfernt und die Kammern zweimal mit 300 µl PBS pH 7,4 gewaschen. Die zu fixierenden Kulturen sollten eine Parasitämie > 5 % aufweisen. Dies wurde zuvor durch einen Giemsa-Blutausstrich überprüft. Anschließend wurden 200 µl der Kultur entnommen und für 30 s bei 800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 200 µl RPMI-Medium Only gewaschen und schließlich in 200 µl RPMI-Medium Only resuspendiert. Nach Entfernung des PBS-Puffers wurden die resuspendierten Kulturen in die Kammern pipettiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert, sodass sich die Zellen am Boden absetzen und an die Concanavalin-Schicht binden konnten. Anschließend wurden die Kammern vorsichtig bis zu 7-mal mit je 300 µl RPMI-Medium Only gewaschen bis nur noch eine dünne Einzelschicht von Zellen (Monolayer) sichtbar war. Im nächsten Schritt wurden die Kammern mit 100 nM MitoTrackerTM Orange CMTM Ros, in je 300 µl vollständigem, RPMI-Medium behandelt und exakt für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Kammern wurden danach zunächst dreimal mit 300 µl vollständigem RPMI-Medium und anschließend zweimal mit 300 µl PBS-Puffer gewaschen bevor die Zellen mit jeweils 200 µl 4%-igem Paraformaldehyd (PFA in PBS-Puffer) für 20 min bei 37 °C fixiert wurden. Anschließend wurden die Kammern erneut zweimal mit je 300 µl PBS gewaschen, in Aluminiumfolie gewickelt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Der PBS-Puffer, sowie das vollständige RPMI-Medium und das RPMI-Medium Only wurden zuvor auf 37 °C vorgewärmt.

Am Folgetag wurden die fixierten Zellen zunächst mit 0,1 % Triton X-100 in PBS-Puffer für 15 min bei RT permeabilisiert und anschließend 3-mal mit je 300 µl PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden alle unspezifischen Bindungsstellen des Primärantikörpers für 1 h bei RT mit einer 3 %-igen Bovine-Serumalbumin-Lösung (BSA) in PBS-Puffer geblockt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper α -HA-Biotin High Affinity (3F10) (Verdünnung: 1:2000), in 3 %-iger BSA-Lösung in PBS-Puffer für 2 h bei RT auf einer Schüttel-Plattform inkubiert. Gefolgt von drei 10-minütigen Waschschritten mit 0,5 % Tween-20 in PBS-Puffer, ebenfalls auf einer Schüttel-Plattform. Danach wurden die Zellen gleichzeitig mit dem Sekundärantikörper Alexa 488 Goat α Rat IgG (H+L)

2.2. METHODEN

(Verdünnung: 1:500) und mit 300 nM DAPI in 3 %-iger BSA-Lösung in PBS-Puffer für 1 h bei RT behandelt. Die Zellen wurden zweimal je 10 min mit 0,5 % Tween-20 in PBS-Puffer sowie einmal für 10 min mit PBS-Puffer gewaschen. Zur abschließenden Fixierung wurden erneut je 200 µl 4 %-ige PFA-Lösung in PBS-Puffer für 20 min bei RT aufgetragen und erneut zweimal mit 300 µl PBS-Puffer gewaschen und bis zur Mikroskopie bei 4 °C gelagert.

RPMI-Medium only: 25 mM HEPES, 5,6 mM Na₂HPO₄, 23,8 mM NaHCO₃, 2,05 mM Gln, 11,1 mM Glucose (2 g/l)

Complete RPMI-Medium: Hypoxanthin 200 µM, Gentamicin 2,7 µg/ml, 0,45 % (w/v) AlbuMAXII in RPMI only

Concanavalin A: 5 mg/ml, in ddH₂O

PBS-Puffer: 1,84 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH=7,4 (HCl)

BSA-Lösung: 3 % BSA in PBS-Puffer pH 7,4

Triton X-100-Lösung: 0,1 % Triton X-100 in PBS-Puffer pH 7,4

Tween-20 Lösung: 0,5 % Tween-20 in PBS-Puffer pH 7,4

PFA-Lösung: 4 % PFA in PBS-Puffer pH 7,4

DAPI: 300 nM in 3 % BSA-Lösung

MitoTrackerTM Orange CMTM Ros: 100 nM in complete RPMI-Medium

Mikroskopie und Bildauswertung

Die Lokalisationsstudien wurden am Folgetag an einem Axio Observer LSM 880 Konfokalmikroskop von Zeiss der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frankenberg-Dinkel aufgenommen. Die Mikroskopiemethode wurde von Prof. Dr. Stefanie Müller-Schüssele etabliert. Die Mikroskopiebilder wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Stefanie Müller-Schüssele und M. sc. Sadia Sayed Tamanna aufgenommen. Die zu untersuchenden Kulturen wurden wie

2.2. METHODEN

oben beschrieben in 8 Well Glass Bottom Objektträgern von ibidi fixiert. Die Mikroskopiebilder wurden mit einem 40x Objektiv (C-Apochromat 40x) mit Wasserimmersion in vier Kanälen aufgenommen: Kanal 1 (transmitted light) zeigt die Parasiten im Durchlicht (Argon-Laser 488 1,5 %, ex. 488 nm, em. 500-553 nm, Expositionszeit pro Pixel: 1,54 μ s), Kanal 2 (DAPI) zeigt die DNA des Parasiten im Nukleus mittels DAPI-Färbung (Diodenlaser 405 1,0 %, ex: 405 nm, em. 415-477 nm, Expositionszeit pro Pixel: 1,54 μ s), Kanal 3 (α -HA) zeigt das gebildete Redoxenzym *RgDAAO*^{WT} oder *RgDAAO*^{R285A} mittels Sekundärantikörper Alexa488 (Argon-Laser 488 1,5 %, ex. 488 nm, em. 500-553 nm, Expositionszeit pro Pixel: 1,54 μ s) und Kanal 4 (MTO) zeigt die Mitochondrien durch Färbung mit Mito Tracker Orange CMTM Ros (Helium-Neon-Laser 543, ex: 543 nm 3,0 %, em: 561-685 nm, Expositionszeit pro Pixel: 1,54 μ s). Zur Vergleichbarkeit der Bilder wurden die Mikroskopieparameter nach Start der Mikroskopie nicht verändert. Zunächst wurde durch das Okkular im Durchlicht bei 40x Vergrößerung im gewünschten Well ein zur Mikroskopie geeignetes Feld ausgewählt. Am Computerbildschirm konnte das ausgewählte Feld im Live-Modus in allen vier Kanälen angeschaut und ein einzelner infizierter Erythrozyt ausgewählt werden. Der Live-Modus sollte immer möglichst kurz zur Suche von Zellen eingesetzt werden, um die Probe vor unnötigen Anregungen durch die Laser zu schonen. Es wurden nur Parasiten ausgewählt, bei denen alle Kompartimente gut sichtbar in einer Ebene lagen. Zudem waren die ausgewählten Erythrozyten nur einfach infiziert. Die ausgewählte Zelle wurde bei gleichem Objektiv auf eine Bildgröße von 21,25 μ m x 21,25 μ m durch zoomen vergrößert (Bildgröße: 512x512 Pixel, Pixelmaßstab: 0,04 μ m x 0,04 μ m x 0,54 μ m, Bit Depth: 12 Bit), zentriert und einen Z-Stack des Erythrozyten für die vier Kanäle aufgenommen. Der Abstand zwischen den Ebenen des Z-Stacks betrug 0,5 μ m Für jeden Stamm wurden Bilder von Ring-, Trophozoit- und Schizontenstadien aufgenommen. Die Mikroskopiebilder wurden im Dateiformat .lsm gespeichert.

Zur Auswertung wurde das Programm Fiji ImageJ verwendet. Der infizierte Erythrozyt wurde zunächst erneut zentriert und quadratisch auf 10 μ m x 10 μ m zugeschnitten

(Rectangle Button, Image → Crop), Zur besseren Erkennbarkeit überlagernder Signale in Merge Bildern wurde die Farbe des MTO-Kanals von orange auf rot geändert. Dafür wurde im Channels Tool der gewünschte Kanal ausgewählt (Image → Color → Channels Tool) und anschließend in den Lookup Tables die Farbe Red ausgewählt (Image → Lookup Tables → Red). Nachdem eine geeignete Ebene des Z-Stacks, ausgewählt war, die alle Kompartimente in den vier Kanälen gut sichtbar abbildete, wurden die Kanäle gesplittet (Image → Color → Split Channels). Die Intensitäten der Einzelbilder der entsprechenden Kanäle wurden individuell angepasst (Image → Adjust → Brightness/Contrast) und als png-Datei exportiert. Zur besseren Übersichtlichkeit und Interpretation der Daten wurde in MergeI die Kanäle α -HA und MTO, in MergeII zusätzlich der DAPI-Kanal überlagert. Merge all ist eine Überlagerung aller vier Kanäle. Der Maßstabsbalken wurde nur repräsentativ in einem Merge all Bild abgebildet (Analyze → Tools → Scale Bar (Width: 2 μ m, Height: 3 μ m, Thickness in pixels: 6, Font size: 22, Color White, Location Lower right, Horizontal, Bold Text, Overlay)).

3 Ergebnisse

3.1 Kompetitive kinetische Analyse der Detektionsreaktion von Sulfensäuren und Sulfenylamiden

Die im folgenden Kapitel vorgestellten Daten wurden in Bischoff *et al.* publiziert [1].

3.1.1 Stabilität und Löslichkeit von cyclischem *N*-Boc-Sulfenylamid

Als Modells substanz für ein cyclisches Sulfenylamid wurde *N*-Boc-Sulfenylamid, im Folgenden als SA abgekürzt, verwendet. Die Substanz wurde nach bekannter Synthesevorschrift [165], [166], [160] in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Manolikakes synthetisiert und aufgereinigt [167]. Es wird vermutet, dass cyclische Sulfenylamide sich unter wässrigen Bedingungen in einem Äquilibrium mit der korrespondierenden Sulfensäure befinden [160], die als initiale posttranslationale Modifikation zu vielen Folgeprodukten reagieren kann, unter anderem zu Disulfiden, Sulfin- oder Sulfonsäuren. Um die pH-abhängige Stabilität von SA weiter zu untersuchen, musste zunächst ein Lösungsmittel gefunden werden, in dem die Modells substanz über längere Zeit stabil aufbewahrt werden konnte. Zudem war SA in Wasser nur schwer löslich, daher musste es zunächst in einem amphiphilen organischen Lösungsmittel aufgenommen und anschließend in Wasser gelöst werden. Für ein cyclisches Sulfenylamid, das strukturell identisch zu SA ist, aber eine Cbz- statt einer Boc-Schutzgruppe trägt, konnte die Stabilität in wasserfreiem Acetonitril (ACN) über 90 min mittels LC-MS nachgewiesen werden [160]. Die Stabilität in ACN konnte in eigenen Experimenten bestätigt werden, daher wurde ACN als Lösungsmittel für SA verwendet. Das ^1H -NMR Spektrum von SA wurde in CD_3CN gemessen (Abb. S1, S3). Zur Strukturbestätigung wurde zusätzlich ein ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum gemessen (S2). Alle Spektren von

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

SA inklusive der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind im Anhang gezeigt. (übernommen aus [1], [167])

3.1.2 NMR-Analysen zur pH-abhängigen Ringöffnung von SA

Die pH-abhängige Ringöffnung von SA zur Sulfensäure wurde zunächst mittels NMR-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 3.1 zeigt das rote ^1H -NMR-Spektrum eine Probe von 60 mM SA in CD_3CN als Ausgangsspektrum. Durch Zugabe von 60 Äquivalenten (eq) Deuteriumoxid (D_2O) wurde die Stabilität von SA nicht beeinträchtigt (grünes Spektrum). Der pH-Wert wurde mit pH-Papier gemessen und lag in dieser Probe bei ≈ 5 . Im Vergleich zum Ausgangsspektrum wurde nur ein zusätzlicher Signalpeak für Wasser beobachtet. Die Zugabe von 1 eq NaOH führte zur Ringöffnung des cyclischen Sulfenylamids (blaues Spektrum). Darauf deutet die Aufspaltung des Signals d in zwei Dublett von Dublett-Signale der Cystein-Methylen-Protonen (d) im Vergleich zum grünen Spektrum hin. Die Hydrolyse von SA war aufgrund des zu niedrigen pH-Werts zuvor nicht möglich, die Ringöffnung ist demnach nicht D_2O -, sondern pH-abhängig. Da die Sulfensäure sehr instabil und reaktiv ist, ist anzunehmen, dass sie während der Messung des Spektrums bereits weiterreagiert hat und sich Folgeprodukte gebildet haben. Die Dublett von Dublett-Signale der Cystein-Methylen-Protonen (d) deuten auf die Bildung zweier neuer Produkte hin. Welche das waren konnte nicht festgestellt werden. Allerdings ist anzunehmen, dass es sich dabei um Produkte aus Folgereaktionen der Sulfensäure handeln muss, die im möglichen Reaktionsmechanismus der Umwandlung von SA zum Disulfid in Abbildung 3.4 dargestellt sind. Einerseits wäre die Bildung des Thiosulfinatesters (Abb. 3.4, Substanz (3)) wahrscheinlich, der als asymmetrisches Molekül zwei unterschiedliche Signale der beiden Cysteinyl-Methylen-Protonen aufweisen müsste. Dafür spricht auch, dass das Signal der Cysteinyl-Methylen-Protonen (d) von SA vollständig verschwunden ist, also im blauen Spektrum kein SA mehr vorliegt. Da die Sulfensäure sehr schnell weiterreagiert und der Thiosulfinatester das direkte Folgeprodukt der Sulfensäure ist, liegt dessen Bildung nahe. Folgt man dem Reaktionsmechanismus in Abbildung 3.4 weiter,

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

könnte es sich auch um ein Gemisch aus dem cyclischen Sulfinamid (Abb.3.4, Substanz (4)) und der Thiolatspezies (Abb.3.4, Substanz (5)) handeln.

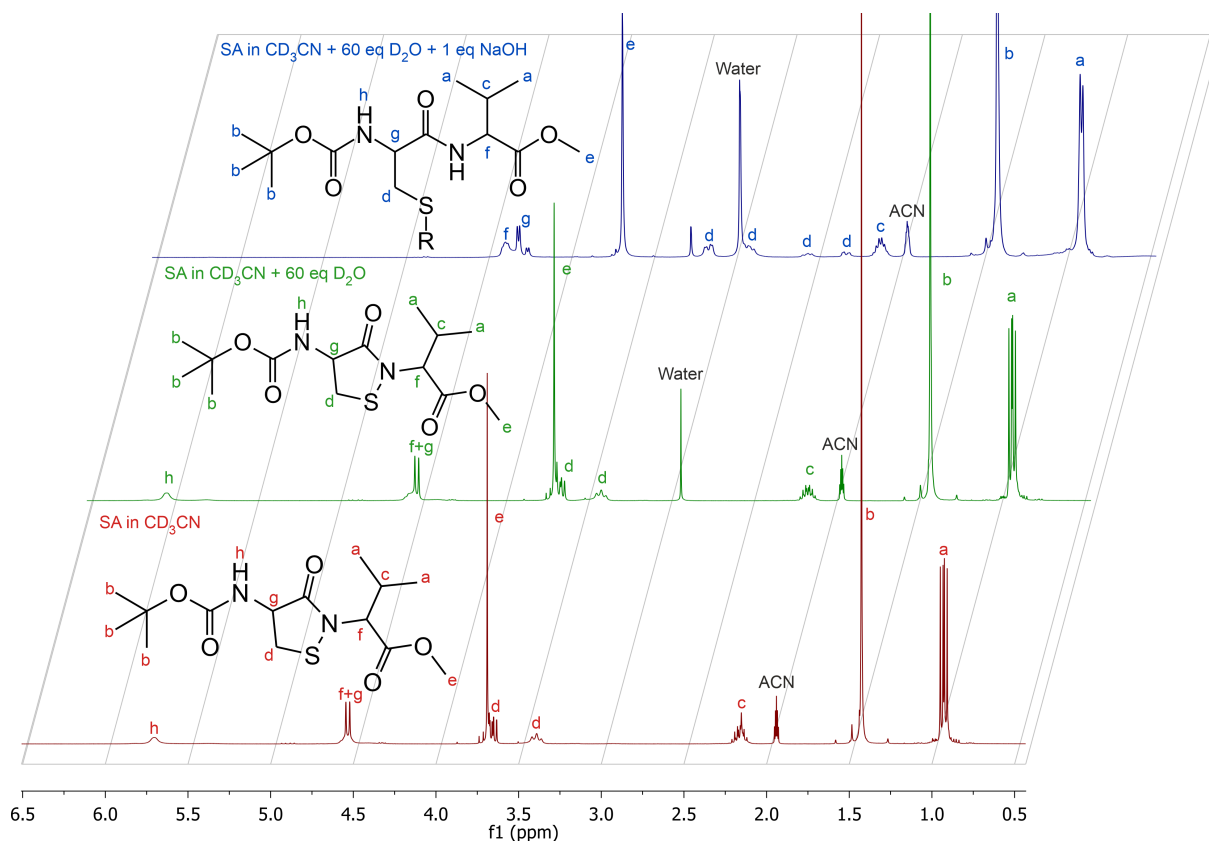


Abbildung 3.1: pH-abhängige Ringöffnung von SA. ^1H -NMR Spektren von 60 mM SA in CD_3CN (rotes Spektrum). Nach Zugabe von 60 eq D_2O ist keine Ringöffnung von SA erkennbar (grünes Spektrum). Erst nach Zugabe von 1 eq NaOH wurde eine pH-abhängige Ringöffnung von SA zur Sulfensäure beobachtet. Auch eine Folgereaktion der Sulfensäure innerhalb der Messzeit des Spektrums von 1,5 min ist möglich und wird durch den Rest R repräsentiert (blaues Spektrum, $\text{R}=\text{OH}/\text{O}^-$ und andere). Die zugehörigen Originalspektren und die exakten chemischen Verschiebungen sind im Anhang gezeigt (Abb. S1). Die korrekte Zuordnung der ^1H -NMR Signale wurde durch ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR Spektren untermauert, die in Abb. S2 gezeigt sind [1].

Die Ringöffnung von SA ist pH-abhängig und wurde erst nach Zugabe von NaOH beobachtet. Alle Signale sind nach Ringöffnung geringfügig hochfeldverschoben. Signal d wurde im Mittel um etwa eine Einheit von δ 3,67 nach δ 2,72 hochfeldverschoben. Der Grund hierfür ist vermutlich die Ringöffnung. Eine potenzielle Reaktion zwischen SA und Dim wurde auch durch NMR-Spektroskopie untersucht (Abb. S3C). Das Spektrum in Abb.

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

S3C zeigt keine zusätzlichen Signale und ist eine Überlagerung der Spektren von SA in CD_3CN (Abb. S3A) und Dim in CD_3CN (Abb. S3C). Es findet also keine Reaktion von SA und Dim in CD_3CN unter diesen Bedingungen statt. (übernommen aus [1])

3.1.3 Konzentrations- und pH-Abhängigkeit der Ringöffnung von SA in PBS-Puffer

Als nächstes wurde die Ringöffnung von SA weiter mittels UV-Vis Spektroskopie untersucht. Für drei verschiedene Konzentrationen von SA (0,05, 0,1 und 0,2 mM) wurde die Ringöffnung, wie zuvor beschrieben, in einem Lösungsmittelgemisch aus 33 % ACN und 67 % Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) bei vier verschiedenen pH-Werten (pH=6,4, 6,9, 7,4 und 7,9) durchgeführt. Die UV-Vis Spektren weisen zwei Maxima bei 203 und 249 nm, sowie eine Schulter bei 292 nm auf. Das Maximum bei 249 nm ist vermutlich auf den Heterozyklus des Sulfenylamids zurückzuführen, während das Signal bei 203 nm vermutlich durch $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge im Peptidrückgrat des Sulfenylamids erklärt werden kann. Die breite Bande zwischen 280 und 320 nm mit einem lokalen Maximum bei 292 nm konnte bisher nicht zugeordnet werden. Die Absorption dieser Bande ist bereits zu Beginn der Reaktion vorhanden und bleibt über die gesamte Reaktion hinweg konstant. Es könnte sich dabei um ein Strukturmerkmal von SA handeln, das durch die Reaktion unverändert bleibt oder es ist eine Verunreinigung, die vermutlich vernachlässigt werden kann. Repräsentative Spektren sind in Abbildung 3.2 A für 0,1 mM SA und pH Werte 6,9, 7,4 und 7,9 dargestellt. Sie zeigen jeweils nicht alle für die kinetische Analyse aufgenommenen Spektren, sondern nur eine Auswahl an Spektren zu bestimmten Zeitpunkten zwischen 0 und 12 min. Aus der initialen Absorption bei 249 nm wurde ein Extinktionskoeffizient für SA $\epsilon_{249\text{nm}}$ berechnet und über alle Messungen gemittelt: er liegt bei $3,24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In Abbildung 3.2B ist die Absorption bei 249 nm gegen die Zeit aufgetragen. Die Ringöffnung von SA wird durch Zugabe des PBS-Puffers eingeleitet, die zunächst zu einer Abnahme gefolgt von einer Zunahme und einer erneuten Abnahme der Absorption bei 249 nm führte. Die Ringöffnungsreaktion von SA lässt sich also in drei Phasen unter-

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

teilen, die beispielsweise für Messungen bei pH 7,9 bei allen SA-Konzentrationen gut zu erkennen waren (Abb. 3.2B, dunkelblaue Dreiecke nach unten zeigend). Bei pH 7,9 war die erste Phase nach ca. 10 min beendet. Auch unter anaeroben Bedingungen bei 0,1 mM SA und pH 7,4 wurden ähnliche Beobachtungen gemacht wie unter vergleichbaren aeroben Bedingungen (Abb. 3.2C). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Abnahme der Absorption bei 249 nm auf eine Reaktion von SA mit gelöstem molekularem Sauerstoff zurückzuführen ist. Die Ringöffnung muss auf der Reaktion mit OH⁻-Ionen basieren, was auch durch die pH-abhängige Ringöffnung bestätigt wird. Je höher der pH-Wert, umso schneller die Umwandlung von SA. Dies konnte in Abbildung 3.2D verdeutlicht werden. Hier wurde der natürliche Logarithmus der SA-Konzentration, der mit Hilfe des ermittelten Extinktionskoeffizienten aus der Extinktion bei 249 nm (aus Abb.3.2B) berechnet werden konnte, gegen die Zeit in min aufgetragen. Da die erste Reaktionsphase einer Reaktionskinetik pseudoerster Ordnung folgt, ergab sich ein linearer Zusammenhang, der mit Hilfe linearer Regression gefittet werden konnte. Mit zunehmendem pH-Wert wurde die Gerade steiler und somit die Steigung größer, was auf die pH-Abhängigkeit der Ringöffnung zurückzuführen ist (Tab. 3.1). Vergleicht man jedoch die linearen Fits bei verschiedenen SA-Konzentrationen und gleichem pH-Wert, ergab sich kaum ein Unterschied bezüglich der Steigung. Die Reaktion ist unabhängig von der SA-Konzentration, was die Reaktionskinetik pseudoerster Ordnung bestätigt (Abb. 3.2E). Die Reaktionsgeschwindigkeit der ersten Reaktionsphase ist allein von der OH⁻-Ionen-Konzentration abhängig. Die nanomolaren Konzentrationen an OH⁻-Ionen sind geschwindigkeitsbestimmend für die Ringöffnung von SA. Es wurden zwei potenzielle isobestische Punkte identifiziert. Der erste lag im Mittel bei 216 nm innerhalb der ersten Reaktionsphase und der zweite im Mittel bei 229 nm in Reaktionsphase 2. Die isobestischen Punkte wurden durch Auftragung der Absorption einer definierten Wellenlänge gegen die Zeit ermittelt. Ein konstanter Verlauf der Absorption parallel zur x-Achse im selben Zeitbereich für mehrere Wellenlängen wurde als isobestischer Punkt interpretiert.

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

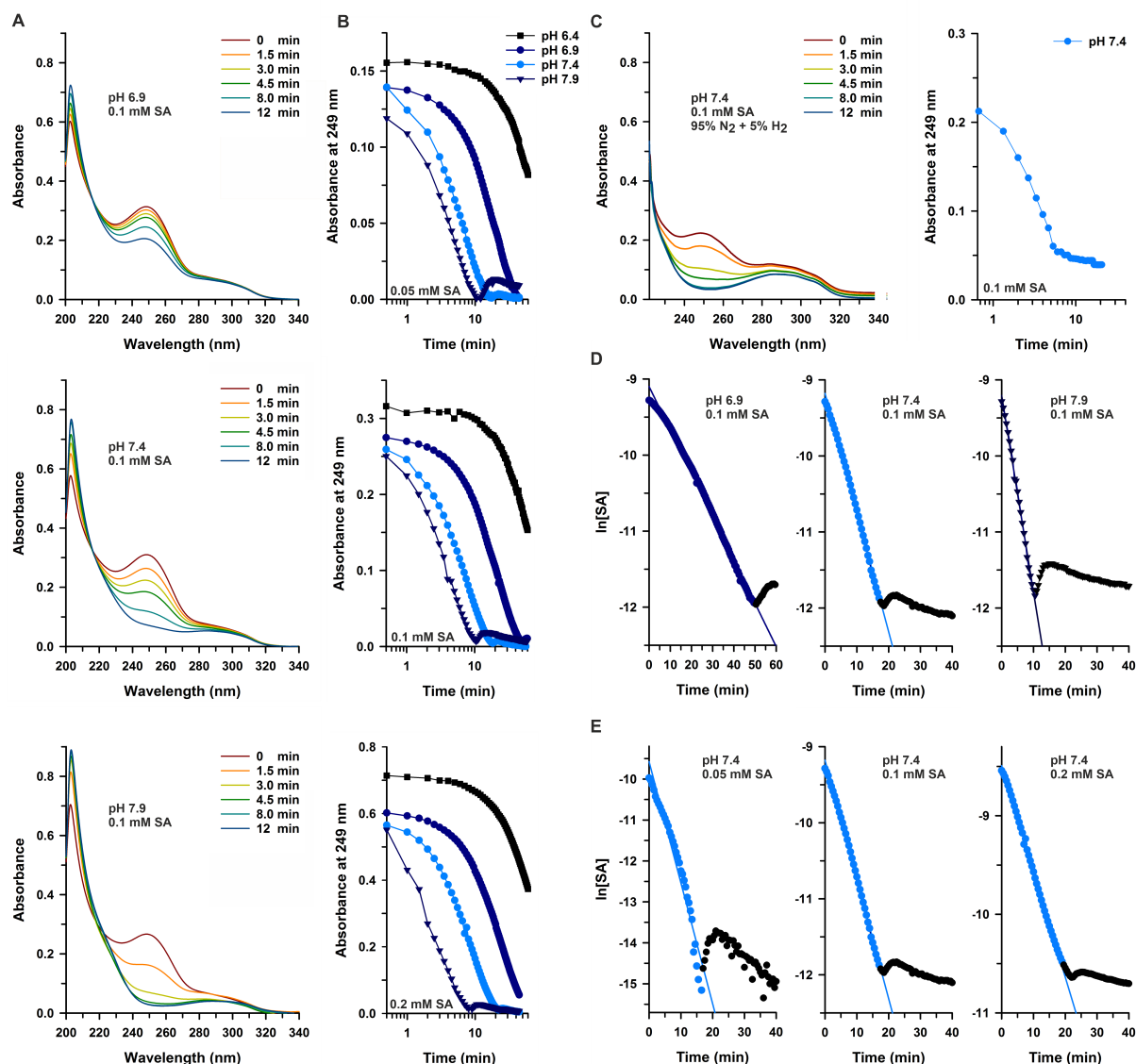


Abbildung 3.2: Kinetische Analyse der pH-abhängigen Ringöffnungsreaktion von SA in 33 % ACN und 67 % PBS1 bei 25 °C. A) Repräsentative UV-Vis-Spektren für 0,1 mM SA bei pH 6,9, 7,4 und 7,9. B) Absorptionsänderung bei 249 nm als Funktion der Zeit für 0,05, 0,1 und 0,2 mM SA bei pH 6,4, 6,9, 7,4 und 7,9. C) UV-Vis-Spektren für 0,1 mM SA bei pH 7,4 bei anaeroben Bedingungen unter 95 % N₂- und 5 % H₂-Atmosphäre. D) Basen-abhängige Ringöffnung von SA zur Sulfensäure während der initialen Reaktionsphase pseudoerster-Ordnung aus B. E) Initiale Reaktionsphase pseudoerster-Ordnung aus B ist unabhängig von der SA-Konzentration. Die zugehörigen gemittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 3.1 zu finden und in Abb. 3.3 dargestellt [1].

In Abbildung S4A und B sind repräsentative UV-Vis-Spektren (links) und die Absorptionsänderungen der entsprechenden Wellenlängen (rechts) der gefundenen isosbestischen

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

Punkte für beide Reaktionsphasen gezeigt. Die isosbestischen Punkte wurden über alle durchgeführten Messungen gemittelt. Eine ausführlichere Erläuterung der einzelnen Messungen und Ergebnisse bezüglich der isosbestischen Punkte ist in [167] zu finden. (übernommen aus [1], [167])

3.1.4 Kinetische Analyse der Ringöffnungsreaktion mittels UV/Vis Spektroskopie

Zur kinetischen Analyse der basen-abhängigen Ringöffnung von SA in 33 % ACN und 67 % PBS wurden die ermittelten k_{obs} -Werte (Tab. 3.1) gegen die berechnete OH-Konzentrationen (Tab. 3.2) in einem Sekundärplot aufgetragen.

Tabelle 3.1: Gemittelte pH-abhängige k_{obs} -Werte pseudoerster Ordnung der ersten Reaktionsphase der Ringöffnungsreaktion von SA (0,05-0,2 mM) in 67 % PBS und 33 % ACN bei 25 °C [1].

pH	k_{obs} (s ⁻¹) Mittelwert
6,4	$4,88 \times 10^{-4}$
6,9	$1,04 \times 10^{-3}$
7,4	$2,75 \times 10^{-3}$
7,9	$7,17 \times 10^{-3}$

Tabelle 3.2: pH- und pOH-Werte und zugehörige [OH⁻] [1].

pH	pOH	[OH ⁻] (mol/l)
6,4	7,6	$2,51 \times 10^{-8}$
6,9	7,1	$7,94 \times 10^{-8}$
7,4	6,6	$2,51 \times 10^{-7}$
7,9	6,1	$7,94 \times 10^{-7}$

Die Datenpunkte wurden mittels linearer Regression gefittet. Die Steigung der Geraden entsprach der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung. Der y-Achsenabschnitt, der durch den linearen Fit entstanden ist liegt bei $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und könnte durch Spontanreaktionen von SA, beispielsweise eine langsame Autoxidation erklärt werden. Auch die Rückreaktion zu SA im Gleichgewicht mit der korrespondierenden Sulfensäure ist möglich (Abb. 3.3).

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

Die Geschwindigkeitskonstante der basen-abhängigen Ringöffnung von SA zur Sulfensäure entspricht $k=8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (übernommen aus [1], [167])

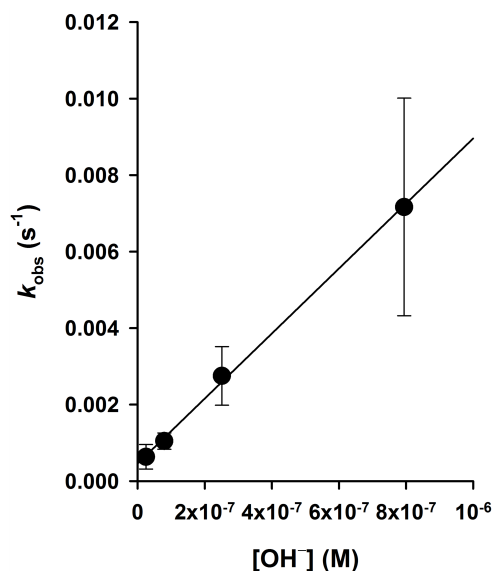


Abbildung 3.3: Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der pH-abhängigen Ringöffnung von SA in 33 % ACN und 67 % PBS. Die Datenpunkte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten zweier unabhängiger Experimente $n=2 \times 3$ ermittelt [1].

3.1.5 Kinetische Analyse der Reaktion von SA und Dimedon mittels ESI-MS/MS

Bei Untersuchung der pH-abhängigen Ringöffnung von SA in 33 % ACN und 67 % PBS-Puffer mittels UV-Vis Spektroskopie wurden drei Reaktionsphasen für die Absorptionsänderung bei 249 nm beobachtet. Um den zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus, der bereits durch Carroll *et al.* [160] veröffentlicht wurde, weiter zu untersuchen, wurde die Reaktion im Folgenden massenspektrometrisch betrachtet. Der Reaktion von 0,1 mM SA in 33 % ACN und 67 % PBS2 pH 7,4 (Tab. 2.19) wurde nach 0, 4, 8, 11, 16, 24 und 30 min eine Probe entnommen, 1:10 mit ACN verdünnt und bei 25 °C für je 1 min im Kationenmodus gemessen. Um Hintergrundsignale zu minimieren wurde PBS2 ohne K⁺-Ionen verwendet. Die Signale bei 229, 398, 747 und 773 m/z wurden durch eine Referenzmessung als Puffersignale identifiziert und waren erwartungsgemäß in jedem Spektrum der

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

Reaktion zu sehen. In Abbildung 3.4) ist der mögliche Reaktionsmechanismus [160] und die identifizierten Spezies mit den zugehörigen Massenspektren dargestellt. Unter wässrigen Bedingungen steht das cyclische Modellpeptid SA (1) im Gleichgewicht mit der korrespondierenden Sulfensäure (2). Zum Zeitpunkt 0 min wurde SA als Monomer bei 355 m/z und als Dimer bei 687 m/z jeweils an Na^+ koordiniert detektiert. Ein Signal der Sulfensäure wurde nicht beobachtet. Nach 4 min wurde die Bildung des Thiosulfinatesters (3) mit 705 m/z an Na^+ koordiniert beobachtet. Der Thiosulfinatester (3) wurde durch die Reaktion der Sulfensäure mit SA gebildet, da kein anderes Nukleophil zur Verfügung stand. Durch die Bildung der Sulfensäure und des Thiosulfinatesters sank die Signalintensität der monomeren SA-Spezies (355 m/z) auf 60 % ab. Das Stickstoffatom der Amidgruppe im Peptidrückgrat des Thiosulfinatesters reagierte mit der Sulfoxidgruppe desselben Moleküls, wodurch es zur Bildung des cyclischen Sulfinamids und des Thiolats kam. Nach 11 min konnte die Abspaltung des cyclischen Sulfinamids (4) detektiert werden, die entstehende Thiolat-Spezies (5) jedoch nicht. Nach 11 min sank die Signalintensität des SA-Monomers weiter auf 20 % ab. Die Signalintensität des Thiosulfinatesters nahm erwartungsgemäß ebenfalls ab, während bereits nach 11 min das Disulfid-Signal (6) bei 289 m/z detektiert wurde. Das Disulfid wurde durch die Reaktion des Thiolats, mit SA oder der korrespondierenden Sulfensäure gebildet. Nach 30 min konnte ausschließlich die Disulfid-Spezies bei 289 m/z nachgewiesen werden, sie war gleichzeitig das Edukt zur Synthese des Modellpeptids SA (siehe Abb. 2.1). Die Sulfensäure oder die Thiolat-Spezies konnten auch im Anionenmodus nicht nachgewiesen werden. Die massenspektrometrischen Daten untermauerten die Beobachtungen der zeitabhängigen Absorptionsänderung bei 249 nm (Abb. 3.2B). Die massenspektrometrische Analyse hat zudem gezeigt, dass die Umwandlung von SA (1) in die korrespondierende Sulfensäure (2) bei pH 7,4 keiner sofortigen, sondern eher einer stufenweisen Umwandlung entspricht, da auch nach 11 min noch fast 20 % SA vorhanden war. Unter Einbeziehung der massenspektrometrischen Daten stimmt die initiale Abnahme der Absorption mit dem kontinuierlichen Einbruch der Intensität des monomeren SA Signals bei 355 m/z überein. Die anschließende Zunahme

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

der Absorption, die bei pH 7,9 nach etwa 10 min auftrat, bei pH 7,4 in geringerem Maße nach etwa 15 min, konnte durch die Bildung der Thiolat-Spezies (5) erklärt werden. Diese Spezies konnte massenspektrometrisch nicht detektiert werden, da das Thiolat mit Spezies (1) oder (2) direkt zum Disulfid abreagiert ist, was auch mit der erneuten Absorptionsabnahme bei 249 nm in Abbildung 3.2B übereinstimmt. Zusammenfassend wurden die, durch NMR- und UV-Vis-Spektroskopie sowie durch ESI-MS/MS-Analyse erhaltenen Ergebnisse, durch den zuvor von Carroll *et al.* [160] beschriebenen Reaktionsmechanismus untermauert. Die Ringöffnung von SA zur korrespondierenden Sulfensäure in wässriger Umgebung (33 % ACN und 67 % PBS-Puffer) ist pH-abhängig und folgt einer Kinetik pseudoerster Ordnung mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von $k=8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von SA und Dim in 33 % ACN und 67 % PBS pH 7,4 wurde ebenfalls massenspektrometrisch bestimmt (siehe Abb. S7). Es wurden Messungen bei einer konstanten SA-Konzentration von 0,1 mM und variablen Dim-Konzentrationen zwischen 0,5-2 mM durchgeführt und die relativen Intensitäten gefittet (Abb. S7A). Aus den Steigungen der Fits ergaben sich die k_{obs} -Werte. Die k_{obs} -Werte wurden gegen die entsprechende Dim-Konzentration aufgetragen und durch lineare Regression gefittet (Abb. S7B). Die Steigung der Geraden entsprach der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen Dim und der korrespondierenden Sulfensäure von SA und lag bei $k=15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die literaturbekannte Geschwindigkeitskonstante lag bei $k=12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [160], wodurch die verwendete massenspektrometrische Methode zur kinetischen Analyse validiert und etabliert werden konnte. Aufgrund der ähnlichen k -Werte könnte die Reaktion auch direkt zwischen Dim und SA abgelaufen sein, was jedoch aufgrund der schlechten Unterscheidbarkeit der resultierenden Addukte nicht nachgewiesen werden konnte. Sinnvoll ist der Gedanke, da cyclisches Sulfenylamid und Sulfensäure im Gleichgewicht vorliegen.

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSAUREN UND SULFENYLAMIDEN

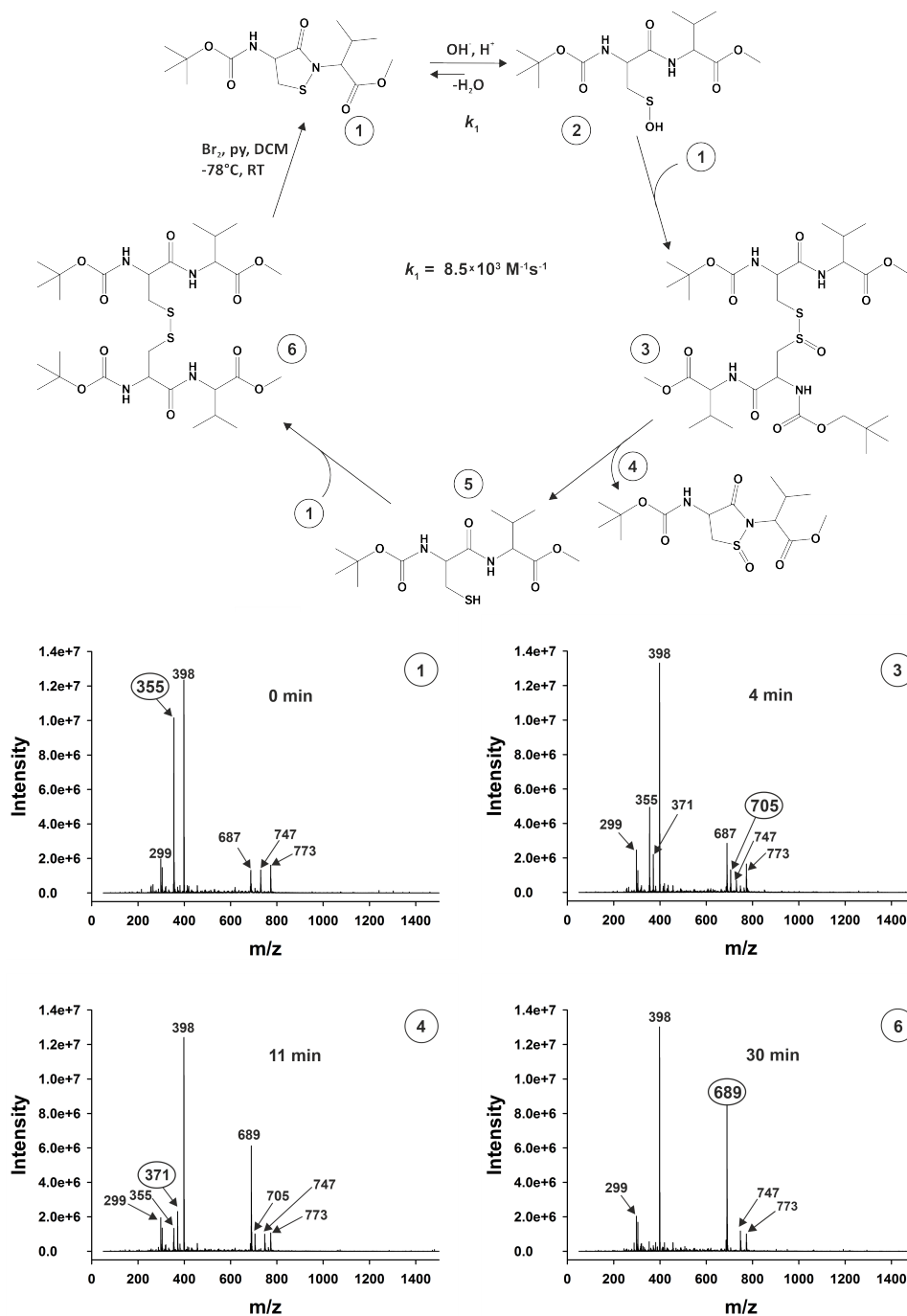


Abbildung 3.4: ESI-MS-Analyse der Umwandlung von 0,1 mM SA in 33 % ACN und 67 % PBS2 bei RT. Möglicher Reaktionsmechanismus der Umwandlung von SA (1) zur Disulfidform (6) (oben). Repräsentativen Massenspektren des Reaktionsgemisches zu den angegebenen Zeitpunkten (unten). Die Proben wurden nach 0, 4, 8, 11, 16, 24 und 30 min entnommen und mit ACN auf 10 μM verdünnt. Es wurde 1 min im Kationenmodus gemessen. Dabei wurde das Na^+ -koordinierte Monomer und Dimer von SA (1) bei 355 bzw. 687 m/z gefunden, das Na^+ -koordinierte Monomer des Thiosulfinatesters (3) bei 705 m/z, das Na^+ -koordinierte Monomer des cyclischen Sulfinamids (4) bei 371 m/z und das Na^+ -koordinierte Monomer des Disulfids (6) bei 689 m/z. Sulfensäure und Thiolat-Spezies konnten nicht detektiert werden. Die Signale bei 229, 398, 747 und 773 m/z konnten dem Puffer PBS2 zugeordnet werden [1].

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

Als nächstes wurde die direkte Reaktion zwischen SA und Dim massenspektrometrisch analysiert. Wie in Kapitel 3 beschrieben wurde die Reaktion in ACN mit einem Wassergehalt von etwa 570 μM bei einem $\text{pH} \approx 5$ durchgeführt, um die Ringöffnung zur Sulfensäure auszuschließen. In Abbildung 3.5A sind die gemittelten Signale der kontinuierlichen Messung zu Beginn der Reaktion von 0,1 mM SA und 0,1 mM Dim zwischen 0-10 min und zum Ende der Reaktion zwischen 50-60 min dargestellt. SA lag als Monomer bei 355 m/z und als Dimer bei 687 m/z jeweils an Na^+ koordiniert vor. Das SA-Dim Addukt lag als Monomer bei 495 m/z oder als Dimer bei 967 m/z jeweils an Na^+ koordiniert vor. Zwischen Reaktionsbeginn und -ende nahmen die Eduktsignale 355 und 687 m/z erwartungsgemäß ab, während die Produktsignale 495 und 967 m/z zunahmen. Diese kontinuierlichen über 60 min wurden bei einer konstanten SA-Konzentration und variablen Dim-Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,25 mM durchgeführt. Die gemittelten, gefitteten, relativen Intensitäten sind in Abbildung 3.5B dargestellt. Die zugehörigen k_{obs} -Werte wurden aus den exponentiellen Fits bestimmt und gegen die jeweilige Dim-Konzentration aufgetragen. Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Reaktion zwischen SA und Dim entspricht der Steigung der linearen Regression und liegt bei $k=2,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In einem Fragmentierungsexperiment konnte nachgewiesen werden, dass zwischen SA und Dim eine kovalente Bindung vorliegt (Abb. S6). SA reagiert in deuteriertem CD_3CN nicht mit Dim, wie zuvor mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (Abb. S3). Massenspektrometrisch konnte zudem gezeigt werden, dass auch in wasserfreiem ACN keine Reaktion mit Dim stattfindet (Abb. S5A). Eine Reaktion zwischen Dim und SA wurde bisher nur in ACN mit mikromolaren Mengen H_2O (570 μM) bei $\text{pH} \approx 5$ beobachtet (siehe Abbildungen: 3.5A, S5B, S6). Die Anwesenheit von H_2O ist also Voraussetzung für eine direkte Reaktion zwischen SA und Dim. Durch Zugabe höherer H_2O -Konzentrationen bis 900 μM wurde die Reaktionskinetik nicht beeinflusst. Sind nur Spuren von H_2O im ACN enthalten (gelbe Kreise) ist die Reaktionsgeschwindigkeit langsamer und es wird weniger Addukt gebildet (Abb. S5B). SA ist in Abwesenheit von Dim in ACN über längere Zeit stabil und bildet bei $\text{pH} \approx 5$ trotz der Anwesenheit von H_2O keine Sulfensäure.

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

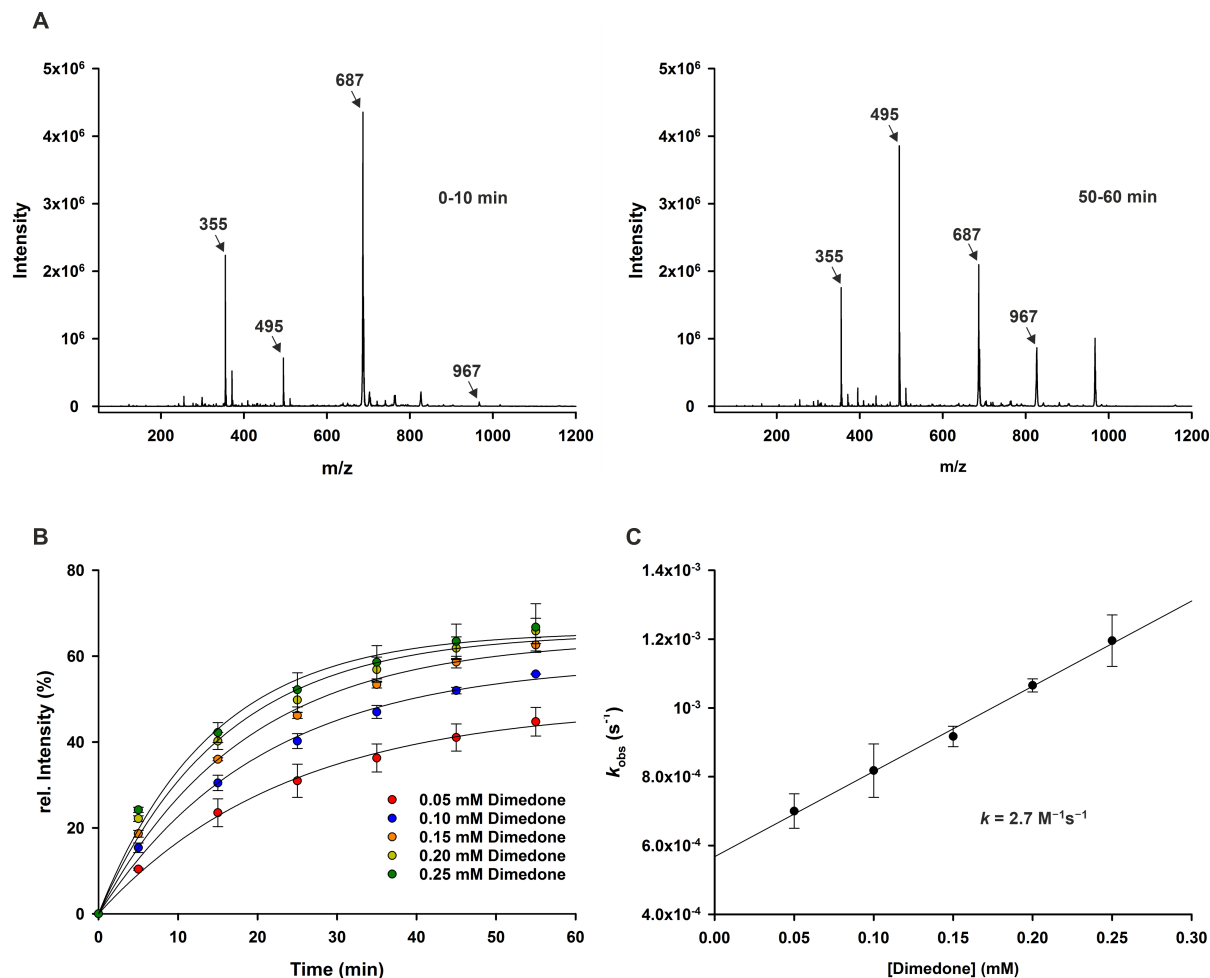


Abbildung 3.5: Kinetische Analyse der direkten Reaktion zwischen SA und Dimedon in ACN mit 570 μM H_2O ($\text{pH}\approx 5$) bei 25 $^\circ\text{C}$. A) Zeitaufgelöste ESI-MS-Analyse der Reaktion zwischen 0,1 mM SA und 0,1 mM Dimedon. Repräsentative gemittelte Massenspektren bei 0-10 min (links) und 50-60 min (rechts) zeigen die Umwandlung von Natrium-koordiniertem monomeren und dimerem SA (355 bzw. 687 m/z) in Natrium-koordinierte monomere und dimere SA-Dimedon-Addukte (495 bzw. 967 m/z). B) Der prozentuale Anteil an Dimedon-markiertem SA wurde aus der Signalintensität berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Intensitäten der Eduktsignale bei 355 und 687 m/z und der Produktsignale bei 495 und 967 m/z wurden aus den gemittelten Spektren bestimmt. Die Summe aller vier Signale wurde als 100 % angenommen. C) Die k_{obs} -Werte aus B) wurden gegen die Dim-Konzentration aufgetragen. Aus der Steigung der linearen Regression wurde die angegebene Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Messungen [1].

H_2O steigert die Reaktivität des Dim-Moleküls gegenüber SA, sodass eine direkte Reaktion unter diesen Bedingungen möglich ist. Der $\text{p}K_{\text{S}}$ -Wert von Dim liegt bei etwa 5,2. Bei $\text{pH}\approx 5$ wird Dim als Protonendonator fungieren und etwa zur Hälfte deprotoniert vorliegen.

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

H₂O hingegen fungiert als Protonen-Akzeptor. Nach dem Protonenaustausch liegt Dim als Nukleophil vor, welches SA am elektrophilen Schwefelatom angreifen kann, es kommt zu SA-Dim-Adduktbildung. Die Konzentration des Dim-Nukleophils, welches durch geringe Mengen an vorhandenem H₂O gebildet wird, ist vermutlich geschwindigkeitsbegrenzend. Messungen bei konstanter Dim-Konzentration und variablen SA-Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,2 mM zeigten keinen Einfluss der SA-Konzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. S5C). Es handelt sich erneut um eine Reaktionskinetik pseudoerster Ordnung, die allein von der Dim-Konzentration abhängig ist. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von SA oder der korrespondierenden Sulfensäure mit Dim sind vergleichbar und liegen in derselben Größenordnung ($k_4=15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_5=2,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Vermutlich könnte k_5 unter basischen Bedingungen noch höher sein, da mit dem höheren pH-Wert auch die Konzentration an Dim-Carbanionen steigt. (übernommen aus [1])

3.1.6 Kinetische Stopped-flow Analyse der Reaktion von SA mit GSH und Dimedon als potenzielle Konkurrenz-Nukleophile

GSH ist ein intrazelluläres Nukleophil, das unter physiologischen Bedingungen in niedrigen millimolaren Konzentrationen in der Zelle vorhanden ist [62], [61]. GSH reagiert mit nicht peptidischen Model-Sulfenylamiden und stellt daher ein relevantes Konkurrenz-Nukleophil zu OH⁻ und Dimedon dar [46]. Daher wurde im nächsten Schritt die zugrunde liegende Kinetik der Reaktion zwischen SA und GSH, sowie die potenziellen Konkurrenzreaktionen zwischen GSH, OH⁻ oder Dim mit SA untersucht. Zunächst wurde die Kinetik der Reaktion zwischen 0,1 mM SA in ACN und variablen Konzentrationen zwischen 0,05-0,5 mM GSH in PBS pH 7,4 mittels Stopped-flow Spektroskopie untersucht. Die Reaktion lief innerhalb von Millisekunden ab und war zu schnell, um beispielsweise mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt zu werden. Die initialen Absorptionsänderungen bei 249 nm folgten einer Kinetik pseudoerster Ordnung, die zugehörigen k_{obs} -Werte wurden durch die Steigung der linearen Regression bestimmt. Die schwarze Messkurve zeigt die initiale Absorptionsänderung bei 249 nm der Reaktion von SA in ACN mit PBS

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

pH 7,4 ohne GSH, als Negativ-Kontrolle. Die Absorption blieb innerhalb der ersten Sekunde der Reaktion erwartungsgemäß konstant (Abb. 3.6A). Aus der kinetischen Analyse der Ringöffnungsreaktion von SA ist bekannt, dass eine vollständige Umwandlung von SA bei pH 7,4 ca. 10 min dauert. Es wird deutlich, dass die Disulfid-Bildung zwischen SA und GSH um einige Größenordnungen schneller abläuft als die Ringöffnung durch die Reaktion von SA mit OH^- , mit $k=8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Um die Kinetiken dieser beiden Reaktionen vergleichen zu können wurden in Abbildung 3.6B die ermittelten k_{obs} -Werte von zwei unabhängigen Replikaten gegen die jeweilige GSH-Konzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden durch lineare Regression gefittet und aus der Steigung der Geraden die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung bestimmt, sie lag bei $k=3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Abb. 3.6B). GSH dominierte OH^- als Konkurrenz-Nukleophil um die Reaktion mit SA um zwei Größenordnungen. Unter der Berücksichtigung, dass GS^- das eigentliche Nukleophil in dieser Reaktion war und GSH einen $\text{p}K_{\text{S}}$ -Wert von 8,7 oder 8,9 hat, bedeutet dies, bei pH 7,4 lagen 3-5 % GSH deprotoniert als GS^- vor. Die pH-unabhängige Geschwindigkeitskonstante konnte aufgrund dessen zu $k=8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $k=1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bereinigt werden.

Im darauffolgenden Experiment wurde die Competition zwischen GSH und Dim weiter untersucht. In Abbildung 3.6C sind oben Absorptionsspektren verschiedener Reaktionen zu sehen. Die Absorptionsmaxima liegen bei 210 nm für GSH, für SA bei 249 nm und bei 280 nm für Dim. Die untere Abbildung zeigt die zugehörigen initialen Absorptionsänderungen bei 249 nm. Um Nebenreaktionen auszuschließen, wurde 1 mM GSH in PBS mit ACN (lila Dreiecke), 0,1 mM Dim in ACN mit PBS (dunkelblaue Dreiecke) und 1 mM GSH in PBS mit 0,1 mM Dim in ACN (cyanfarbene Dreiecke) als Negativkontrollen gemessen. Die Absorptionsspektren zeigen für diese Messungen entweder ein Maximum bei 210 nm (lila), bei 280 nm (dunkelblau) oder bei beiden Wellenlängen (cyan). Auch die Absorptionsänderungen bei 249 nm sind unauffällig, daher sind Nebenreaktionen auszuschließen.

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

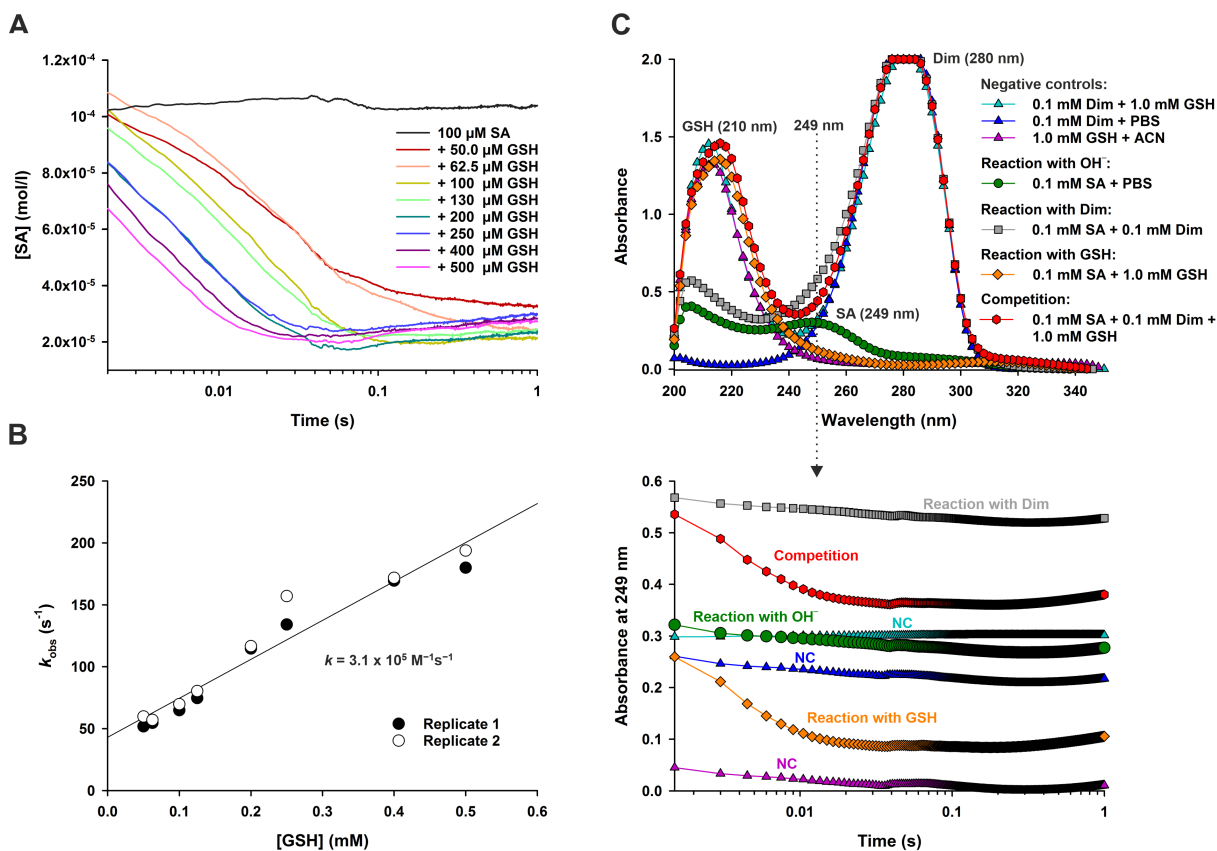


Abbildung 3.6: Kinetische Stopped-flow Analyse der Reaktion zwischen GSH und SA in 50 % PBS pH 7,4 und 50 % ACN. A) Repräsentative Stopped-flow Messungen der Reaktion zwischen 0,1 mM SA in ACN und variablen GSH-Konzentrationen zwischen 0,05-0,5 mM in PBS pH 7,4. Die schwarze Messkurve zeigt eine Negativkontrolle von 0,1 mM SA in ACN mit PBS ohne GSH. B) Auftragung der k_{obs} -Werte pseudoerster Ordnung der initialen Absorptionsänderung der Messkurven aus A gegen die jeweilige GSH-Konzentration für zwei unabhängige Replikate. Die Reaktionsgeschwindigkeit zweiter Ordnung, wurde aus der Steigung des linearen Fits des Sekundärplots ermittelt. C) Absorptionsspektren zwischen 200-350 nm (oben) und die zugehörigen initialen Absorptionsänderungen bei 249 nm (unten) repräsentativer Stopped-flow Messungen der Reaktionen zwischen 0,1 mM SA in ACN und a) 1 mM GSH, b) 0,1 mM Dim oder c) GSH und Dim in PBS. Die grünen Kreise repräsentieren die Messergebnisse der Reaktion von SA in 50 % ACN und 50 % PBS. Als Negativ-Kontrollen wurde Dim in ACN mit PBS, GSH in PBS mit ACN und Dim in ACN und GSH in PBS zusammen gemessen [1].

Die Reaktion von 0,1 mM SA in ACN mit OH⁻-Ionen im PBS-Puffer (grüne Kreise) wurde ebenfalls gemessen. Wie bereits zuvor erwähnt ist die Ringöffnungsreaktion von SA um zwei Größenordnungen langsamer als die Reaktion von SA und GSH. Daher wird keine Ringöffnungsreaktion im betrachteten Zeitfenster beobachtet.

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

Basierend auf dem ermittelten Extinktionskoeffizienten für SA und der eingesetzten Konzentration von 0,1 mM kann die initiale Absorption berechnet werden. Sie beträgt 0,324 und entspricht dem Absorptionsmaximum der grünen Messkurve bei 249 nm. Auch für die Messung von 0,1 mM SA mit 0,1 mM Dim wurde im betrachteten Zeitfenster erwartungsgemäß keine Reaktion beobachtet. Mit einer Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von $k=2,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ist diese fünf Größenordnungen langsamer als die Reaktion von SA mit GSH. Daher war zu erwarten, dass GSH auch Dim als Konkurrenz-Nukleophil übertrifft, was sich auch durch einen Vergleich der Messkurven bestätigt hat. Die Absorptionsänderung bei 249 nm ist für die Reaktion von 0,1 mM SA und 1 mM GSH (orangefarbene Quadrate) und die Kompletionsreaktion zwischen 0,1 mM SA, 1 mM GSH und 0,1 mM Dim (rote Kreise) identisch. Diese Beobachtung bestätigt, dass die An- oder Abwesenheit von Dimedon im Reaktionsgemisch keinen Einfluss auf die Reaktion von SA mit GSH hat. GSH ist fähig sowohl OH^- , als auch Dim als Nukleophil um mehrere Größenordnungen kinetisch zu übertreffen. (übernommen aus [1], [167])

3.1.7 GSH Kompetitions-Assay mittels Reversed-Phase

HPLC-Analyse

Ziel des GSH-Kompetitions-Assays war es, den bevorzugten Reaktionspartner einer Peptid-Cysteinyl-Sulfensäure zwischen GSH und Dimedon zu bestimmen. Die Sulfensäure GSOH wurde in einem einfachen Experiment durch Zugabe von H_2O_2 *in situ* aus GSH gebildet (Abb. 3.7A). Dabei fungierte GSH nicht nur als Edukt für die Bildung der Glutathion-Sulfensäure, sondern auch als Konkurrenz-Nukleophil für Dimedon bezüglich der Reaktion mit GSOH. In einem ersten Experiment wurden die Retentionszeiten der Einzelsubstanzen mittels HPLC bestimmt. Diese lagen für GSH bei 2,2 min, für GSSG bei 3,7 min und für Dim im Mittel bei 13,7 min. Bei 210 nm wurde das GSH-Signal detektiert, bei 220 nm das GSSG-Signal und das Dim-Signal bei 280 nm. Außerdem wurden Referenzmessungen mit GSH und H_2O_2 , Dim und H_2O_2 und GSH und Dim untersucht, um mögliche Nebenreaktionen auszuschließen. Nur bei der Referenzmessung zwischen GSH und H_2O_2 wurde

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

erwartungsgemäß ein GSSG-Peak beobachtet. Bei den anderen Referenzmessungen wurden keine zusätzlichen Signale und damit keine unerwünschte Nebenreaktion festgestellt.

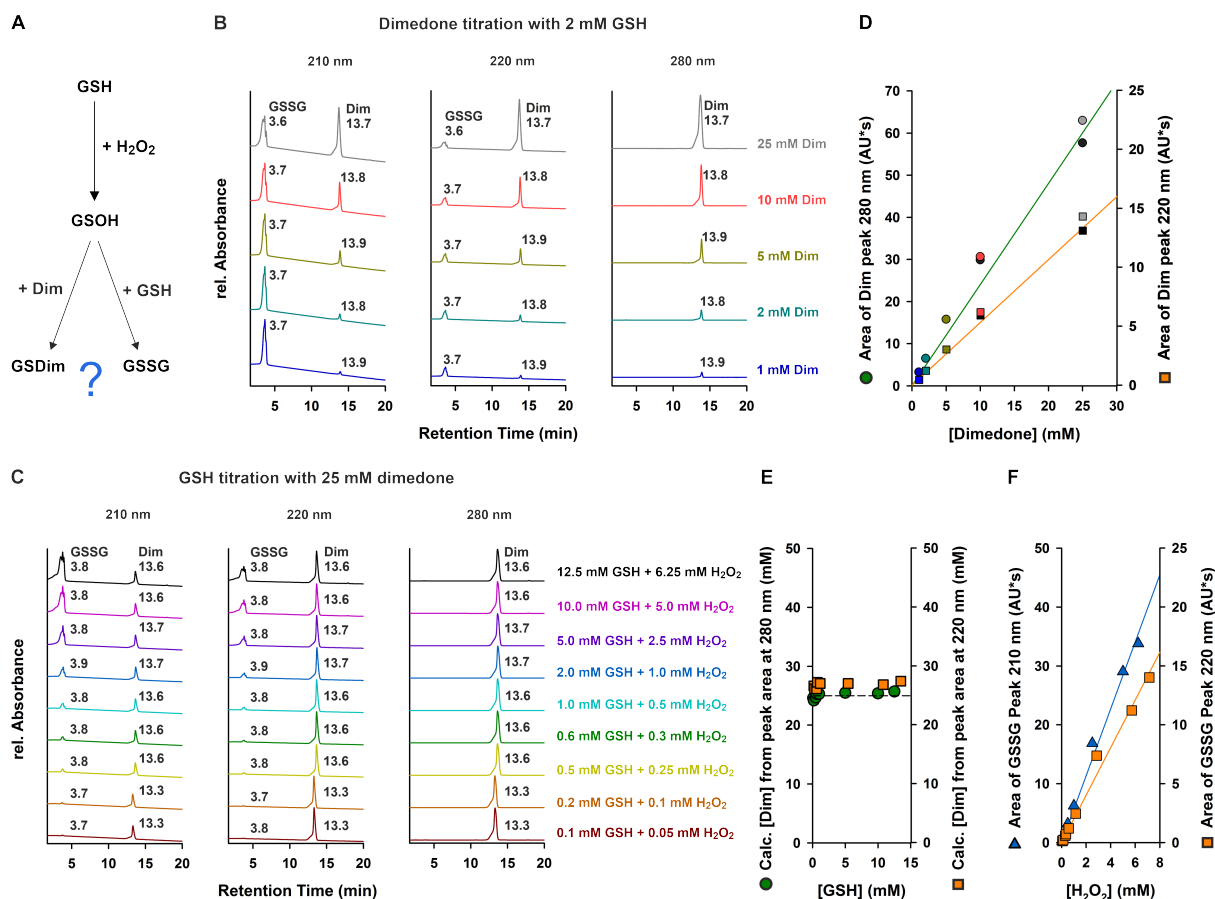


Abbildung 3.7: A) Prinzip des GSH-Kompetitions-Assays. Die Glutathion-Sulfensäure GSOH wurde *in situ* durch tropfenweise Zugabe von 0,5 eq H₂O₂ zu einer Lösung mit 1 eq GSH und variablen Konzentrationen von Dimedon (Dim) in PBS pH 7,4 bei RT gebildet. Als mögliche Reaktionsprodukte wurden GSSG und/oder das GSDim-Addukt erwartet. B) HPLC-Endpunktanalyse der Reaktionen von 2 mM GSH mit 1 mM H₂O₂ und den angegebenen Dimedon-Konzentrationen. Gezeigt sind die Retentionszeiten bei drei Wellenlängen (210, 220 und 280 nm) von repräsentativen Chromatogrammen aus einem von zwei unabhängigen Experimenten. C) HPLC-Endpunktanalyse von Reaktionen verschiedener GSH-Konzentrationen mit je 0,5 Äquivalenten H₂O₂ und einem konstanten Überschuss von 25 mM Dimedon. D) Kalibrierkurve für variable Dimedon-Konzentrationen bei 220 und 280 nm aus den Chromatogrammen in B. E) Quantifizierung des Dim-Verbrauchs in C, basierend auf der Kalibrierkurve (B). F) Die Bildung von GSSG in C ist linear abhängig von der zugegebenen Menge an H₂O₂ [1].

Die Endpunktanalyse der Hauptreaktion zwischen 2 mM GSH, 1 mM H₂O₂ und 1 mM Dimedon zeigte keine Reaktion zwischen GSOH und Dim und damit keine Adduktbil-

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

dung. Stattdessen fand eine fast vollständige Umsetzung von GSH zu GSSG statt (Abb. S8A). Um eine zu geringe Konzentrationen an Dim als Ursache für die ausbleibende Adduktbildung auszuschließen, wurde eine Dimedontitration durchgeführt. Dabei wurde die Konkurrenzreaktion zwischen 2 mM GSH mit 1 mM H_2O_2 und verschiedenen Dim-Konzentrationen zwischen 1-25 mM untersucht (Abb. 3.7B). Auch bei einem 12,5-fachen Dim-Überschuss (25 mM Dim) wurde keine Adduktbildung beobachtet. Bei 25 mM war die Löslichkeitsgrenze von Dim unter den gegebenen Reaktionsbedingungen erreicht. Zur weiteren Erhöhung des Dim-Überschusses wurde eine GSH-Titration durchgeführt mit GSH-Konzentrationen zwischen 0,1-12,5 mM GSH, 0,5 eq H_2O_2 (bezüglich der GSH Konzentration) und einer konstanten Dim-Konzentration von 25 mM (Abb. 3.7C). Doch auch bei dem so erzeugten 250-fachen Dim-Überschuss wurde kein GS-Dim Addukt gebildet. Bei allen Reaktionen wurde nur der vollständige Umsatz zu GSSG mit einem Signal bei 3,7 min und dem unveränderten Dim-Signal bei 13,7 min beobachtet. Zur endgültigen Widerlegung der GS-Dim-Adduktbildung wurden die Primärdaten genauer analysiert. Wie zuvor beschrieben wurden Kalibriergeraden bei 220 nm und 280 nm aus den Signalflächen der Dim-Referenzmessungen erstellt. Der Vergleich der Messdaten der Dim-Signalflächen der Dimedon-Titration bei 220 und 280 nm mit den entsprechenden Kalibriergeraden zeigt, dass kein Verbrauch von Dimedon stattgefunden hat (Abb. 3.7D). Die Dim-Signalflächen wurden durch die Reaktion nicht verändert. Diese Beobachtung wurde auch durch die Berechnung der Dim-Konzentration aus den Dim-Signalflächen der GSH-Titration untermauert. Die errechneten Konzentrationen lagen bei 220 nm und 280 nm stets bei den initial eingesetzten 25 mM Dim (Abb. 3.7E). Die Auftragung der GSSG-Signalflächen bei 210 nm und 220 nm, als Reaktionsprodukt, gegen die H_2O_2 -Konzentration lieferte zudem einen linearen Zusammenhang (Abb. 3.7F). Mit steigender Wasserstoffperoxidkonzentration steigt also auch die Menge an gebildetem GSSG, was darauf hindeutet, dass GSSG das einzige Reaktionsprodukt ist. Die Bildung eines Dim-Addukts mit GSOH kann daher ausgeschlossen werden.

Durch ein Derivatisierungsexperiment sollte ausgeschlossen werden, dass sich ein poten-

3.1. KOMPETITIVE KINETISCHE ANALYSE DER DETEKTIONSREAKTION VON SULFENSÄUREN UND SULFENYLAMIDEN

zielles GS-Dim Addukt signal mit der gleichen Retentionszeit unter dem GSSG-Signal verbirgt. Um dies festzustellen, wurde das GSSG-Signal durch Zugabe von 5 mM DTT verschoben, indem GSSG wieder vollständig zu GSH reduziert wurde. Es blieb kein potenzielles Addukt-Signal zurück (Abb. S8B). Auch der in Abbildung S8C gezeigte Signalvergleich der Referenzmessungen von GSSG (1 mM) und Dim (25 mM) mit den jeweiligen Messsignalen der Endpunktanalysen nach Ablauf der Konkurrenzreaktion zeigte, dass die Signale in Form und Verlauf identisch sind. Zusammengefasst konnte sich Dimedon nicht gegen das Konkurrenz-Nukleophil GSH in der Reaktion um die *in situ* gebildete Glutathion-Sulfensäure GSOH durchsetzen. Weder bei physiologischen GSH-Konzentrationen oder üblicherweise eingesetzten Dim Konzentrationen noch bei einem 250-fachen Dimedon Überschuss konnte die Bildung des GS-Dim Addukts beobachtet werden (Abb. 3.7 und S8). Die Abbildungen S8D und E verdeutlichen, dass nach Ablauf der Konkurrenzreaktion kein Dimedon verbraucht wurde. Abbildung 3.7F verdeutlicht, dass sich die Reaktivität ausschließlich auf die Reaktion von GSH mit GSOH zum Glutathion-Disulfid GSSG beschränkte. Da die Referenzsignale von GSSG und Dim mit den Messsignalen identisch waren und auch die Verschiebung des GSSG-Signals durch DTT zu GSH kein Addukt signal zum Vorschein gebracht hat, konnte eine GS-Dim-Adduktbildung ausgeschlossen werden. Unter Berücksichtigung des bis zu 250-fachen Überschusses von Dimedon und der allgemeinen Nachweisgrenze der HPLC-Methode, ist davon auszugehen, dass die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von GSH mit GSOH um mindestens vier Größenordnungen höher sein muss als die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von Dim mit GSOH. (übernommen aus [1])

3.2 Untersuchung der oxidativen Stress-Hypothese in asexuellen Blutstadien von *P. falciparum*

3.2.1 Klonierung der pHBIRH Plasmide mit neuer IMS-Zielsequenz

Zur kompartimentspezifischen Bildung von Wasserstoffperoxid im Cytosol, der Verdauungsvakuole, der mitochondrialen Matrix und dem mitochondrialen Intermembranraum durch das Redoxenzym *RgDAAO* nach Zugabe einer D-Aminosäure, wurden von M. sc. Britta Husemann bereits alle benötigten Plasmide vollständig kloniert und bereits teilweise transfiziert. Nach Transfektion der Plasmide in den *Pf3D7*^{WT} Stamm, wurden transgene Stämme erhalten, die das entsprechende Plasmid episomal aufgenommen hatten. Es wurden Plasmide mit 3xHA-Tag und roGFP2-Tag kloniert. Der Tag war jeweils zwischen der Zielsequenz und dem Gen *RGDAAO* codierend für das Redoxenzym *RgDAAO* lokalisiert (siehe Abb. 2.4). Bei den Konstrukten Cyto *RgDAAO*^{WT} und Cyto *RgDAAO*^{R285A} ist der 3xHA-Tag *N*-terminal, da hier keine Zielsequenz verwendet wurde. Die Westernblot-Analysen der Stämme mit 3xHA-getaggttem Redoxenzym, bei denen das episomale Plasmid die Dihydroorotatdehydrogenase als Zielsequenz zum Transport der *RgDAAO*^{WT} oder *RgDAAO*^{R285A} in den mitochondrialen Intermembranraum verwendete, ergaben keine Signale. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Dihydroorotatdehydrogenase durch die NADH-Cytochrom *b5*-Reduktase als neue Zielsequenz, in den Plasmiden mit 3xHA- bzw. roGFP-Tag, ersetzt. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Zunächst wurde aus einem geeigneten Startkonstrukt im Klonierungsvektor pUC57-Simple, die alte IMS-Zielsequenz (IMS_{old}) mittels Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI*-HF und *BamHI*-HF entfernt und das verbleibende Plasmidrückgrat mit der neuen synthetisierten NADH-Cytochrom *b5*-Reduktase (IMS_{new}) ligiert. Zur Transfektion in *P. falciparum* ist der pUC57-Simple-Vektor ungeeignet. Daher wurde das benötigte Modul bestehend aus der neuen Zielsequenz, dem Tag und dem *RGDAAO*^{WT}-Gen

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

bzw. *RGDAAO*^{R285A}-Gen durch die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *SacI* ausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 2.3A). Zur Transfektion in den *Pf3D7*^{WT} Stamm wurde der pHBIRH-Vektor eingesetzt (Abb. 1.7), aus dem mittels Restriktionsverdau mit *SpeI* und *SacI*, das *RENILLA-LUCIFERASE*-Gen entfernt wurde (Abb. 2.3B). Das zurückbleibende pHBIRH-Plasmidrückgrat wurde mit dem in Schritt A isolierten Modul mittels Ligation zum gewünschten Plasmid zusammengeführt. Auf diese Weise konnten die vier Konstrukte IMS 3xHA *RgDAAO*^{WT}, IMS 3xHA *RgDAAO*^{R285A}, IMS roGFP2 *RgDAAO*^{WT} und IMS roGFP2 *RgDAAO*^{R285A} erfolgreich kloniert werden. Nach der Transformation in *E. coli* XL1-Blue kompetente Zellen wurde die in einer Midi-Preparation aufgereinigte und sterilisierte Plasmid-DNA korrekt sequenziert und in einen *Pf3D7*^{WT} Stamm transfiziert. Die Sequenziererergebnisse der Plasmide sind im Anhang zusammengefasst. Die erhaltenen transgenen Stämme sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst.

3.2.2 Westernblot-Analyse zum Nachweis der Bildung des Redoxenzym *RgDAAO*

Die erfolgreiche Bildung der *RgDAAO* wurde durch Westernblot-Analyse geprüft. In Abbildung 3.8 sind repräsentative Westernblots der Stämme mit Cyto-, MitoM- und IMS *RgDAAO*^{WT} oder *RgDAAO*^{R285A} abgebildet. Der 3xHA-Tag liegt auf dem aufgenommenen Plasmid jeweils zwischen der Zielsequenz und dem Transgen *RGDAAO* codierend für das Redoxenzym. Bei den Stämmen mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder Cyto *RgDAAO*^{R285A} ist der Tag jeweils *N*-terminal. Die Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder Cyto *RgDAAO*^{R285A} wiesen beide eine Bande auf, die erwartungsgemäß bei 43,8 kDa liegt. Das entspricht der Größe des gebildeten Proteins *RgDAAO* mit 3xHA-Tag (berechnet 43,8 kDa). Zudem wurde für die Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder Cyto *RgDAAO*^{R285A} keine Zielsequenz (TS) verwendet, die durch Proteasen abgespalten werden konnte, was in einer einzigen Bande resultierte. Die Stämme mit *RgDAAO*^{R285A} bildeten das Protein in vergleichbaren Mengen, nur in einer inaktiven Form, aus.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

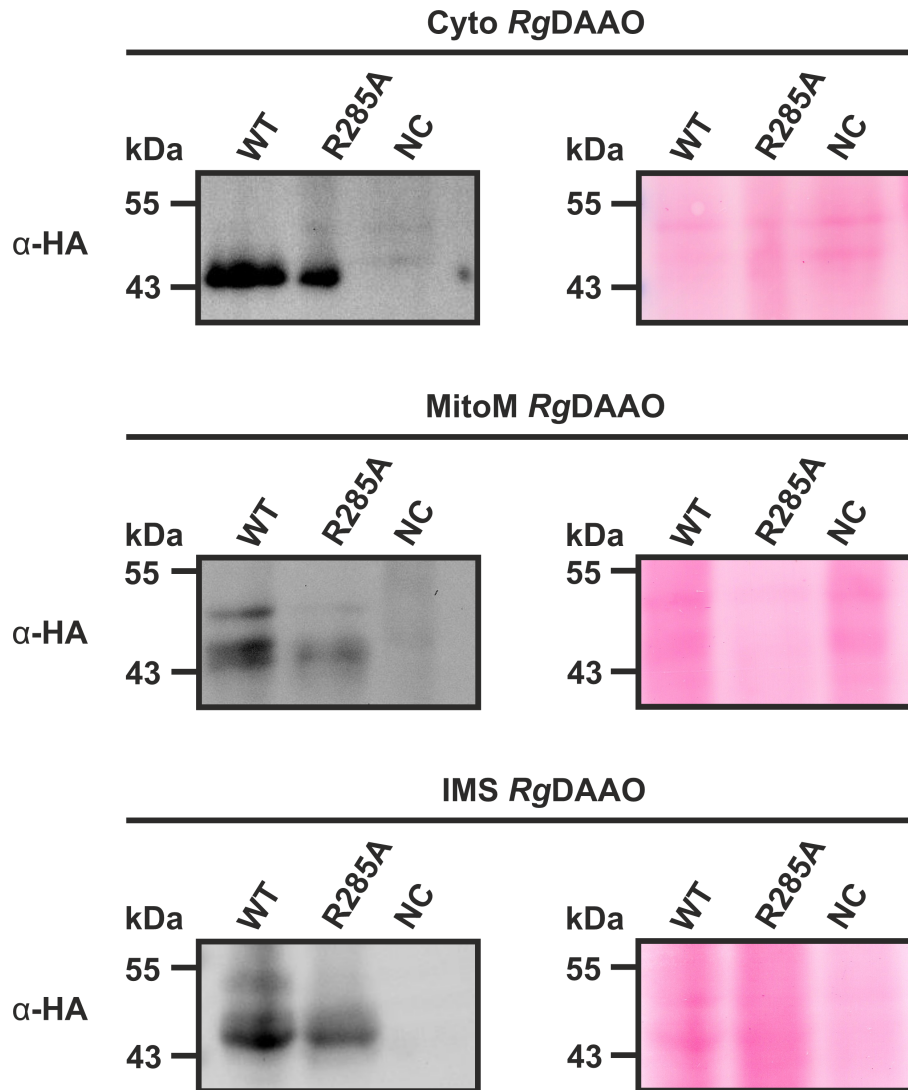


Abbildung 3.8: Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto, Mitom und IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A}. Die Westernblot-Proben wurden mittels Magnetsäulenisolierung aus 40 ml Kultur bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin und einer Parasitämie > 5 % gewonnen. Von jeder Lysatprobe wurden 3×10^7 Parasiten in einem 10 %igen SDS-Gel geladen und mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und zunächst zur Ladungskontrolle mit Ponceau-Reagenz gefärbt (rechts) bzw. anschließend mit einem α -HA Primärantikörper (Hase), sowie einem α -Hase Sekundärantikörper behandelt (links). Von links nach rechts sind jeweils 3×10^7 Parasiten folgender Stämme aufgetragen: 3D7 *RgDAAO*^{WT}, 3D7 *RgDAAO*^{R285A} und die Negativkontrolle (NC). Für den Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT/R285A} wurde eine Bande bei 43,8 kDa erwartet, der Stamm mit Mitom *RgDAAO*^{WT/R285A} zeigt drei Banden bei 43,8 kDa (nach Abspaltung der TS), $\approx 46,0$ kDa (nach teilweiser Abspaltung der TS) und 51,0 kDa (Vorläuferprotein) und der Stamm mit IMS *RgDAAO*^{WT/R285A} zeigt zwei Banden bei 43,8 kDa und 52,6 kDa (berechnete Größe: 50,4 kDa). Gezeigt sind repräsentative Westernblots aus 2 (Mitom) bzw. 3 (Cyto, IMS) unabhängigen Experimenten (Abb. S9).

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

Die Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} oder MitoM *RgDAAO*^{R285A} wiesen drei Banden im Westernblot, bei 43,8 kDa (nach Abspaltung der TS), \approx 46,0 kDa (nach teilweiser Abspaltung der TS) und 51,0 kDa (Vorläufer-Protein mit vollständiger TS) auf. Dieses Bandenmuster konnte durch eine teilweise bzw. vollständige Abspaltung der Zielsequenz MitoM durch Proteasen erklärt werden. Die Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} oder IMS *RgDAAO*^{R285A} wiesen zwei Banden auf, einmal bei 52,6 kDa (berechnete Größe: 50,4 kDa) für das vollständige Protein inklusive 3xHA-Tag und Zielsequenz (NADH-Cytochrom *b5* Reduktase¹⁻⁴⁹) und bei 43,8 kDa nach proteolytischer Abspaltung der TS. Auffällig ist, dass die Bande bei 52,6 kDa höher liegt als die berechnete Bande bei 50,4 kDa. Offenbar wurde das Laufverhalten des Enzyms hier durch die Eigenschaften der Peptide der IMS-Zielsequenz beeinflusst. Die Bande des Enzyms ohne IMS-Zielsequenz war viel stärker, als die des Vorläufer-Enzyms. Das spricht dafür, dass mit Import des im Cytosol gebildeten Enzyms in den mitochondrialen Intermembranraum die Zielsequenz in den meisten Fällen vollständig proteolytisch abgespalten wurde. Der 3xHA-Tag blieb scheinbar erhalten. Gleiches gilt für Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} oder MitoM *RgDAAO*^{R285A} deren die Zielsequenz teilweise oder vollständig abgespalten wurde. Die Negativkontrolle des pHBIRH-Vektors zeigte erwartungsgemäß kein Signal bei 43,8 kDa. Die erfolgreiche Bildung der *RgDAAO*^{WT} oder *RgDAAO*^{R285A} konnte in den untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Leider konnte keine Westernblotanalyse des Stammes mit DV *RgDAAO*^{R285A} gemacht werden, da er nicht erfolgreich transfiziert werden konnte. Die beschriebenen Ergebnisse konnten reproduziert werden (Abb. S9).

3.2.3 Quantitative Analyse der Blasticidin-abhängigen Bildung von *RgDAAO* für die transgenen Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder MitoM *RgDAAO*^{WT}

Durch einen bidirektionalen Promotor des pHBIRH-Vektors, das *var*-Intron aus *P. falciparum*, können das Transgen *RGDAAO* und der Resistenzmarker, das Blasticidin-*S-*

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

Deaminase-Gen, gleichzeitig exprimiert werden (siehe Abb. 1.7). Die Menge des gebildeten Redoxenzym *RgDAAO* war in Abhängigkeit der Blastocidin-Konzentration titrierbar. Eine höhere Blastocidin-Konzentration sorgte während der Kultivierung für die Selektion von Parasiten, die mehrere Kopien des Plasmids mit dem Resistenzmarker in sich trugen und damit resistenter gegenüber der hohen Konzentration des Selektionsantibiotikums waren. In Abbildung 3.9A sind Westernblots der Blastocidin-abhängigen Bildung von *RgDAAO* in den Stämmen mit Cyto *RgDAAO*^{WT} und MitoM *RgDAAO*^{WT} für Blastocidin-Konzentrationen zwischen 4-50 µg/ml abgebildet. Wie bereits erwähnt wurde für den Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} eine Bande des nativen Enzyms bei 43,8 kDa beobachtet, die Menge an gebildetem Redoxenzym *RgDAAO* nimmt erwartungsgemäß mit steigender Blastocidin-Konzentration zu, was auch durch die Quantifizierung in Abb. 3.9B (links) bestätigt wird. Der Anstieg ist jedoch nicht linear sondern sigmoidal und erreicht bereits bei 40 µg/ml Blastocidin eine Sättigungsgrenze. Die Bande bei 50 µg/ml ist zudem schwächer als die bei 40 µg/ml Blastocidin. Bei der Kultivierung wurde zudem beobachtet, dass die Parasiten bei einem Selektionsdruck von 50 µg/ml zwar noch lebensfähig waren, der Lebenszyklus jedoch retardiert war und eventuell die Anzahl der Merozoiten pro Schizont geringer waren. Morphologisch waren die Parasiten unverändert. Für die drei Banden des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{WT} bei 43,8 kDa (natives Enzym), ≈46,0 kDa und 51,0 kDa wurde mit zunehmender Blastocidin-Konzentration eine Zunahme der Bandenintensität beobachtet, die mit der zunehmenden Menge des Redoxenzym einhergeht (Abb. 3.9A, unten). Die Quantifizierung in Abbildung 3.9B (rechts) zeigt ebenfalls einen sigmoidalen Anstieg der Enzymmenge mit Sättigung bei bereits 40 µg/ml Blastocidin. Die oberste Bande bei 51,0 kDa ist schwächer als die unteren beiden. Auch hier ist die 40 µg/ml Bande die intensivste Bande.

Durch quantitative Analyse der Blastocidin-abhängigen Bildung von *RgDAAO* in den transgenen Stämmen mit Cyto *RgDAAO*^{WT} und MitoM *RgDAAO*^{WT} konnte die Titrierbarkeit der Transkription nachgewiesen werden.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

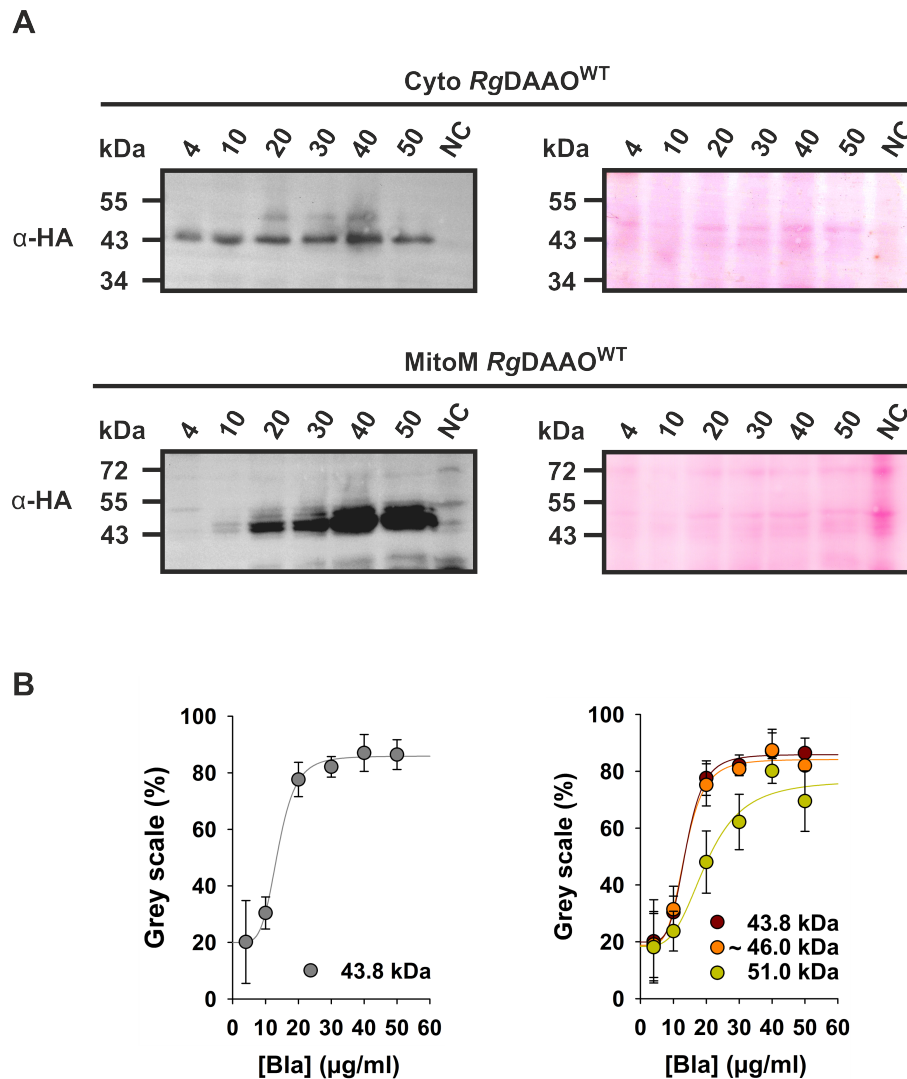


Abbildung 3.9: Quantitative Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} und MitoM *RgDAAO*^{WT} in Abhängigkeit von Blasticidin. A) Von jeder Lysatprobe wurden 3×10^7 Parasiten in einem 10 %igen SDS-Gel geladen und mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Die der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und zunächst mit Ponceau-Reagenz gefärbt (rechts) bzw. anschließend mit einem α -HA Primärantikörper vom Hasen, sowie einem α -Hase Sekundärantikörper behandelt (links). Die Blasticidinkonzentration wurde zwischen 4-50 $\mu\text{g/ml}$ variiert, als Negativkontrolle (NC) wurde der ursprüngliche pHBRH-Vektor (Abb. 1.7) ganz rechts aufgetragen. Die erwartete Größe des nativen Enzyms des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} beträgt 43,8 kDa. Für den Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} liegt die Größe des Enzyms inklusive MitoM Zielsequenz bei 51,0 kDa. Die anderen Banden zeigen das Protein nach mitochondrialem Import nach teilweiser ($\approx 46,0$ kDa) bzw. kompletter Abspaltung (43,8 kDa) der MitoM Zielsequenz. Die gezeigten Westernblots sind repräsentativ für 4 (Cyto) bzw. 3 (MitoM) unabhängige Experimente (Abb. S10). B) Quantifizierung der Blasticidin-abhängigen Proteinbildung im Cytosol (links) und in der mitochondrialen Matrix (rechts). Die Quantifizierung wurde anhand der Graustufen der Signale vorgenommen, in % umgerechnet und sigmoidal gefittet. Die gezeigten Daten sind gemittelt über 4 (für den Stamm 3D7 Cyto *RgDAAO*^{WT}) bzw. 3 (für den Stamm 3D7 MitoM *RgDAAO*^{WT}) unabhängige Experimente ($n=4 \times 1$ (Cyto), $n=3 \times 1$ (MitoM)).

Beide Stämme zeigten einen sigmoidalen Anstieg der Enzymmenge für alle gefundenen Banden im Westernblot bis zu einem Selektionsdruck von 40 µg/ml Blasticidin (Abb. 3.9B). Ab 50 µg/ml nimmt die Enzymmenge geringfügig ab, was auf einen cytotoxischen Effekt von Blasticidin bei dieser hohen Konzentration hindeutet.

3.2.4 Lokalisation des Redoxenzym *RgDAAO* mittels Immunofluoreszenzmikroskopie

Die Bildung der *RgDAAO* konnte mittels Westernblot-Analyse für die transgenen Stämme mit Cyto, Mito und IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Im nächsten Schritt sollte die korrekte Lokalisation des Redoxenzym durch Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Es wurden Proben aus den asynchronen Kulturen mit Cyto *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} und MitoM *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml bzw. von 15 µg/ml Blasticidin bei den Stämmen mit DV *RgDAAO*^{WT} und IMS *RgDAAO*^{WT} oder IMS *RgDAAO*^{R285A} verwendet. Der Stamm mit DV *RgDAAO*^{R285A} konnte nicht erzeugt werden, da die Transfektion mehrfach fehlgeschlagen ist. Vor dem ersten Fixierungsschritt mit Paraformaldehyd wurden die Mitochondrien mit MitoTracker orange CMTM Ros (MTO) angefärbt. Dadurch konnte eine potenzielle mitochondriale Lokalisation des Enzyms festgestellt oder ausgeschlossen werden. Die fixierten Erythrozyten wurden mit DAPI inkubiert, um die Nuklei der Parasiten anzufärben, somit konnten infizierte Erythrozyten von uninfizierten unterschieden werden. Außerdem ist die Anzahl der Nuklei hilfreich zur Bestimmung des Stadiums des Parasiten, insbesondere für die Unterscheidung zwischen Trophozoiten und Schizonten. Zur Lokalisierung des Redoxenzym *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} wurden die Proben zuerst mit einem α-HA Primärantikörper gegen den 3xHA-Tag behandelt. Der Tag ist zwischen der Zielsequenz und dem Redoxenzym lokalisiert (siehe Abb. 2.4). Bei den Stämmen mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder Cyto *RgDAAO*^{R285A} ohne Zielsequenz ist der Tag N-terminal. Zur Sichtbarmachung des Enzyms wurden die Proben mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper-Konjugat Alexa488 inkubiert.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

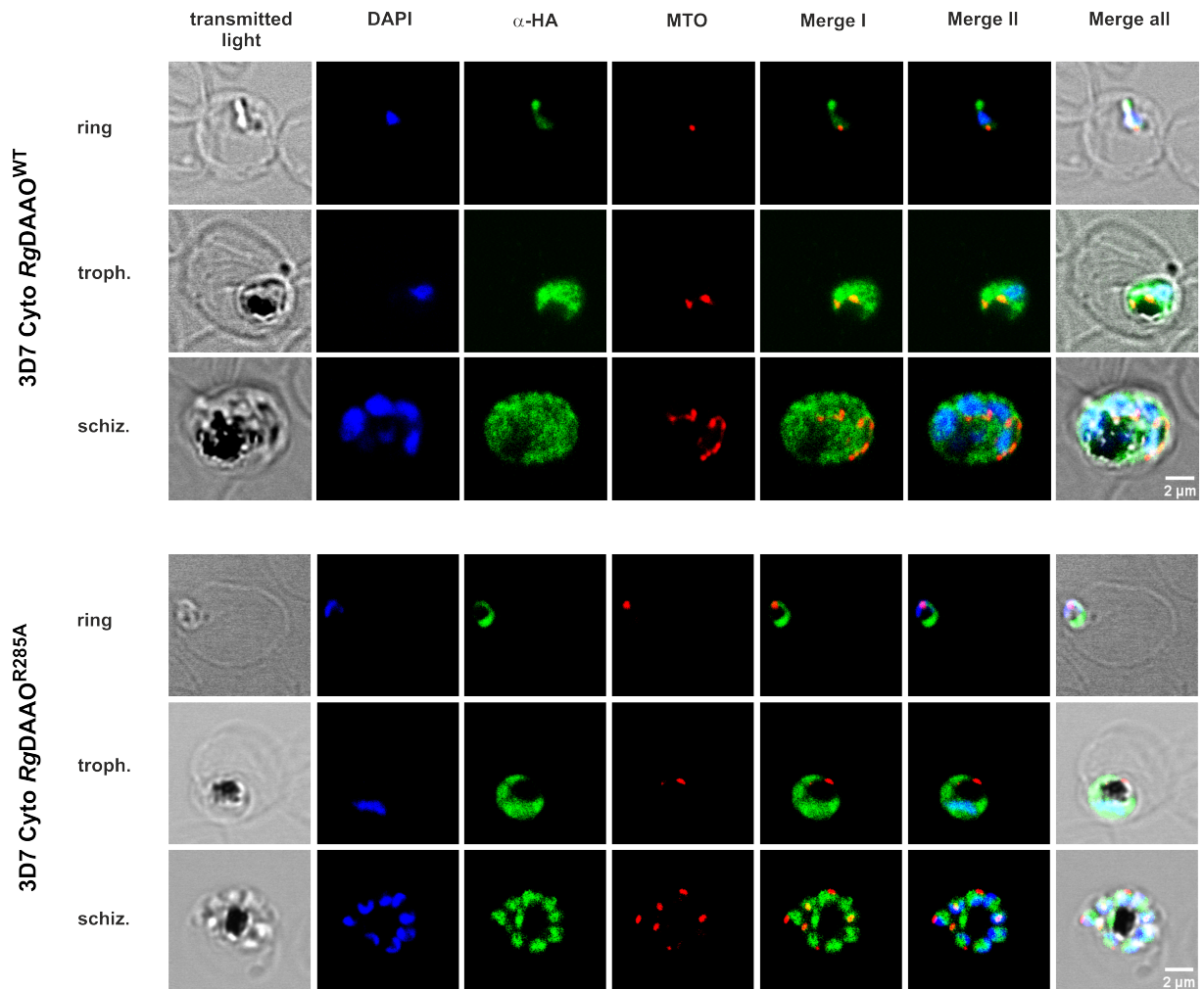


Abbildung 3.10: Lokalisation der funktionalen oder inaktiven *RgDAAO* in den Stämmen 3D7 Cyto *RgDAAO*^{WT} und 3D7 Cyto *RgDAAO*^{R285A}. Immunofluoreszenz-Färbung einer asynchronen Kultur der Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} (oben) und Cyto *RgDAAO*^{R285A} (unten) von Ring-, Trophozoit- und Schizont-Stadien bei einem Selektionsdruck von 4 μg/ml Blasticidin. Folgende Signale wurden untersucht von l. nach r.: transmittet light zeigt die infizierten Erythrozyten im Durchlicht, DAPI zeigt die mit DAPI angefärbten Nuklei der Parasiten, α-HA ist das Signal des Sekundärantikörpers Alexa488 gegen den α-HA Primärantikörper, der die Lokalisation der cytosolisch gebildeten *RgDAAO* zeigt, MTO steht für MitoTracker orange CMTM Ros mit dem die Mitochondrien angefärbt wurden. Merge I ist die Überlagerung der Kanäle α-HA und MTO, bei Merge II sind die Kanäle DAPI, α-HA und MTO zusammen gelagert und Merge all vereint alle Signale in einem Bild. Gezeigt sind repräsentative Zellen der fixierten Probe. Alle Bilder wurden bei identischen Parametern mit einem Konfokal-Mikroskop im Z-Stack-Format aufgenommen und zur Vergleichbarkeit identisch ausgewertet. Aus dem Z-Stack ist jeweils dieselbe repräsentative Ebene für alle Kanäle abgebildet. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm.

Durch die Anfärbung konnten die Subkompartimente unterschieden und die Lokalisati-

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

on des Enzyms in den asexuellen Blutstadien Ring, Trophozoit und Schizont eindeutig bestimmt werden. Für Stämme mit *RgDAAO*^{R285A} wurde die gleiche Lokalisation und Enzymmenge erwartet wie für Stämme mit *RgDAAO*^{WT}. Die Punktmutante beeinflusst selbstverständlich nicht die Bildung des Enzyms *RgDAAO*^{R285A} bzw. die gebildete Enzymmenge. Zur längeren Haltbarkeit und Parasiteninaktivierung wurden die Proben erneut mit Paraformaldehyd fixiert.

In Abbildung 3.10 sind die Mikroskopiebilder der Immunfluoreszenzfärbung der Stämme 3D7 Cyto *RgDAAO*^{WT} (oben) und 3D7 Cyto *RgDAAO*^{R285A} (unten) bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blastocidin dargestellt. Bei beiden Stämmen wurde ein α -HA-Signal des Alexa 488-Fluorophors detektiert, welches erwartungsgemäß eine gleichmäßige cytosolische Verteilung der *RgDAAO* in allen drei Stadien zeigt. Eine mitochondriale Lokalisation kann aufgrund eines eindeutigen MTO-Signals und dem zugehörigen Mergel, als Überlagerung des MTO- und des α -HA-Signals, ausgeschlossen werden. Beim Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} wird das MTO-Signal im gezeigten Trophozoiten, aber auch im Schizonten vom α -HA-Signal überdeckt, da die Mitochondrien nicht in der Ebene liegen. In der Verdauungsvakuole, die als kreisförmige, schwarze Fläche mittig ausgespart bleibt, konnte ebenfalls kein Redoxenzym *RgDAAO* gefunden werden. Im Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} sind die α -HA Signale beim Schizonten etwas definierter als im Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT}, da hier die Tochter-Nuklei der späteren Merozoiten, kurz vorm Zerfall, stärker voneinander abgegrenzt sind.

Für den Stamm mit DV *RgDAAO*^{WT} konnte in keinem Stadium ein α -HA-Signal beobachtet und somit das Redoxenzym nicht lokalisiert werden (Abb. 3.11). Die Verdauungsvakuole liegt im Trophozoit und im Schizont als schwarze, kreisförmige Fläche innerhalb der parasitären Vakuole vor. Der Selektionsdruck wurde bereits auf 15 µg/ml Blastocidin angehoben, um die Enzymmenge der *RgDAAO* zu erhöhen, trotzdem konnte weiterhin kein α -HA Signal detektiert werden. Wie bereits oben erwähnt konnte der transgene Stamm mit DV *RgDAAO*^{R285A} nicht generiert werden.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

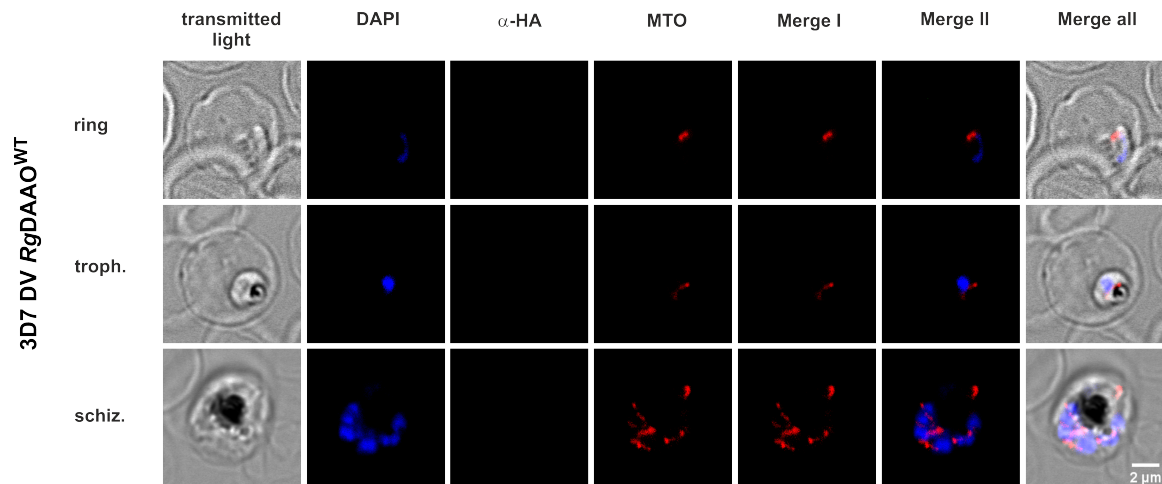


Abbildung 3.11: Lokalisation der funktionalen *RgDAAO* im Stamm 3D7 DV *RgDAAO*^{WT}. Immunofluoreszenz-Färbung einer asynchronen Kultur des Stammes mit DV *RgDAAO*^{WT} von Ring-, Trophozoit- und Schizont-Stadien bei einem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin. Folgende Signale wurden untersucht von l. nach r.: transmitted light zeigt die infizierten Erythrozyten im Durchlicht, DAPI zeigt die mit DAPI angefärbten Nuclei der Parasiten, α-HA ist das Signal des Sekundärantikörpers Alexa488 gegen den α-HA Primärantikörper, der die Lokalisation der *RgDAAO* zeigt, MTO steht für MitoTracker orange CMTM Ros mit dem die Mitochondrien angefärbt wurden. MergeI ist die Überlagerung der Kanäle α-HA und MTO, bei MergeII sind die Kanäle DAPI, α-HA und MTO zusammengelagert und Merge all vereinigt alle Signale in einem Bild. Gezeigt sind repräsentative Zellen der fixierten Probe. Alle Bilder wurden bei identischen Parametern mit einem Konfokal-Mikroskop im Z-Stack-Format aufgenommen und zur Vergleichbarkeit identisch ausgewertet. Aus dem Z-Stack ist jeweils dieselbe repräsentative Ebene für alle Kanäle abgebildet. Der Maßstabsbalken entspricht 2 µm.

Eine Lokalisation des Enzyms *RgDAAO* in der mitochondrialen Matrix konnte erwartungsgemäß für die Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} und MitoM *RgDAAO*^{R285A} bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin beobachtet werden (Abbildung 3.12). Die Überlagerung des α-HA- und des MTO-Signals im MergeI zeigt die Colokalisation besonders eindeutig als gelbes Signal in allen analysierten Stadien des Parasiten. Das Enzym scheint nicht gleichmäßig über die mitochondriale Matrix verteilt zu sein, sondern konzentriert sich punktuell auf gewisse Regionen in der Matrix. Dies konnte im MergeI des MitoM *RgDAAO*^{WT}-Schizonten, sowie beim Trophozoiten und dem Schizonten des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{R285A} beobachtet werden.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

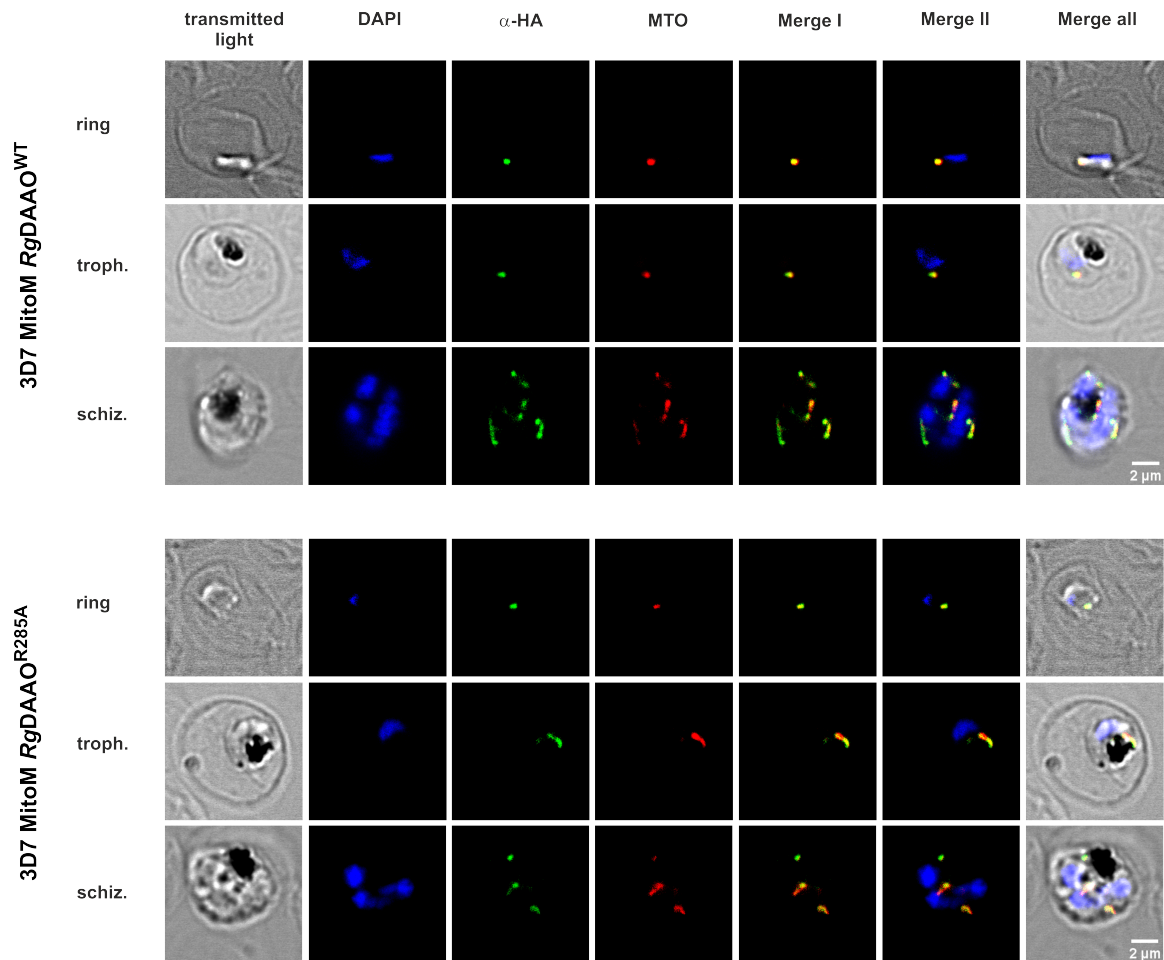


Abbildung 3.12: Lokalisation der funktionalen oder inaktiven *RgDAAO* in den Stämmen 3D7 MitoM *RgDAAO*^{WT} und 3D7 MitoM *RgDAAO*^{R285A}. Immunofluoreszenz-Färbung einer asynchronen Kultur der Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} (oben) und MitoM *RgDAAO*^{R285A} (unten) von Ring-, Trophozoit- und Schizont-Stadien bei einem Selektionsdruck von 4 μg/ml Blasticidin. Folgende Signale wurden untersucht von links nach rechts: transmitted light zeigt die mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten im Durchlicht, DAPI zeigt die mit DAPI angefärbten Nuklei der Parasiten, α-HA ist das Signal des Sekundärantikörpers Alexa488 gegen den α-HA Primärantikörper, der die Lokalisation der *RgDAAO* zeigt, MTO steht für MitoTracker orange CMTM Ros mit dem die Mitochondrien angefärbt wurden. Merge I ist die Überlagerung der Kanäle α-HA und MTO, bei Merge II sind die Kanäle DAPI, α-HA und MTO zusammengelagert und Merge all vereint alle Signale in einem Bild. Gezeigt sind repräsentative Zellen der fixierten Probe. Alle Bilder wurden bei identischen Parametern mit einem Konfokal-Mikroskop im Z-Stack-Format aufgenommen und zur Vergleichbarkeit identisch ausgewertet. Aus dem Z-Stack ist jeweils dieselbe repräsentative Ebene für alle Kanäle abgebildet. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

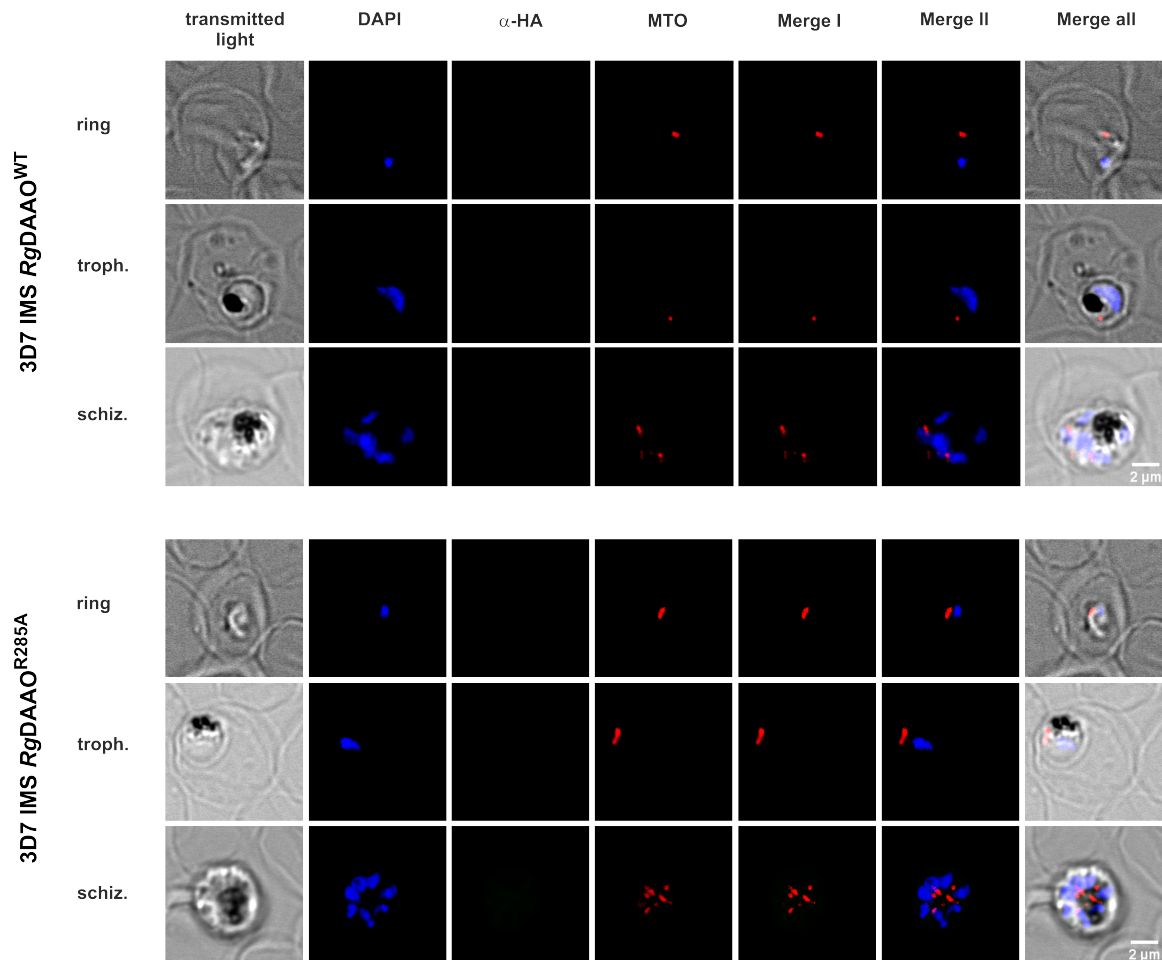


Abbildung 3.13: Lokalisation der funktionalen oder inaktiven *RgDAAO* in den Stämmen 3D7 IMS *RgDAAO*^{WT} und 3D7 IMS *RgDAAO*^{R285A}. Immunofluoreszenz-Färbung einer asynchronen Kultur der Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} (oben) und IMS *RgDAAO*^{R285A} (unten) von Ring-, Trophozoit- und Schizont-Stadien bei einem Selektionsdruck von 15 μg/ml Blasticidin. Folgende Signale wurden untersucht von l. nach r.: transmitted light zeigt die mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten im Durchlicht, DAPI zeigt die mit DAPI angefärbten Nuklei der Parasiten, α-HA ist das Signal des Sekundärantikörpers Alexa488 gegen den α-HA Primärantikörper, der die Lokalisation der *RgDAAO* zeigt, MTO steht für MitoTracker orange CMTM Ros mit dem die Mitochondrien angefärbt wurden. Merge I ist die Überlagerung der Kanäle α-HA und MTO, bei Merge II sind die Kanäle DAPI, α-HA und MTO zusammengelagert und Merge all vereinigt alle Signale in einem Bild. Gezeigt sind repräsentative Zellen der fixierten Probe. Alle Bilder wurden bei identischen Parametern mit einem Konfokal-Mikroskop im Z-Stack-Format aufgenommen und zur Vergleichbarkeit identisch ausgewertet. Aus dem Z-Stack ist jeweils dieselbe repräsentative Ebene für alle Kanäle abgebildet. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm.

Das α-HA-Signal ist im Allgemeinen sehr stark, so dass die korrekte Lokalisation des Enzyms *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} bestätigt werden konnte.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

Wie bereits in der Verdauungsvakuole, konnte auch bei den Stämmen mit IMS *RgDAAO*^{WT} und IMS *RgDAAO*^{R285A} kein α -HA-Signal detektiert werden. Die korrekte Lokalisation im mitochondrialen Intermembranraum konnte für diese transgenen Stämme nicht nachgewiesen werden, obwohl auch hier der Selektionsdruck bereits auf 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bla angehoben wurde. Zusammengefasst konnte ein α -HA Signal bei den Stämmen mit Cyto *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} und Mito *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} im erwarteten Kompartiment, bei einem Selektionsdruck von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bla, detektiert werden. In der mitochondrialen Matrix konzentrierte sich das α -HA-Signal der *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} meist auf einen Punkt und war nicht gleichmäßig im Kompartiment verteilt (Abb. 3.12, MergeI). Im Cytosol hingegen war die Verteilung des gebildeten Redoxenzym *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} gleichmäßig verteilt, eine Colokalisation mit dem Mitochondrien konnte erwartungsgemäß ausgeschlossen werden (Abb. 3.10, MergeI). Bei den Stämmen mit DV *RgDAAO*^{WT} bzw. DV *RgDAAO*^{R285A} und IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. IMS *RgDAAO*^{R285A} blieb das α -HA Signal, selbst bei erhöhtem Selektionsdruck von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin aus. Aufgrund des fehlenden transgenen Stamms mit DV *RgDAAO*^{R285A} wurde noch keine Westernblotanalyse des Stamms mit DV *RgDAAO*^{WT} durchgeführt, es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Redoxenzym in diesem Stamm überhaupt gebildet wird. Die Lokalisation des Redoxenzym konnte für den Stamm mit DV *RgDAAO*^{WT} nicht bestimmt werden, weder in der Verdauungsvakuole, noch in einem anderen Kompartiment (Abb. 3.11). Das könnte einerseits daran liegen, dass das Enzym in diesem Stamm nicht gebildet wurde oder der Tag in der Verdauungsvakuole durch Proteasen entfernt wurde und daher das Enzym nicht detektierbar war. Auch für die Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. IMS *RgDAAO*^{R285A} konnte das Enzym nicht lokalisiert werden (Abb. 3.13), obwohl eine Bildung des Enzyms mittels Westernblotanalyse nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.8, unten), allerdings ist diese Methode auch sensitiver als die IFA-Mikroskopie-Methode. Der mitochondriale Intermembranraum ist zudem ein kleines Kompartiment, in der die Konzentration des Redoxenzym vermutlich zur Detektion zu gering ist. Bei den verwendeten Zielsequenzen handelt es sich jeweils um *N*-terminale

Präsequenzen der in Tabelle 2.3 angegebenen Gene. Der 3xHA-Tag ist jeweils zwischen der Zielsequenz und dem Redoxenzym lokalisiert. Für die Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder *RgDAAO*^{R285A} ist der 3xHA-Tag *N*-terminal bezüglich dem *RGDAAO*-Gen, da hier keine Zielsequenz im Plasmid vorhanden ist.

3.2.5 Bestimmung der IC₅₀-Werte der transgenen Stämme mit *RgDAAO*^{WT} oder *RgDAAO*^{R285A} für Paraquat

Basierend auf der Hypothese, dass oxidativer Stress eine entscheidende Rolle für die cytotoxischen Effekte von Antimalariamitteln spielt [127], [174], [175], [176], sollte untersucht werden ob erhöhte Wasserstoffperoxidkonzentrationen in verschiedenen Kompartimenten von *P. falciparum* die Sensitivität des Parasiten gegenüber Antimalariamitteln beeinflussen. Dafür wurden transgene Stämme eingesetzt, die das Redoxenzym *RgDAAO* (*RgDAAO*^{WT}) im Cytosol (Cyto), der mitochondrialen Matrix (MitoM), dem mitochondrialen Intermembranraum (IMS) oder der Verdauungsvakuole (DV) enthalten. Durch exogene Zugabe der D-Aminosäuren D-Alanin, D-Methionin und D-Valin sollte kompartimentspezifisch die Wasserstoffperoxidkonzentration erhöht werden. Durch Verwendung des pHBIRH Plasmids mit *RGDAAO* als Transgen und der Blasticidin-*S*-Deaminase als Selektionsmarker wurde die Menge an gebildeter *RgDAAO* und somit auch die resultierende Wasserstoffperoxidkonzentration abhängig von der Blasticidinkonzentration titriert [154]. Als Negativkontrolle wurden Stämme verwendet, die eine mutierte, inaktive Form der *RgDAAO* (*RgDAAO*^{R285A}) in den jeweiligen Kompartimenten enthielten. Leider konnte der Stamm 3D7 DV *RgDAAO*^{R285A} zum Transport des mutierten Redoxenzym in die Verdauungsvakuole nicht erfolgreich erzeugt werden. Daher wurden keine IC₅₀-Messungen für die Stämme 3D7 DV *RgDAAO*^{WT} und 3D7 DV *RgDAAO*^{R285A} durchgeführt. Die Methode zur Messung der IC₅₀-Werte wurde zunächst für Paraquat als Positivkontrolle etabliert. Paraquat ist eine quaternäre Ammoniumverbindung und gehört zur Klasse der Bipyridin-Herbizide [177]. Durch Aufnahme eines Elektrons z. B. aus der mitochondrialen Elektronentransportkette oder dem Hämoglobinmetabolismus (Oxidation von Fe²⁺ zu

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

Fe^{3+}) wird das Paraquat-Kation zum Radikal reduziert. Das Radikal stößt das überschüssige Elektron an ein Sauerstoffmolekül ab, wobei ein Superoxidanion entsteht und das Paraquat-Kation regeneriert wird (Abb. 3.14) [178].

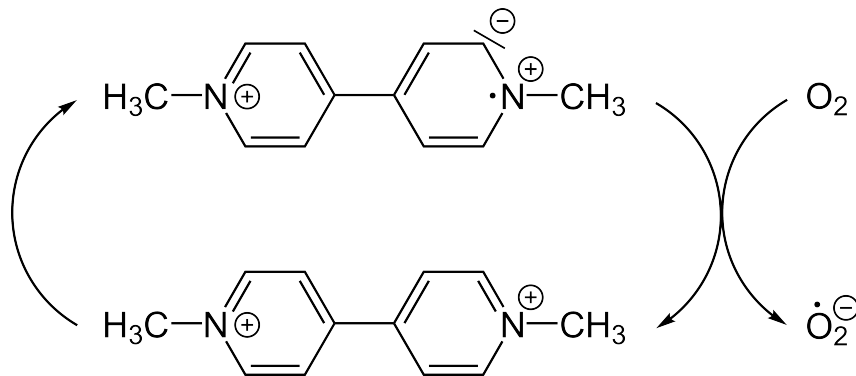


Abbildung 3.14: Redozyklus von Paraquat. Das freie Paraquatkation geht durch Aufnahme eines Elektrons in ein freies Radikal über. Das Elektron, welches in *P. falciparum* beispielsweise aus der Elektronentransportkette oder dem Eisenmetabolismus stammen kann, wird weiter auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei ein Superoxidanion gebildet wird, das Paraquatkation wird regeneriert und kann in einem weiteren Zyklus erneut reduziert werden [178], [179].

Paraquat wurde bereits als Superoxidanionen erzeugendes Reagenz in *P. falciparum* für eine Studie über vererbten Glutathionreduktase Mangel von Gallo *et al.* verwendet [180]. Der IC_{50} -Wert von Paraquat liegt demnach im *Pf3D7*^{WT} Stamm bei 53 μM [180]. Die Experimente wurden in 96-Well Platten angesetzt nach dem Pipettierschema in Abbildung 2.5. Die IC_{50} -Werte wurden bei zwei unterschiedlichen Blasticidinkonzentrationen von 4 und 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gemessen. Durch den höheren Selektionsdruck sollte der Einfluss einer größeren Menge des gebildeten Redoxenzym *RgDAAO* auf den IC_{50} -Wert untersucht werden. Unterschiedliche D-Aminosäuren wurden eingesetzt, um die Wasserstoffperoxidkonzentrationen in den verschiedenen Kompartimenten zu erhöhen und eventuelle Eigenheiten in der Wirkweise der D-Aminosäuren zu beobachten und potenzielle aminosäurespezifische Effekte von kompartimentspezifischen Effekten zu unterscheiden. Als Negativkontrollen wurden die IC_{50} -Werte zusätzlich für Stämme mit *RgDAAO*^{WT} und *RgDAAO*^{R285A} jeweils ohne Zugabe von D-Aminosäuren gemessen.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

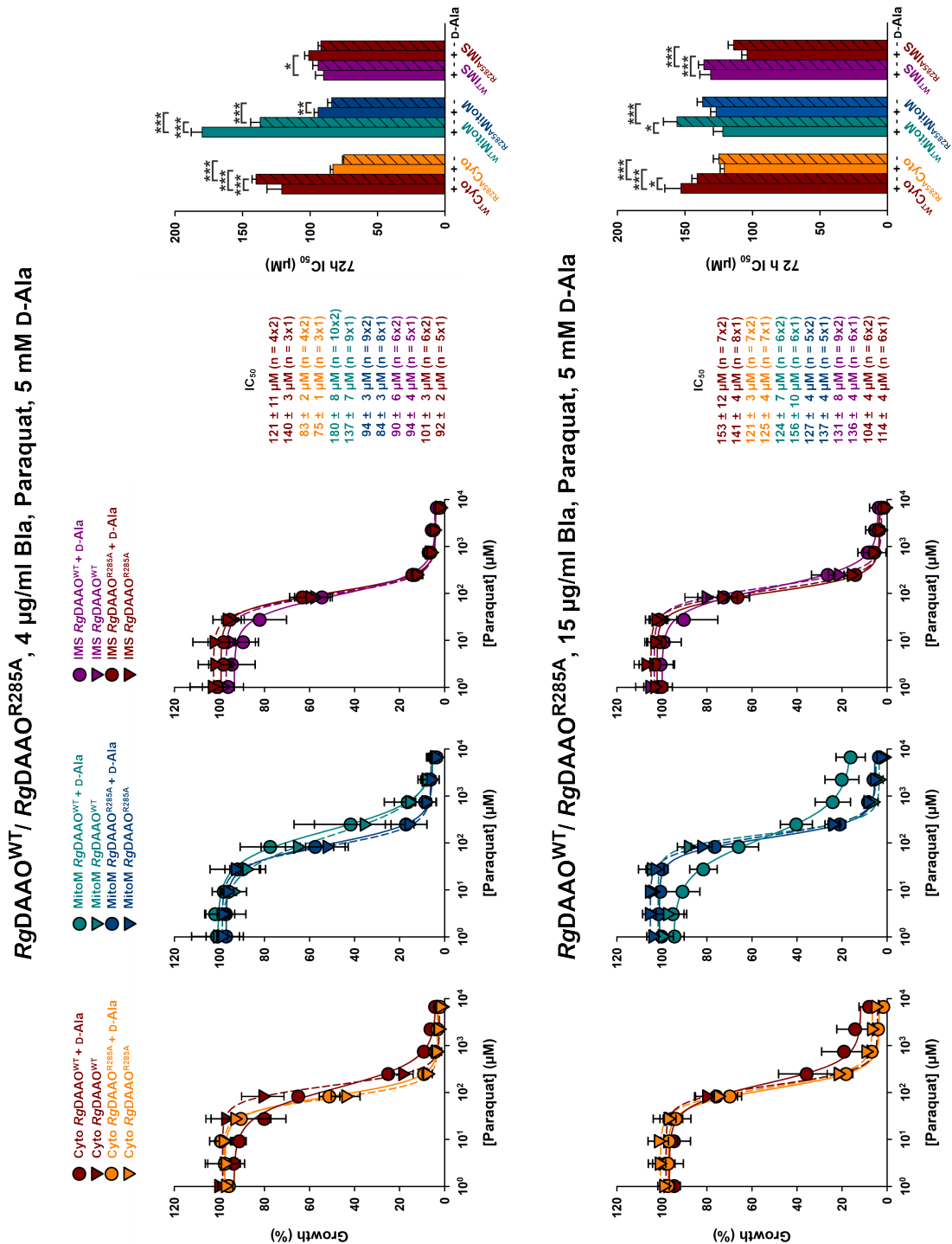


Abbildung 3.15: IC₅₀-Werte der Stämme 3D7 *RgDAAO^{WT}* und 3D7 *RgDAAO^{R285A}* verschiedener Kompartimente mit Paraquat und D-Alanin (D-Ala). Untersucht wurden die Stämme mit Cyto *RgDAAO^{WT/R285A}* (rot, orange), MitoM *RgDAAO^{WT/R285A}* (hellblau, dunkelblau) und IMS *RgDAAO^{WT/R285A}* (lila, rot) bei 4 (oben) bzw. 15 µg/ml Bla (unten). [D-Ala] betrug 5 mM, [Paraquat] lag zwischen 1-6667 µM. Die Graphen zeigen die Auftragung des parasitären Wachstums in % gegen [Paraquat] in µM. Das Balkendiagramm zeigt die IC₅₀-Werte und die in SigmaPlot 13 mittels One-way ANOVA ermittelten P-Werte (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). n≥3x1.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

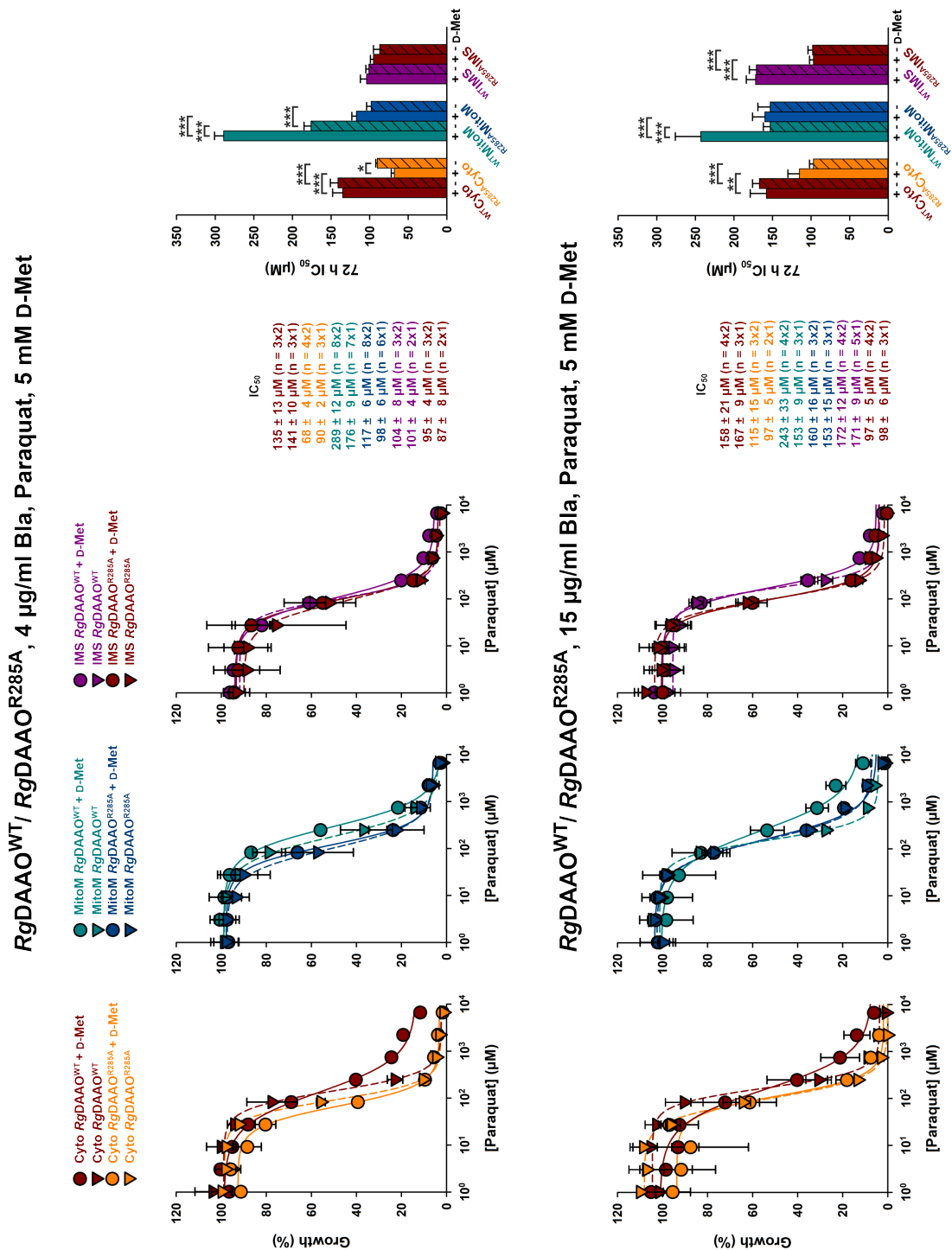


Abbildung 3.16: IC₅₀-Werte der Stämme 3D7 *RgDAAO^{WT}* und 3D7 *RgDAAO^{R285A}* verschiedener Kompartimente mit Paraquat und D-Methionin (D-Met). Untersucht wurden die Stämme mit Cyto *RgDAAO^{WT/R285A}* (rot, orange), MitoM *RgDAAO^{WT/R285A}* (hellblau, dunkelblau) und IMS *RgDAAO^{WT/R285A}* (lila, rot) bei 4 (oben) bzw. 15 µg/ml Bla (unten). [D-Met] betrug 5 mM, [Paraquat] lag zwischen 1-6667 µM. Die Graphen zeigen die Auftragung des parasitären Wachstums in % gegen [Paraquat] in µM. Das Balkendiagramm zeigt die IC₅₀-Werte und die in SigmaPlot 13 mittels One-way ANOVA ermittelten P-Werte (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0.001). n≥3x1.

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

RgDAAO^{WT}/RgDAAO^{R285A}, 4 µg/ml Bla, Paraquat, 5 mM D-Val

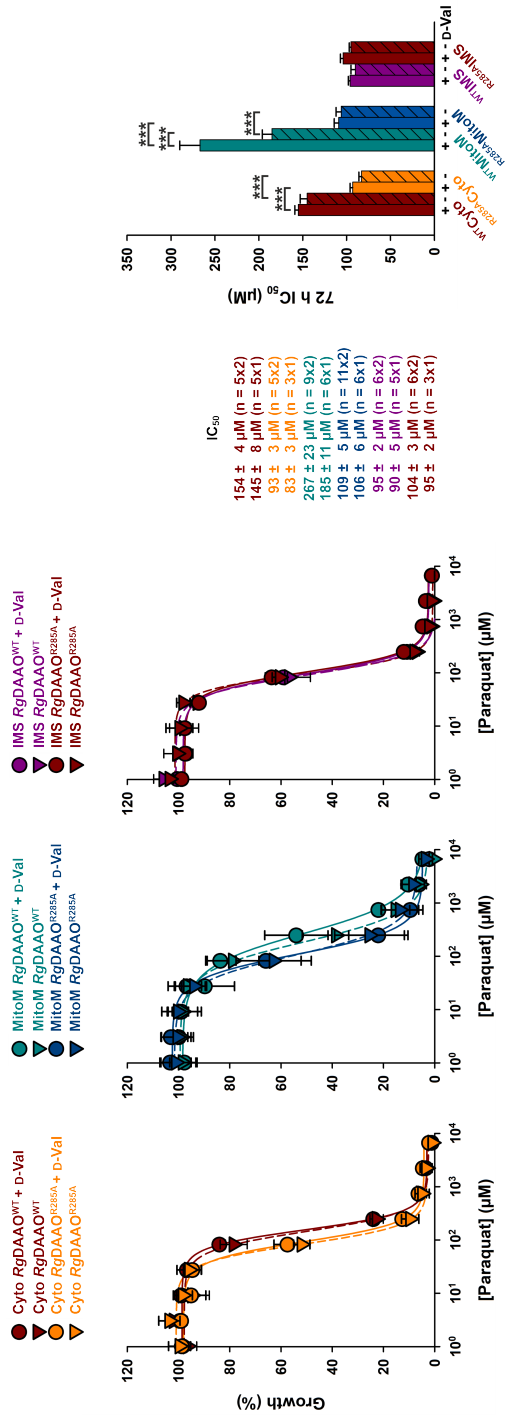


Abbildung 3.17: IC₅₀-Werte der Stämme 3D7 *RgDAAO*^{WT} und 3D7 *RgDAAO*^{R285A} verschiedener Kompartimente mit Paraquat und D-Valin (D-Val). Die Messungen wurden für die Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT}/*R285A* (rot, orange), MitoM *RgDAAO*^{WT}/*R285A* (hellblau, dunkelblau) und IMS *RgDAAO*^{WT}/*R285A* (lila, rot) bei 4 µg/ml Bla (oben) und 15 µg/ml Bla (unten) durchgeführt. Die verwendete D-Valinkonzentration betrug 5 mM, die Paraquat-Konzentration lag zwischen 1-6667 µM. Die Graphen zeigen die Auftragung des parasitären Wachstums in % gegen die Konzentration an Paraquat in µM. Die Konzentration bei der das Wachstum noch 50 % beträgt entspricht dem IC₅₀-Wert. Die Daten wurden gemittelt aus mindestens drei biologischen Replikaten, deren genaue Anzahl direkt hinter den gemittelten IC₅₀-Werten angegeben ist. Das Balkendiagramm zeigt die IC₅₀-Werte und die in SigmaPlot 13 mittels One-way ANOVA ermittelten P-Werte (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Prinzipiell wurden durch die erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentrationen Verschiebungen der IC₅₀-Werte erwartet, die Aufschluss über die Anpassung des Parasiten an die geänderten Redoxbedingungen geben sollen. Wie genau diese ausgeprägt waren, wurde im Folgenden anhand der Balkendiagramme und der zugehörigen IC₅₀-Werte der Abbildungen 3.15, 3.16, 3.17 beschrieben.

IC₅₀-Werte der transgenen Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder Cyto *RgDAAO*^{R285A} für Paraquat

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der IC₅₀-Messungen für die Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} und Cyto *RgDAAO*^{R285A} ausgewertet. Die zugehörigen Balkendiagramme und IC₅₀-Werte wurden in den Abbildungen 3.15, 3.16, 3.17 in der Farbe rot für den Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} und in orange mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} abgebildet.

Bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin wurde beobachtet, dass der Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} mit und ohne Zugabe von D-Alanin hochsignifikant höhere IC₅₀-Werte aufwies im Vergleich zum Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} mit und ohne D-Alanin (Abb. 3.15, oben). Der IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} war nach Zugabe von D-Alanin um 14 % niedriger verglichen mit dem Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{R285A}. Der Unterschied war hochsignifikant. Hier könnte der niedrigere IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Alanin durch das gebildete Wasserstoffperoxid erklärt werden, das den Parasiten sensibler gegenüber Paraquat macht. Im Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} ohne D-Alanin wurde vermutlich kein (oder weniger, siehe Diskussion) Wasserstoffperoxid gebildet und war daher auch weniger sensitiv gegenüber Paraquat. Für den Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} wurde mit oder ohne Zugabe von D-Alanin kein Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten festgestellt. Der IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} mit D-Alanin lag bei 121 µM Paraquat und war mit 31 % hochsignifikant größer verglichen mit dem IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} mit D-Alanin. Ein ähnlicher Zusammenhang ergab sich für den Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} ohne Zugabe von D-Alanin, dessen IC₅₀-Wert um 46 % höher war als der IC₅₀-Wert des Stamms mit

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

Cyto *RgDAAO*^{R285A} ohne Zugabe von D-Alanin. Die Anwesenheit von Cyto *RgDAAO*^{WT}, scheint den Parasiten unabhängig von der Zugabe von D-Alanin widerstandsfähiger gegenüber Paraquat gemacht zu haben. Der Parasit adaptierte sich vermutlich an die gesteigerte Wasserstoffperoxidkonzentration im Falle einer Zugabe von D-Alanin. Dass der gleiche Effekt auch ohne Zugabe von D-Alanin beobachtet wurde deutete auf einen endogenen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* hin. Im Gegensatz zu den hochsignifikanten Unterschieden zwischen den IC₅₀-Werten des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} mit oder ohne D-Alanin, wurden für diesen Stamm bei Experimenten mit oder ohne Zugabe von D-Methionin (Abb. 3.16, oben) oder D-Valin (Abb. 3.17, oben) keine Unterschiede zwischen den IC₅₀-Werten festgestellt. Stattdessen wurde für den IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} mit D-Methionin ein schwach signifikanter Abfall um 24 % im Vergleich zum Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} ohne D-Methionin beobachtet. Der Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} konnte in diesem Fall ohne Zugabe von D-Methionin besser mit Paraquat umgehen als der Stamm mit mutiertem Enzym bei Zugabe von D-Methionin, was auf eine geringe Toxizität von D-Methionin hindeuten könnte (dies konnte jedoch bei 15 µg/ml Blasticidin oder in anderen Kompartimenten nicht reproduziert werden). Bei analogen Experimenten mit D-Alanin und D-Valin wurden keine Unterschiede bei den Stämmen mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} beobachtet.

Bei Erhöhung des Selektionsdrucks auf 15 µg/ml Blasticidin wurde festgestellt, dass die IC₅₀-Werte des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} unabhängig von der Zugabe von D-Alanin deutlich erhöht waren im Vergleich zum Stamm mit *RgDAAO*^{R285A} mit oder ohne Zugabe von D-Alanin (Abb. 3.15, unten). Die Unterschiede waren jeweils hochsignifikant. Diese Beobachtung wurde bereits bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml gemacht, war dort aber stärker ausgeprägt (Abb. 3.15, oben). Das heißt, dass auch hier die Anwesenheit von *RgDAAO*^{WT} im Cytosol den Parasiten vermutlich unempfindlicher gegenüber Paraquat gemacht hat und das unabhängig davon, ob D-Alanin zugegeben wurde oder nicht. Dabei war der IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} bei Zugabe von D-Alanin um 21 % niedriger als der des Stamms mit funktionalem Enzym *RgDAAO*^{WT} im Cyto-

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

sol. Der Stamm mit inaktivem Enzym *RgDAAO*^{R285A} im Cytosol zeigte in Abwesenheit von D-Alanin einen um 11 % gesenkten IC₅₀-Wert im Vergleich zum Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT}. Vergleichbare Effekte waren für die analogen Experimente mit D-Methionin zu beobachten (Abb. 3.16, unten) und wurden daher nicht erneut erläutert. Zudem gab es eine signifikante Abweichung des IC₅₀-Werts des Stammes mit Cyto *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Alanin, der im Vergleich zum gleichen Stamm ohne D-Alanin um 8 % höher war. Der Parasit konnte in Anwesenheit des Enzyms *RgDAAO*^{WT} im Cytosol bei Zugabe von D-Alanin besser mit Paraquat umgehen als ohne D-Alanin. Die IC₅₀-Werte des analogen Experiments mit bzw. ohne Zugabe von D-Methionin zeigten keinen signifikanten Unterschied. Auch die IC₅₀-Werte des Stammes mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} unterschieden sich mit oder ohne Zugabe der D-Aminosäuren D-Alanin (Abb. 3.15, unten) oder D-Methionin (Abb. 3.16, unten) nicht voneinander. Die Parasiten waren in Anwesenheit von *RgDAAO*^{R285A} im Cytosol unabhängig von der Zugabe einer D-Aminosäure sensitiver gegenüber Paraquat als Parasiten mit Cyto *RgDAAO*^{WT}. Mit D-Valin wurden bei einem Selektionsdruck von 15 µg/ml Bla keine Messungen durchgeführt.

IC₅₀-Werte der transgenen Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} oder MitoM *RgDAAO*^{R285A} für Paraquat

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der IC₅₀-Messungen für die Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} und MitoM *RgDAAO*^{R285A} ausgewertet. Die zugehörigen Balkendiagramme und IC₅₀-Werte wurden in den Abbildungen 3.15, 3.16, 3.17 in der Farbe türkis für den Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} und in dunkelblau für MitoM *RgDAAO*^{R285A} abgebildet. Bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Bla wurde für den Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Methionin der stärkste Anpassungseffekt der Parasiten beobachtet, der verglichen mit den IC₅₀-Werten der anderen untersuchten Stämme aufgetreten ist. Der IC₅₀-Wert liegt bei 289 µM Paraquat und somit 39 % über dem des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{WT} ohne Zugabe von D-Methionin. Der Unterschied war hochsignifikant. Die Parasiten waren in Anwesenheit von *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

nach Zugabe von D-Methionin erheblich widerstandsfähiger gegenüber Paraquat als in Abwesenheit von D-Methionin. Ein sehr starker, hochsignifikanter Anpassungseffekt des Parasiten wurde auch bei Zugabe der D-Aminosäuren D-Valin (Abb. 3.17, oben) und D-Alanin (Abb. 3.15, oben) beobachtet. Dies könnte beispielsweise an hohen Konzentrationen von D-Aminosäuren oder dem Redoxenzym *RgDAAO* in der mitochondrialen Matrix liegen. Daraus folgt vermutlich eine stärkere Präadaptation der Parasiten, die die funktionale *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix enthalten, verglichen zu anderen Kompartimenten. Durch Zugabe von D-Alanin war der resultierende Anpassungseffekt der Parasiten nicht ganz so stark ausgeprägt, was sich in einem niedrigeren IC₅₀-Wert von 180 µM Paraquat widerspiegelte (Abb. 3.15, oben). Ein Vergleich der IC₅₀-Werte des Stamms mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} ergab keinen signifikanten Unterschied mit oder ohne Zugabe von D-Methionin (Abb. 3.16, oben) bzw. D-Valin (Abb. 3.17, oben). Das bedeutet, dass die Sensitivität der Parasiten mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} gegenüber Paraquat nicht durch die Zugabe von D-Methionin und D-Valin beeinflusst wurde. Die Zugabe von D-Alanin zu einem Stamm mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} hatte einen mit 11 % signifikant höheren IC₅₀-Wert im Vergleich zum Stamm mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} ohne D-Alanin zur Folge. Hier wurden die Parasiten mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} durch Zugabe von D-Alanin widerstandsfähiger gegenüber Paraquat als in Abwesenheit von D-Alanin. Der IC₅₀-Wert des Stamms mit *MitoM RgDAAO*^{WT} mit D-Methionin (Abb. 3.16, oben) war 60 % höher im Vergleich zum Stamm mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} mit D-Methionin. Für die Zugabe der D-Aminosäuren D-Alanin (Abb. 3.15, oben) und D-Valin (Abb. 3.17, oben) wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet. Die Parasiten kamen durch Anwesenheit von *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix und Zugabe einer der getesteten D-Aminosäure erheblich besser mit Paraquat zurecht als ein Stamm mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} nach Zugabe einer der getesteten D-Aminosäuren. Auch der Stamm mit *MitoM RgDAAO*^{WT} ohne die getesteten D-Aminosäuren war widerstandsfähiger gegenüber Paraquat als der Stamm mit *MitoM RgDAAO*^{R285A} ohne D-Aminosäure. Dass die Sensitivität des Stamms mit *MitoM RgDAAO*^{WT} gegenüber Paraquat geringer war, als im Stamm mit *MitoM RgDAAO*^{R285A}

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

deutet erneut auf das Vorhandensein eines D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* und auf eine Präadaptation der Parasiten hin.

Bei einem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin konnten die bei 4 µg/ml Blasticidin beobachteten Effekte nur teilweise reproduziert werden. Der IC₅₀-Wert des Stamms mit MitoM *RgDAAO*^{WT} war nach Zugabe von D-Methionin (Abb. 3.16, unten) etwas geringer als bei niedrigem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin. Die Parasiten wurden bei höherer Blasticidinkonzentration und somit größerer Menge des Enzyms *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix wieder geringfügig sensitiver gegenüber Paraquat. Trotzdem lag der IC₅₀-Wert des Stamms mit MitoM *RgDAAO*^{WT} mit D-Methionin hochsignifikant 37 % über dem des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{WT} ohne D-Methionin. Die verringerte Sensitivität des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{WT} war vermutlich auf die Zugabe von D-Methionin zurückzuführen. Ein weiterer hochsignifikanter Unterschied bestand zwischen dem IC₅₀-Wert des Stamms mit MitoM *RgDAAO*^{WT} in Anwesenheit von D-Methionin und dem IC₅₀-Wert des Stamms mit MitoM *RgDAAO*^{R285A} mit D-Methionin. Der Effekt ist somit wahrscheinlich auf die Anwesenheit von *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix des Parasiten zurückzuführen. Der IC₅₀-Wert des Stamms mit MitoM *RgDAAO*^{WT} war nach Zugabe von D-Alanin (Abb. 3.15, unten) deutlich niedriger als bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin (Abb. 3.15, oben). Die Parasiten wurden durch Zugabe von D-Alanin bei höherem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin deutlich sensitiver gegenüber Paraquat als ohne D-Alanin. Der IC₅₀-Wert des Stamms mit MitoM *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Alanin lag 21 % unter dem des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{WT} ohne D-Alanin. Der Unterschied war signifikant. In diesem Fall waren die Parasiten in Anwesenheit des Enzyms *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix ohne D-Alanin widerstandsfähiger gegenüber Paraquat als mit D-Alanin. Dabei handelte es sich um eine Anomalie, die nur einmal in 5 Experimenten auftrat (Abb. 3.15, unten). Ein weiterer hochsignifikanter Unterschied der IC₅₀-Werte ergab sich zwischen dem Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} ohne D-Alanin und dem Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{R285A} ohne D-Alanin. Die Parasiten konnten in Anwesenheit von *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

Matrix besser mit Paraquat zurecht kommen als in Anwesenheit des inaktiven Enzyms *RgDAAO*^{R285A}, was erneut für eine Präadaptation der Parasiten, sowie einen endogenen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* spricht. Mit D-Valin wurden bei einem Selektionsdruck von 15 µg/ml keine Messungen durchgeführt.

IC₅₀-Werte der transgenen Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} oder IMS *RgDAAO*^{R285A} für Paraquat

Dann wurden die Ergebnisse der IC₅₀-Messungen für die Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} und IMS *RgDAAO*^{R285A} ausgewertet. Die zugehörigen Balkendiagramme und IC₅₀-Werte wurden in den Abbildungen 3.15, 3.16, 3.17 in der Farbe lila für den Stamm mit IMS *RgDAAO*^{WT} und in rot für IMS *RgDAAO*^{R285A} abgebildet.

Der Stamm mit IMS *RgDAAO*^{WT} zeigte bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blastocidin keine Unterschiede bezüglich der IC₅₀-Werte mit bzw. ohne Zugabe von D-Alanin (Abb. 3.15, oben), D-Methionin (Abb. 3.16, oben) oder D-Valin (Abb. 3.17). Die IC₅₀-Werte liegen zwischen 90-104 µM Paraquat. Auch für den Stamm mit IMS *RgDAAO*^{R285A} wurden mit oder ohne Zugabe der D-Aminosäure, D-Alanin (Abb. 3.15, oben), D-Methionin (Abb. 3.16, oben) oder D-Valin (Abb. 3.17) kein Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten beobachtet, die ebenfalls in einem Bereich zwischen 87-104 µM Paraquat lagen. Eine Ausnahme bildete der Stamm mit IMS *RgDAAO*^{R285A} nach Zugabe von D-Alanin, dessen IC₅₀-Wert im Vergleich zum Stamm mit IMS *RgDAAO*^{R285A} nach Zugabe von D-Alanin schwach signifikant höher war. Die exogene Zugabe von D-Alanin hatte im Stamm mit funktionaler IMS *RgDAAO*^{WT} ggf. zur Folge, dass Wasserstoffperoxid produziert wurde, wodurch es zu einer erhöhten Sensitivität der Parasiten gegenüber Paraquat kam.

Durch Erhöhung des Selektionsdrucks auf 15 µg/ml Blastocidin wurde die Menge an *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} vermutlich im mitochondrialen Intermembranraum gesteigert. Zunächst fiel auf, dass der Stamm mit IMS *RgDAAO*^{WT} höhere IC₅₀-Werte aufwies im Vergleich zum Stamm mit IMS *RgDAAO*^{R285A}. Für den Stamm mit IMS *RgDAAO*^{WT} gab es keinen Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten mit oder ohne Zugabe

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

von D-Alanin oder D-Methionin. Auch die IC_{50} -Werte des Stamms mit IMS $RgDAAO^{R285A}$ wiesen unabhängig von der Zugabe von D-Alanin oder D-Methionin keine Unterschiede auf. Die Anwesenheit des Enzyms $RgDAAO^{WT}$ (vermutlich im mitochondrialen Intermembranraum) scheint bei höherem Selektionsdruck einen Anpassungseffekt der Parasiten hervorgerufen zu haben so, dass diese besser mit Paraquat umgehen konnten, unabhängig davon, ob durch exogene Zugabe von D-Alanin oder D-Methionin zusätzlich Wasserstoffperoxid gebildet wurde. Der Stamm mit IMS $RgDAAO^{R285A}$ zeigte einen Abfall des IC_{50} -Werts um 20 % nach Zugabe von D-Alanin im Vergleich zum Stamm mit IMS $RgDAAO^{WT}$ mit D-Alanin. Der Unterschied war hochsignifikant. Die Anwesenheit von $RgDAAO^{WT}$ (vermutlich im mitochondrialen Intermembranraum) scheint trotz Zugabe von D-Alanin und daraus folgender Bildung von Wasserstoffperoxid, einen Anpassungseffekt im Parasiten hervorgerufen zu haben, wodurch der Stamm unempfindlicher gegenüber Paraquat war. Bei den Negativkontrollen zeichnete sich ein ähnlicher Effekt ab, der IC_{50} -Wert des Stammes mit IMS $RgDAAO^{R285A}$ ohne D-Alanin war um 16 % niedriger verglichen mit dem des Stammes mit IMS $RgDAAO^{WT}$, der Unterschied war hochsignifikant. Die Anwesenheit von $RgDAAO^{WT}$ (vermutlich im mitochondrialen Intermembranraum) verursachte auch ohne Zugabe von D-Alanin einen Anpassungseffekt im Parasiten, wodurch der Stamm unempfindlicher gegenüber Paraquat wurde. Der beobachtete Anpassungseffekt musste durch die Anwesenheit von $RgDAAO^{WT}$ (vermutlich im mitochondrialen Intermembranraum) hervorgerufen worden sein da er unabhängig von der exogenen Zugabe von D-Alanin auftrat. Das könnte wiederum auf einen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* hindeuten. Der IC_{50} -Wert des Stammes mit IMS $RgDAAO^{WT}$ stieg nach Zugabe von D-Methionin hochsignifikant um 44 % im Vergleich zum IC_{50} -Wert des Stamms mit IMS $RgDAAO^{R285A}$. Bei der Negativkontrolle lag der IC_{50} -Wert des Stamms mit IMS $RgDAAO^{WT}$ ohne D-Methionin um 43 % höher im Vergleich zum IC_{50} -Wert des Stamms mit IMS $RgDAAO^{R285A}$. Der Grund des hochsignifikanten Unterschieds war wiederum ein Anpassungseffekt des Parasiten verursacht durch die Anwesenheit des $RgDAAO^{WT}$ Enzyms (vermutlich im mitochondrialen Intermembranraum) unabhängig von der Zugabe

3.2. UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN STRESS-HYPOTHESE IN ASEXUELLEN BLUTSTADIEN VON *P. FALCIPARUM*

von D-Methionin, der den Parasiten unempfindlicher gegenüber Paraquat macht (im Vergleich zum Stamm mit IMS *RgDAAO*^{R285A} mit oder ohne D-Methionin). Die IC₅₀-Werte der Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} waren mit oder ohne Zugabe von D-Methionin 21-24 % höher im Vergleich zu denen mit oder ohne Zugabe von D-Alanin. Mit D-Valin wurden bei einem Selektionsdruck von 15 µg/ml keine Messungen durchgeführt.

Zusammengefasst wurde in den meisten Fällen ein höherer IC₅₀-Wert für Stämme mit *RgDAAO*^{WT} Enzym unabhängig von der Zugabe einer D-Aminosäure im Vergleich zu Stämmen mit *RgDAAO*^{R285A} Enzym beobachtet. Das bedeutet, dass unabhängig von der Zugabe einer D-Aminosäure die Parasiten in Anwesenheit des *RgDAAO*^{WT} Enzyms weniger sensitiv gegenüber Paraquat waren. Die Parasiten konnten sich offenbar an die erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentrationen in Anwesenheit von D-Aminosäuren adaptieren und konnten durch diesen Anpassungseffekt sogar besser mit Paraquat umgehen als Stämme mit inaktiver *RgDAAO*, die überhaupt nicht mit der zusätzlichen Bildung von Wasserstoffperoxid konfrontiert waren. Eigentlich wäre eine gesteigerte Sensitivität der Parasiten gegenüber Paraquat zu erwarten gewesen, da sie bereits durch die Bildung von Wasserstoffperoxid geschwächt sein mussten. Da die Parasiten auch ohne Zugabe von D-Aminosäuren einen vergleichbaren Anpassungseffekt zeigten, könnte ein D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* existieren. Dieser Anpassungseffekt der Parasiten zeigte sich am stärksten für den Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe einer D-Aminosäure bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin. Hier war die Anwesenheit der D-Aminosäure für den beobachteten Effekt entscheidend, da ein hochsignifikanter Unterschied zum IC₅₀-Wert des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{WT} ohne D-Aminosäure bestand. Zwischen den IC₅₀-Werten der Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} und IMS *RgDAAO*^{R285A} konnte erst bei erhöhtem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4 Diskussion

4.1 Dimedon-Projekt

In dieser Studie konnten einige der fehlenden Geschwindigkeitskonstanten aus Abbildung 1.8 erfolgreich ermittelt werden.

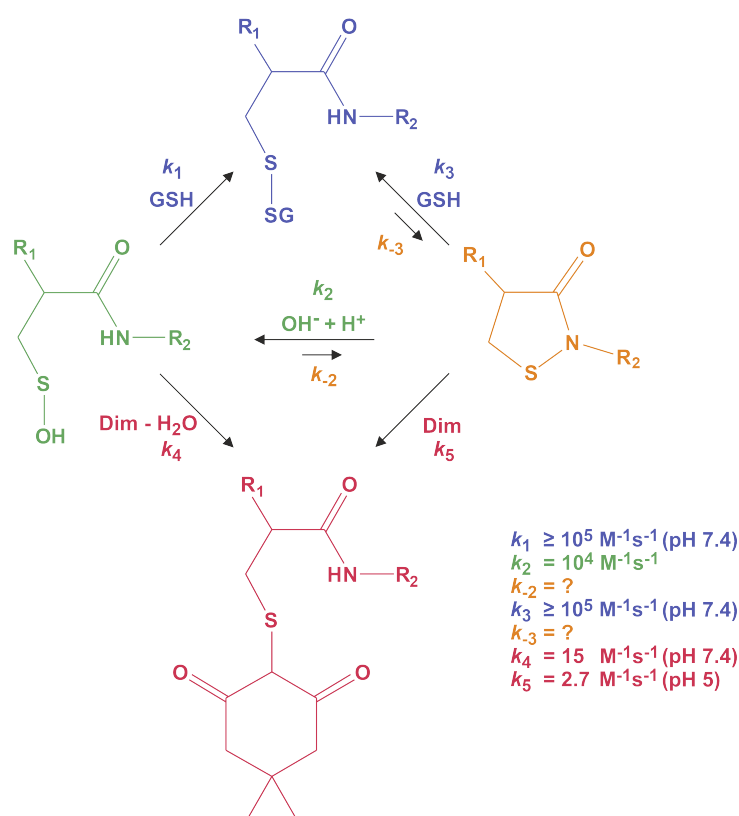


Abbildung 4.1: Zusammenfassung der ermittelten und abgeschätzten kinetischen Geschwindigkeitskonstanten zwischen dem elektrophilen cyclischen Sulfenylamid oder der korrespondierenden Sulfensäure mit den Nucleophilen OH^- , GSH und Dimedon. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Geschwindigkeitskonstanten potenzieller Konkurrenzreaktionen zur Detektionsreaktion zwischen Dimedon und Sulfensäureresten [1].

Sie sind in Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1 im Vergleich mit Literaturwerten zusammengefasst. Basierend auf den Ergebnissen kann die Reaktivität und Selektivität von Dimedon, verglichen mit seinen potenziellen Konkurrenz-Nucleophilen OH^- und GSH, gegenüber Sulfensäuren und den konkurrierenden Off-Targets wie beispielsweise cyclischen Sulfen-

4.1. DIMEDON-PROJEKT

nylamiden, ausführlich diskutiert werden. Zur Diskussion werden auch die Kompetitionsassays mit einbezogen, die von M. sc. Lukas Lang *in vitro* mittels der Stopped-flow Methode und von Dr. Yannik Zimmermann *in vivo* in *S. cerevisiae* für die Publikation von Bischoff *et al.* [1] durchgeführt wurden.

Tabelle 4.1: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 4.1 mit Literaturwerten. Anmerkungen a) für $\text{GS}^- \approx 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. b) In ACN mit 570 μM H_2O . c) *in vitro* GSH-Dim Kompletions-Assay [1].

Elektrophil	Nukleophil	Geschwindigkeitskonstante ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Temperatur ($^\circ\text{C}$)	pH-Wert
Dipeptid SA	OH^-	$k_2=8,6 \times 10^3$	25	variable
Dipeptid SA	GSH	$k_3=3,1 \times 10^5$ ^a	25	7,4
Dipeptid SA	Dimedon	$k_5=2,7$ ^b	25	$\approx 5,0$
Dipeptid-SOH [160]	Dimedon	$k_4=15$	RT	7,4
Dipeptid-SOH	Dimedon	$k_4=12$	RT	7,4
Cystein-SOH [181]	Cystein	$k_4 > 10^5$	18	7,0
GSOH	GSH	$k_4 > 10^5$ ^c	RT	7,4
GSOH	Dimedon	k_4 =nicht detektierbar	RT	7,4
Serum Albumin-SOH [65]	Cystein	$k_1=22$	25	7,4
Serum Albumin-SOH [65]	GSH	$k_1=2,9$	25	7,4
Serum Albumin-SOH [65]	Dimedon	$k_4=0,03$	37	7,4
<i>Pf</i> AOP ^{L109M} -SOH [147]	GSH	$k_1=6,5 \times 10^5$	25	7,4
<i>Pf</i> AOP ^{L109M} -SOH	Dimedon	k_4 =nicht detektierbar	25	7,4/8,0
AhpC ^{C165S} -SOH [40]	Dimedon	$k_4=1,7$	37	7,0

4.1.1 Reaktivität und Selektivität von Dimedon gegenüber Sulfensäuren unter Berücksichtigung potenzieller Konkurrenz-Elektrophile und Nukleophile

Forman *et al.* [46] zeigten, dass Dimedon in Reaktion mit einem nicht-peptidischen Sulfenamid die gleiche Thioether-Struktur bildet, wie bei Reaktion mit der Sulfensäure. Beide Thioether-Strukturen sind massenspektrometrisch nicht unterscheidbar. Die qualitativen, massenspektrometrischen Daten von Forman *et al.* [46] ließen die Vermutung aufkommen, dass Dimedon nicht zwischen peptidischen Sulfensäuren und cyclischen Sulfonylamiden unterscheiden kann, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die Geschwindigkeitskonstanten beider Reaktionen sind ähnlich. Für die Reaktion zwischen Dimedon und der Sulfensäure in 33 % ACN und 67 % PBS bei pH 7,4 beträgt $k_4=15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Geschwindigkeitskonstante der direkten Reaktion zwischen Dimedon und SA wurde in ACN mit einem Wasseranteil von 560 μM bei einem pH-Wert von ungefähr 5 gemessen und beträgt $k_5=2,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Es ist zu beachten, dass die Messbedingungen beider Reaktionen nicht identisch waren. Sie wurden so gewählt, um kontrollieren zu können, welche Spezies gerade mit Dimedon reagiert. Die Ringöffnungsreaktion von SA in Abhängigkeit der $[\text{OH}^-]$ ist mit $k_2=8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ um mehr als drei Größenordnungen schneller als die Reaktion mit Dimedon. Allerdings lässt sich dieser kinetische Vorteil der Ringöffnungsreaktion durch das Erhöhen der Dim-Konzentration auf $> 1 \text{ mM}$ kompensieren. $[\text{Dim}]$ ist dann $4 \times 10^3 > [\text{OH}^-]$. Es ist anzunehmen, dass k_5 mit zunehmendem pH-Wert > 5.0 größer wird, da mit steigender Dimedon-Carbanionen-Konzentration auch die Reaktivität von Dimedon gegenüber SA erhöht wird. Allerdings muss beachtet werden, dass diese Interpretationen auf Messungen basieren, die in ACN mit maximal 570 μM Wasser und nicht in wässrigem PBS-Puffer durchgeführt wurden. Ein weiteres bedeutendes Ergebnis ist, dass die Reaktivität von GSH bei physiologischen Konzentrationen die Reaktivität von Dimedon als Nukleophil bei der Detektion von SA bzw. der korrespondierenden Sulfensäure um einige Größenordnungen übertrifft. Dieses Ergebnis wurde nicht nur für die

korrespondierende Sulfensäure des Dipeptid-Modells SA beobachtet, sondern auch für die im HPLC-Experiment *in situ* erzeugte Glutathion-Sulfensäure GSOH und für die Sulfensäure des Modell-Enzyms *Pf*AOP [1]. Diese Konkurrenz macht eine gezielte Detektion von Sulfensäuren durch Dimedon unter physiologischen Bedingungen noch unwahrscheinlicher. (übernommen aus [1])

4.1.2 Reaktivität von Dimedon gegenüber SA und weiteren Konkurrenz-Nukleophilen

Die UV-Vis Experimente haben gezeigt, dass die Stabilität von SA sehr stark pH-abhängig ist und zwischen den kinetisch untersuchten pH-Werten 6,4-7,9 sehr stark schwankt. Die Stabilität und Detektierbarkeit von cyclischen Sulfenylamiden in biologischen Proben könnte daher auch vom pH-Wert des jeweiligen subzellulären Kompartiments bzw. dem pH-Wert des Puffers abhängen, der zur Probenpräparation verwendet wurde. Ausschlaggebend für Stabilität und Reaktivität mit Dimedon ist auch die Mikro-Umgebung des Proteins in der sich das cyclische Sulfenylamid befindet. Ein Beispiel dafür ist die Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B), bei der nur die Sulfensäure mit Dimedon oder ähnlichen Detektionsproben reagiert, nicht aber das in der Protein-Mikro-Umgebung stabilisierte cyclische Sulfenylamid [182], [183]. Daher ist es wichtig jede Detektionssituation individuell zu betrachten, da proteinspezifische Eigenschaften oft großen Einfluss auf Reaktivität und Stabilität haben. Modell-Peptide können hier nur begrenzt helfen, da diese proteinspezifische Eigenschaften oft nicht widerspiegeln können und dahingehend limitiert sind. Da cyclische Sulfenylamide in biologischen Proben aufgrund hoher Cyclisierungsenergien seltener vorkommen als Sulfensäuren [68], [184], diese aber bevorzugt mit GSH reagieren, könnte es weitere elektrophile Konkurrenz-Spezies geben, die von Dimedon detektiert werden. Dazu gehören z.B. Persulfide (RSSH) bzw. daraus gebildete Perthiosulfensäuren (RSSOH), die durch Reaktion von Sulfensäuren mit H₂S entstehen [185], [186], [187], [188], [189]. Es wurde zwar bereits nachgewiesen, dass Dimedon nicht mit der Persulfid-Form von Gpx3 reagiert [190]. Trotzdem wäre es interessant, die Reaktivität anderer Persulfide

mit Dimedon zu untersuchen und zu prüfen, ob ein potenzielles Addukt unter Abspaltung von H_2S zur Bildung der gleichen Thioether-Struktur führt, wie sie für SA und Sulfensäuren nach Reaktion mit Dim gefunden wird. Die Frage, die sich stellt, ist, wie eine Dimedondetektion in biologischen Proben bei physiologischen GSH-Konzentrationen und der Anwesenheit anderer intrazellulärer Konkurrenz-Nukleophile funktionieren kann, während bei *in vitro* Messungen die Detektionsreaktion durch GSH kinetisch um mehrere Größenordnungen übertroffen wird. Persulfide als elektrophile Off-Targets könnten eine plausible Erklärung für die Dimedondetektion in biologischen Proben sein. Eine weitere Erklärung wären bislang unentdeckte Aktivierungs-Mechanismen von Dimedon etwa durch Metall-Ionen oder durch enzymatische Aktivierung, was eine lokale Erhöhung der Dimedon-Carbanionen-Konzentration zur Folge hätte und damit die Reaktivität von Dimedon gegenüber Sulfensäuren bzw. SA erhöhen würde. An dieser Stelle sind weitere Studien zu potenziellen Konkurrenz-Elektrophilen und Dimedon-Aktivierungs-Mechanismen notwendig, um die unterschiedlichen Beobachtungen zwischen *in vitro* und *in vivo* Messungen in Einklang zu bringen. (übernommen aus [1])

4.1.3 Kritische Beurteilung der physiologischen Relevanz der Dimedon Detektion

Wie aus den Ergebnissen der Stopped flow Messungen (Abb. 3.6) hervorgeht, ist GSH Dimedon als Nukleophil kinetisch um mehrere Größenordnungen überlegen. Die Reaktivität der *in situ* gebildeten Sulfensäure GSOH mit GSH oder Dimedon ist vergleichbar mit der Reaktivität nicht katalytischer, oberflächenexponierter Protein-Cysteinyl-Sulfensäuren, wohingegen die *Pf*AOP^{L109M}-Sulfensäure die Reaktivität einer katalytischen Sulfensäure widerspiegelt. Dimedon muss sich nicht nur gegen das Glutathionthiolat GS^- , sondern auch gegen Protein-Cysteinyl-Thiolate beweisen. Daher ist eine hohe Reaktivität und Selektivität gegenüber Sulfensäuren in biologischen Proben entscheidend, um sich gegen Konkurrenzreaktionen erfolgreich durchzusetzen. Es wurden bereits Detektionsproben entwickelt, die eine etwa 100-fach höhere Geschwindigkeitskonstante im Vergleich zu Dimedon auf-

wiesen [160], [66]. Jedoch kann eine erhöhte Reaktivität verbesserter Detektionsproben nicht direkt mit einer effektiveren Detektion korreliert werden, wie es von Gupta *et al.* [40] basierend auf der Reaktivität der Sulfensäure von humanem Serumalbumin berechnet wurde [65]. Humanes Serumalbumin reagiert sehr langsam mit GSH (Tab. 4.1), daher können Beobachtungen hinsichtlich dieses Proteins nicht generalisiert werden, schon gar nicht wenn einer der Hauptkonkurrenzreaktionen GSH involviert. Die Detektions-Effizienz einer Probe hängt also von den individuellen Geschwindigkeitskonstanten der konkurrierenden Reaktionen mit der jeweiligen Sulfensäure ab (Tab. 4.1) [40]. Zudem spielt auch die Konzentration von GS^- und anderen Protein-Cysteinyl-Thiolaten eine Rolle, die abhängig vom Organismus und dem jeweiligen subzellulären Kompartiment sehr unterschiedlich sein kann [61]. In *E. coli* beträgt die GSH-Konzentration 17 mM und in Hefe könnte die cytosolische GSH-Konzentration sogar bei 30 mM liegen [191], [192]. Für eine effektive Detektion müssen daher höhere Detektionsproben-Konzentrationen eingesetzt werden, was zu toxischen Wirkungen, Protein-Destabilisierung oder auch zur Messung von Artefakten führen kann. In einer Studie von Ferreira *et al.* wurden die Fluoreszenz-Proben CysOx1 und CysOx2 zur Detektion von oxidativen Protein-Cystein-Modifikationen eingesetzt [193]. Die Geschwindigkeitskonstanten von CysOx1 und 2 mit einem cyclischen Sulfenylamid als Modellsubstanz lagen bei 39 bzw 390 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, sind also mehrere Größenordnungen langsamer als eine Reaktion von SA mit GSH. Auch hier stellt sich also die Frage wie eine effektive Detektion in HeLa-Zellen mit 5-50 μM CysOx1 und 2 innerhalb einer Stunde bei physiologischen GSH-Konzentrationen funktioniert haben kann. Eine Erklärung könnte die irreversible Markierung eines Protein-Cysteinylrestes durch Dimedon sein, wohingegen die Glutathionylierung reversibel ist. Dadurch kann es mit der Zeit zu einer Akkumulierung Dimedon-detektierter Proteinreste kommen. Katalytische Cysteinylreste durchlaufen in Gegenwart oxidativer Redoxspezies zahlreiche kompetitive Redoxzyklen, was ebenfalls zu einer Akkumulation Dimedon-markierter Proteine führen könnte. Nicht katalytische Cysteinylreste hingegen durchlaufen Berechnungen zufolge weniger als einen bzw. wenige Redoxzyklen innerhalb einer Stunde, wie beispielsweise die

regulatorischen Cysteinyreste in PTP1B und GAPDH, die mehrere Minuten für einen einzigen Redoxzyklus brauchen [61], [194], [195]. In diesem Zusammenhang können repetitive Redoxzyklen und Akkumulation keine Erklärung für die effektive Detektion nicht katalytischer Cysteinyreste bei millimolaren GSH-Konzentrationen sein. Auch die zeitabhängige Inaktivierung des katalytischen Cysteinyrestes von *PfAOP*^{L109M} *in vitro* wurde im Steady-state-Experiment auch nach mehreren Redoxzyklen nicht beobachtet [1]. Für die zahlreichen detektierten Kandidaten für Cysteinyreste in Proteomstudien muss eine andere Erklärung gefunden werden. Unter anderem könnte die sehr sensitive Messmethode der Massenspektrometrie ein Grund für viele Treffer sein. Auch die Inaktivierung von Redoxenzymen oder die Oxidation von GSH und somit ein verändertes Redoxgleichgewicht sind mögliche Gründe. Eine weitere plausible Erklärung ist ein noch nicht aufgeklärter Aktivierungsmechanismus von Dimedon bzw. Dimedon-basierten Detektionsproben, der die Reaktivität gegenüber oxidierten Protein-Cysteinyresten erhöht. Entscheidend ist, dass eine Detektionsprobe nicht allgemein für jedes Detektionsproblem verwendet werden kann, nur weil sie für ein Modell effektiv funktioniert. Vielmehr ist es sinnvoll die Detektion an das jeweilige Detektionsproblem bzw. die -umgebung anzupassen, da es zu viele Parameter gibt, die protein- bzw. modellspezifisch sind. (übernommen aus [1])

4.1.4 Fazit und Ausblick zum Dimedon-Projekt

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Studie, dass die Detektion von Proteinpeptiden oder kleinen Modellpeptiden mit Dimedon, nicht zwangsläufig auf die Anwesenheit von Cysteiny-Sulfensäuren zurückzuführen ist [1]. In zahlreichen Studien und Veröffentlichung wurde jedoch immer eine hohe Selektivität von Dimedon gegenüber Sulfensäureresten angenommen. Diese angeblich selektive Dimedon-Detektionsreaktion bildete die Grundlage für zahlreiche Sulfensäure Datensätze und Vorhersagealgorithmen [22], [156], [157], [158], [54], [52]. Mögliche Off-Target Reaktionen wurden ausgeblendet. In Bischoff *et al.* [1] konnte durch massenspektrometrische Analysen das korrespondierende cyclische Sulfonylamid als Konkurrenzelektrophil für die Sulfensäure identifiziert werden. Dimedon

wird durch mikromolare Mengen an Wasser zum Dimedon-Carbanion aktiviert, somit ist auch bei $\text{pH} \approx 5$ eine direkte Reaktion mit dem cyclischen Sulfenylamid möglich, auch ohne vorherige Ringöffnung zur Sulfensäure. *In vitro* und *in vivo* Studien, bei denen Dimedon als Detektionsprobe verwendet wurde, deuten auf einen bisher unaufgeklärten Reaktionsmechanismus oder eine unbekannte Redoxspezies hin, die anstatt der Sulfensäure gebildet und detektiert wird [1]. Zudem ist GSH ein in millimolarer Konzentration vorhandenes, sehr reaktives Konkurrenz-nukleophil für Dimedon. Daher wird für künftige Detektionsstudien empfohlen ein Kompetitionsassay mit GSH durchzuführen. Auf diese Weise kann die Wettbewerbsfähigkeit von nukleophilen Detektionsproben für cyclische Sulfenamide, Sulfensäuren oder andere elektrophile Cystein-Modifikationen gegenüber Konkurrenz-nukleophilen geprüft werden. Zur weiteren Untersuchung der Ringöffnungsreaktion und der zugrunde liegenden Kinetik können beispielsweise weitere Modellsubstanzen mit anderen Eigenschaften synthetisiert werden. Denkbar wäre dabei die Verwendung alternativer Schutzgruppen, wie Cbz- oder Dansylreste. Die dadurch gewonnenen Fluoreszenzeigenschaften der Modellsubstanz vereinfacht die Reaktionsverfolgung und die Detektion eines potenziellen Dimedon-Addukts. Außerdem könnte versucht werden, die Löslichkeit der Modellsubstanz in PBS-Puffer zu verbessern. So können die kinetischen Analysen unter physiologischen Bedingungen, ohne Zugabe eines organischen Lösungsmittels durchgeführt werden und wären besser vergleichbar mit *in vivo* Daten. Auch bezüglich des GSH-Kompetitions-Assays mittels HPLC (Abb. 3.7) sind einige Folgeexperimente denkbar. Anstatt GSH könnte auch die Modellsubstanz SA oder modifizierte Modellsubstanzen zur *in situ* Erzeugung der Sulfensäure verwendet werden. Zudem können alternative Detektionsproben eingesetzt werden, vorzugsweise mit einer verbesserten Reaktivität gegenüber dem entsprechenden Elektrophil (beispielsweise die in [67] vorgeschlagenen Detektionsproben). Diese decken eine Spanne an Geschwindigkeitskonstanten der Detektionsreaktion zwischen $k=10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (DYn-2), vergleichbar zur Reaktion von Dim und SA/Sulfensäure, bis hin zu BTD mit einer 100-fach höheren Geschwindigkeitskonstante von $k=1700 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ab [67]. Bereits bestehende Daten könnten somit überprüft und die potenzielle Detektionsreakti-

on von Sulfensäuren auch hinsichtlich möglicher Off-Targets genauer untersucht werden. (übernommen aus [1])

4.2 STRESSistance-Projekt

4.2.1 Nachweis der Bildung rekombinanter *RgDAAO* in *P. falciparum* mittels Westernblotanalyse

Die Bildung des Redoxenzym *RgDAAO* konnte mittels Westernblot-Analyse in den transgenen Stämmen mit Cyto, MitoM und IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} nachgewiesen werden. Die analysierten Stämme mit *RgDAAO*^{WT} und *RgDAAO*^{R285A} zeigten kompartimentspezifisch jeweils gleiche Signale, während für die Negativkontrolle, den pHBRH-Stamm mit der *RENILLA LUCIFERASE* anstatt *RGDAAO* erwartungsgemäß kein Signal detektiert wurde. Die Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} bzw. Cyto *RgDAAO*^{R285A}, für die keine Zielsequenz notwendig war zeigten eine Bande des Enzyms *RgDAAO* mit *N*-terminalem 3xHA-Tag bei 43,8 kDa. Für die Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} bzw. MitoM *RgDAAO*^{R285A} und IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. IMS *RgDAAO*^{R285A} wurden jeweils mehrere Banden beobachtet (Abb. 3.8), was auf eine teilweise bzw. vollständige Abspaltung der Zielsequenzen durch Proteasen beim mitochondrialen Import hindeutet. Bei allen untersuchten Stämmen war die intensivste Bande die bei 43,8 kDa, somit wurde der Großteil des Enzyms prozessiert und besitzt keinen 3xHA Tag mehr, der bei allen Plasmiden außer Cyto *RgDAAO*^{WT} bzw. Cyto *RgDAAO*^{R285A} zwischen Zielsequenz und Enzym lokalisiert war. Da nicht bekannt ist in welchem Kompartiment das gereifte Protein ist kann es einerseits cytosolisch sein, da die Bandengröße zu den Stämmen mit Cyto *RgDAAO*^{WT} bzw. Cyto *RgDAAO*^{R285A} vergleichbar war. Andererseits könnte die Abspaltung der Zielsequenz als Nachweis für einen erfolgreichen Import ins gewünschte Kompartiment gedeutet werden. Die Zielsequenz könnte beim mitochondrialen Import oder bereits im Cytosol abgespalten werden. Eventuell wurde die Zielsequenz überhaupt nicht translatiert.

Basierend auf den Mikroskopiedaten der Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} bzw. MitoM *RgDAAO*^{R285A} konnte der Import der cytosolisch gebildeten funktionalen oder inaktiven *RgDAAO* in die mitochondriale Matrix nachgewiesen werden. Da die Immunofluoreszenzmikroskopie weniger sensitiv ist als die Westernblotanalyse muss die Konzentration an funktionaler bzw. inaktiver *RgDAAO* ausreichend hoch gewesen sein, um detektiert zu werden. Für die Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. IMS *RgDAAO*^{R285A} konnte die funktionale bzw. inaktive *RgDAAO* nicht lokalisiert werden. Deshalb ist unklar, ob ein Import in den mitochondrialen Intermembranraum stattfindet. Das Kompartiment ist sehr klein, daher ist die importierte Enzymmenge mit 3xHA-Tag im Gegensatz zur mitochondrialen Matrix, eventuell zu niedrig, um mittels IFA-Mikroskopie detektiert zu werden. Das wird auch durch die geringe Bandenintensität der Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. IMS *RgDAAO*^{R285A} bei 52,6 kDa (Vorläuferprotein) im Vergleich zur Bande bei 43,8 kDa des prozessierten Proteins deutlich. Der 3xHA-Tag könnte sowohl beim mitochondrialen Import, als auch bereits im Cytosol durch Proteasen abgebaut worden sein. Auch hier ist es möglich, dass der Tag nicht translatiert wurde. Auffällig ist, dass die Bande des Vorläuferproteins der Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. IMS *RgDAAO*^{R285A} bei 52,6 kDa anstatt wie berechnet bei 50,4 kDa liegt. Das Laufverhalten der Enzyms wird vermutlich durch die Eigenschaften der *N*-terminalen Peptide der IMS-Zielsequenz beeinflusst.

Bezüglich der Blastocidin abhängigen Bildung der funktionalen *RgDAAO* im Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} und MitoM *RgDAAO*^{WT} wurde eine Zunahme der Bandenintensität mit zunehmender Blastocidinkonzentration bis 40 µg/ml beobachtet (Abb. 3.9). Bei 50 µg/ml Blastocidin wurde die Bandenintensität wider erwarten schwächer, was auf eine toxische Wirkung von Blastocidin ab 50 µg/ml hindeutet. Der *P. falciparum* Lebenszyklus war retardiert und die Anzahl an Merozoiten pro Schizont erschien niedriger als normal. Vermutlich ist auch die Anzahl der Parasiten mit genügend Plasmidkopien mit dem Blastocidin-Resistenzmarker viel geringer als bei niedrigeren Blastocidinkonzentrationen. Viele der Parasiten besitzen nicht die notwendige Resistenz und können deshalb diesem Selektionsdruck nicht stand halten. Die gebildete Enzymmenge an *RgDAAO*^{WT}

erreicht einen Sättigungswert bei einem Selektionsdruck von 40 µg/ml Blastocidin.

4.2.2 Lokalisation des Redoxenzym *RgDAAO* mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Die erfolgreiche Bildung des Redoxenzym *RgDAAO*, sowie dessen korrekte Lokalisation konnte in den Kompartimenten Cytosol und mitochondrialer Matrix gezeigt werden (Abbildungen 3.10, 3.12, 3.8). In der Verdauungsvakuole und dem mitochondrialen Intermembranraum konnte kein α -HA-Signal detektiert werden, obwohl der Selektionsdruck bereits auf 15 µg/ml Blastocidin angehoben wurde. In der Verdauungsvakuole wurde der 3xHA-Tag vermutlich durch Proteasen abgetrennt und abgebaut, wodurch das Enzym, trotz verstärkter Bildung, nicht lokalisiert werden konnte, das Ergebnis im IFA-Assay war daher negativ (Abb. 3.11). Ob das Redoxenzym im Stamm mit DV *RgDAAO*^{WT} überhaupt gebildet wird muss noch mittels Westernblot-Analyse festgestellt werden, sobald das Plasmid DV pHBIRH-DV¹⁻⁷⁰ 3xHA *RgDAAO*^{R285A} erfolgreich in den *Pf3D7*^{WT} Stamm transfiziert wurde. Die Transfektion des Plasmids ist zuvor fehlgeschlagen und der zugehörige Stamm 3D7 DV *RgDAAO*^{R285A} konnte nicht erzeugt werden. Für die Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} und IMS *RgDAAO*^{R285A} konnte die Bildung des Enzyms bereits im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Ein α -HA-Signal wurde im IFA-Assay jedoch nicht beobachtet (Abb. 3.13). Das Kompartiment des mitochondrialen Intermembranraums ist sehr klein, daher könnte die Konzentration des getaggten Proteins zu niedrig sein, um eindeutig detektiert zu werden. Eine weitere Erklärung könnten Proteasen im Intermembranraum der Mitochondrien sein, die den 3xHA-Tag abbauen. Die Banden der Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} und IMS *RgDAAO*^{R285A} in der Westernblot-Analyse konnten nur detektiert werden, da diese Methode viel sensitiver ist als die IFA-Mikroskopie. Um in künftigen Experimenten ein α -HA-Signal für die Stämme mit DV *RgDAAO*^{WT} bzw. DV *RgDAAO*^{R285A} und IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. IMS *RgDAAO*^{R285A} zu erhalten, könnte der Selektionsdruck dieser Kulturen auf 20, 30 oder 40 µg/ml Blastocidin erhöht werden. Dadurch wird die Menge an cytosolisch gebildetem Redoxenzym *RgDAAO*^{WT} bzw.

RgDAAO^{R285A} und anschließendem Import in den mitochondrialen Intermembranraum vermutlich stark genug erhöht, um der Zersetzung durch Proteasen bzw. der kleinen Größe des Kompartiments entgegenzuwirken. Die Blasticidin-abhängigen Westernblots (Abb. 3.9) haben gezeigt, dass die Parasiten auch bei diesen hohen Konzentrationen noch uneingeschränkt lebensfähig sind, erst ab 50 µg/ml Blasticidin setzt eine Retardierung des intraerythrozytären Zyklus ein, eventuell durch toxische Effekte des Selektionsantibiotikums.

4.2.3 Einfluss der kompartimentspezifischen Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration auf die Sensitivität von *P. falciparum* gegenüber Paraquat als Positivkontrolle

Durch die Analyse der IC₅₀-Werte der Stämme mit Cyto-, MitoM- und IMS-*RgDAAO*^{WT} für Paraquat, sollte die Anpassung des Parasiten an erhöhte Wasserstoffperoxidkonzentrationen untersucht werden. Da Paraquat durch Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff, Superoxidradikale erzeugt [178] und den Parasiten vermutlich in allen Kompartimenten angreift, wurde es als Positivkontrolle verwendet. Da es durch Zugabe von D-Aminosäuren zur Bildung von Wasserstoffperoxid durch die *RgDAAO*^{WT} kommt [196], wurde erwartet, dass dies in allen Kompartimenten zu einer höheren Sensitivität des Parasiten gegenüber Paraquat führt. Dabei war anzunehmen, dass der Parasit bereits durch die Bildung von Wasserstoffperoxid vorbelastet ist. Bezüglich der Stämme mit *RgDAAO*^{WT} ohne Behandlung mit D-Aminosäuren wurde ein IC₅₀-Wert erwartet, der dem von Paraquat in *P. falciparum* mit 53 µM [180] ähnlich ist, da es in diesem Fall vermutlich nicht zur Bildung von Wasserstoffperoxid kommt und daher auch keine Vorbelastung des Parasiten stattgefunden haben kann. Auch die IC₅₀-Werte der Stämme mit *RgDAAO*^{R285A} sollten, vergleichbar zum Stamm mit *RgDAAO*^{WT} ohne D-Aminosäure, in An- und Abwesenheit von D-Aminosäuren ebenfalls etwa bei 53 µM [180] liegen, da es sich um Negativkontrollen handelt und die *RgDAAO* durch die Punktmutante inaktiv ist. Un-

abhängig von der Zugabe einer D-Aminosäure kann in diesen Parasiten kein zusätzliches Wasserstoffperoxid gebildet werden. Die experimentellen Beobachtungen wichen jedoch stark von den oben beschriebenen Erwartungen ab und werden im Folgenden diskutiert.

IC₅₀-Werte der transgenen Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} oder Cyto *RgDAAO*^{R285A} für Paraquat

Die IC₅₀-Werte der Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} mit oder ohne Zugabe von D-Aminosäuren waren immer höher verglichen mit IC₅₀-Werten der Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} mit oder ohne D-Aminosäuren. Dieser Effekt wurde sowohl bei 4 als auch bei 15 µg/ml Blasticidin beobachtet und ist vermutlich auf eine Präadaptation des Parasiten zurückzuführen. Durch die cytosolische Bildung von *RgDAAO*^{WT} kommt es vermutlich zum Proteinstress und zur Hochregulierung von Peroxiredoxinen, die den Parasiten weniger sensitiv gegenüber Paraquat machen. Peroxiredoxine stellen für den Parasiten ein effizientes System, um Wasserstoffperoxid zu detoxifizieren. Sie sind die am stärksten vertretenen Proteine in Zellen [197]. In *P. falciparum* wurden fünf Peroxiredoxine identifiziert TPx-1 (Prx1a), TPx-2 (Prx1m), Prx5/AOP, Prx6, und PrxQ/nPrx [128]. Peroxiredoxine können dabei auch als Chaperone fungieren und den Parasiten bei der Proteinfaltung unterstützen, wie beispielsweise das cytosolische 2-Cys Peroxiredoxin PfTPx1 (PfPrx1a) [198], [199], [128]. Das Cytosol besitzt den Großteil der Redoxkapazität des Parasiten unter anderem auch Peroxiredoxine wie 1-Cys-Peroxiredoxine, die Thioredoxin-abhängige Peroxidase TPx-1 oder das Antioxidant Protein AOP [128], das auch im Apicoplast lokalisiert ist [142]. Ein weiterer Faktor, der zur Präadaptation beitragen könnte ist der Import von humanem Peroxiredoxin 2 (hPrx-2) ins Cytosol des Parasiten, um es dort zusätzlich zur Detoxifikation von Wasserstoffperoxid zu nutzen [139]. Der Anpassungseffekt findet in Anwesenheit von *RgDAAO*^{WT} jedoch unabhängig von der Zugabe einer D-Aminosäure statt. So lag beispielsweise der IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} ohne D-Alanin, der bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml hochsignifikant höher verglichen zum Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} bei Zugabe von D-Alanin. Das deutet auf einen

endogenen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* hin, da auch ohne Zugabe von exogenen D-Aminosäuren eine verringerte Sensitivität gegenüber Paraquat auftritt. Eine mögliche Quelle endogener D-Aminosäuren könnte der Apicoplast sein. Der Apicoplast ist ein spezielles Organell, ein Plastid, das nur in Apicomplexa auftritt [200]. Der Apicoplast ist insgesamt von vier Hüllmembranen umgeben [201], [202], das Organell ist demnach vermutlich ursprünglich durch sekundäre Endosymbiose [203] einer Rotalge als primärer Endosymbiont entstanden [204], [205]. Es ist bekannt, dass beispielsweise in Pflanzen ein D-Aminosäuremetabolismus existiert. Die biologische Funktion von D-Aminosäuren in Pflanzen ist jedoch unbekannt [206]. Die Tatsache, dass der D-Aminosäuremetabolismus weiterhin in Pflanzen vorhanden ist und nicht evolutionär aussortiert wurde könnte auf wichtige Funktionen der D-Aminosäuren hindeuten [206]. Porras-Dominguez *et al.* stellen in ihrem Review-Artikel die Hypothese eines evolutionären Szenarios bezüglich des D-Aminosäuremetabolismus in Pflanzen auf. Demnach haben vermutlich spezifische Bakterien wie α -Proteobakterien oder Cyanobakterien Gene, die für Proteine kodieren, die am D-Aminosäuremetabolismus beteiligt sind durch Endosymbiose auf Pflanzen übertragen. Dazu gehören z.B. Enzyme wie die Alanin-Racemase, die Glutamin-Racemase oder die D-Aminosäure Transaminase [206]. Dieses Szenario wurde hypothetisch für eine Grünalge anstatt für eine Rotalge beschrieben, die als primärer Endosymbiont des Apicoplast gilt [206]. Basierend auf dieser Hypothese liegt die Vermutung eines bislang unentdeckten, endogenen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* sehr nahe. Es ist anzunehmen, dass der Apicoplast bei seiner Entstehung die zugehörigen Enzyme durch die Endosymbiose hinzugewonnen und aus einem bislang unbekanntem Grund behalten hat [206]. Da ursprünglich eine höhere Sensitivität der Stämme mit $RgDAAO^{WT}$ gegenüber Paraquat erwartet wurde, könnte der niedrigere IC_{50} -Wert des Stammes mit Cyto $RgDAAO^{WT}$ nach Zugabe von D-Alanin im Vergleich zum Stamm ohne D-Alanin jedoch auch durch das gebildete Wasserstoffperoxid erklärt werden, welches den Parasiten zusätzlich zu Paraquat schwächt, hier überwiegt vermutlich bereits der Wasserstoffperoxidstress (siehe Abb. 4.2, rechts). Im Stamm mit Cyto $RgDAAO^{WT}$ ohne D-Alanin wurde unter Annahme eines D-

4.2. STRESSISTANCE-PROJEKT

Aminosäuremetabolismus bei 4 µg/ml Blasticidin vermutlich weniger Wasserstoffperoxid gebildet als durch exogene Zugabe der D-Aminosäure, wodurch der Parasit widerstandsfähiger gegenüber Paraquat war. Die IC₅₀-Werte des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{WT} mit oder ohne D-Methionin oder D-Valin unterschieden sich nicht voneinander, was auch dafür spricht, dass der Parasit einen endogenen Zugang zu D-Aminosäuren haben muss, da die exogene Zugabe keinen Einfluss auf den IC₅₀-Wert zu haben scheint. Der IC₅₀-Wert des Stamms mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} war nach Zugabe von D-Methionin schwach signifikant niedriger als ohne D-Methionin, was zunächst auf einen toxischen Effekt des D-Aminosäure hindeutete, der jedoch weder bei einem höheren Selektionsdruck noch in einem andern Kompartiment reproduziert werden konnte. Die IC₅₀-Werte der Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{R285A} lagen höher als 53 µM, was dem IC₅₀-Wert des *Pf3D7*^{WT} Stamms für Paraquat entspricht [180]. Das spricht dafür, dass es auch in Parasiten mit inaktiver *RgDAAO*^{R285A} zu einer Präadaptation durch Proteinstress und Hochregulation von Peroxiredoxinen kommt. Bei einem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin wurde der bei 4 µg/ml Blasticidin beobachtete Stresseffekt durch Wasserstoffperoxid für den Stamm mit Cyto *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Alanin nicht beobachtet, da hier der IC₅₀-Wert schwach signifikant höher war als ohne D-Alanin, hier dominierte die Präadaptation des Parasiten (siehe Abb. 4.2, links).

IC₅₀-Werte der transgenen Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} oder MitoM *RgDAAO*^{R285A} für Paraquat

Der stärkste Anpassungseffekt wurde bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin für den Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Methionin beobachtet. Der IC₅₀-Wert lag dabei hochsignifikant über dem des Stamms mit MitoM *RgDAAO*^{WT} ohne D-Methionin. Auch bei Zugabe der D-Aminosäuren D-Alanin und D-Valin wurde ein sehr starker, hochsignifikanter Anpassungseffekt beobachtet. Der Parasit ist in Anwesenheit von *RgDAAO*^{WT}, sowie nach Zugabe einer D-Aminosäure offenbar sehr widerstandsfähig gegenüber Paraquat. Eine Erklärung für die starke Präadaptation könnte eine hohe

Konzentration an D-Aminosäure in der mitochondrialen Matrix sein, wodurch mehr Wasserstoffperoxid in diesem Kompartiment gebildet werden konnte was vermutlich wiederum zur Hochregulierung von Peroxiredoxinen wie beispielsweise der mitochondrialen PfTPx-2 (PfPrx1m), die zu den 2-Cys Peroxiredoxinen gehört und auch als Chaperon aktiv sein kann [199], [198], [128], [207]. Das führt wiederum zu einer stärkeren Anpassung des Parasiten gegenüber Paraquat. Ein weiterer Grund könnte eine hohe Konzentration des Enzyms *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix sein. Dies wäre möglich wenn das cytosolisch gebildete Enzym sehr gut in die Mitochondrien transportiert werden kann, was darauf hindeutet, dass die verwendete Zielsequenz sehr effektiv ist. Durch die hohe Konzentration des Redoxenzym kommt es zu erhöhtem Proteinstress in der mitochondrialen Matrix, was wiederum zur Hochregulierung der Peroxiredoxine, die eventuell auch als Chaperone aktiv sind, führt. Daraus resultiert ein starker Anpassungseffekt des Parasiten und erheblich verringerte Sensitivität gegenüber Paraquat. Bei 4 µg/ml Blasticidin befindet sich der Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Methionin noch im Bereich der Präadaptation (Abb. 4.2, links), der Parasit zeigt eine erhebliche Resistenz gegenüber Paraquat. Das auch die Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} ohne exogene Zugabe von D-Aminosäuren hochsignifikant höhere IC₅₀-Werte im Vergleich zu Stämmen mit MitoM *RgDAAO*^{R285A} ohne D-Aminosäuren zeigen deutet erneut auf einen endogenen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* hin. Allgemein waren die IC₅₀-Werte der Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{WT} hochsignifikant höher als die mit MitoM *RgDAAO*^{R285A}. In Anwesenheit des funktionalen Enzyms *RgDAAO*^{WT} in der mitochondrialen Matrix war der Parasit durch Verwendung exogener oder endogener (im Falle der Annahme eines D-Aminosäuremetabolismus) D-Aminosäuren in der Lage sich effektiv anzupassen. Die Stämme mit MitoM *RgDAAO*^{R285A} zeigen bei Zugabe von D-Alanin eine signifikant höheren IC₅₀-Wert als ohne D-Alanin. Hier hat die Anwesenheit von D-Alanin eine positive Auswirkung auf die Widerstandsfähigkeit des Stammes gegenüber Paraquat, dieser konnte jedoch weder bei einem höheren Selektionsdruck noch für ein anderes Kompartiment reproduziert werden. Nach Erhöhung des Selektionsdrucks auf 15 µg/ml Blasticidin war

4.2. STRESSISTANCE-PROJEKT

der IC_{50} -Wert des Stammes mit MitoM $RgDAAO^{WT}$ nach Zugabe von D-Alanin schwach signifikant niedriger als ohne D-Alanin. In diesem Fall wird durch die erhöhte Blastocidin-konzentration mehr $RgDAAO^{WT}$ im Cytosol gebildet und in die mitochondriale Matrix transportiert, wodurch die Enzymmenge und die Menge an Wasserstoffperoxid erhöht wird. Bei diesem Experiment dominiert vermutlich die Toxizität des Wasserstoffperoxids. Diese Beobachtung deutet zudem darauf hin, dass die positive Präadaptation des Parasiten begrenzt ist wie in Abbildung 4.2 dargestellt. Ab einer gewissen Konzentration an Wasserstoffperoxid dominiert dessen Toxizität und der beobachtete Effekt wird gegenläufig. Es kommt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Paraquat. Ein Vergleich aller Experimente des Stammes mit MitoM $RgDAAO^{WT}$ bei den getesteten Selektionsdrücken und D-Aminosäuren zeigt, dass es sich bei dieser Beobachtung um eine Anomalie von einem aus fünf Experimenten handelt. Der IC_{50} -Wert des Stammes mit MitoM $RgDAAO^{WT}$ nach Zugabe von D-Methionin ist zwar hochsignifikant höher im Vergleich zum gleichen Stamm ohne D-Methionin, trotzdem liegt der IC_{50} -Wert 16 % niedriger im Vergleich zum gleichen Stamm bei Zugabe von D-Methionin und einem Selektionsdruck von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin. Nach Zugabe von D-Methionin ist der toxische Effekt von Wasserstoffperoxid zwar weniger stark ausgeprägt als nach Zugabe von D-Alanin, aber trotzdem vorhanden (Abb. 4.2). Was wiederum auf einen toxischen Effekt von D-Alanin hindeuten könnte, der jedoch bei erhöhtem Selektionsdruck in keinem andern Kompartiment beobachtet werden konnte. Allein der Anstieg des IC_{50} -Werts des Stammes mit MitoM $RgDAAO^{WT}$ bei 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin ohne Zugabe von D-Alanin um 12 % im Vergleich zum gleichen Stamm bei 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin unterstützt diese Hypothese. Der IC_{50} -Wert des Stammes mit MitoM $RgDAAO^{WT}$ ohne Zugabe von D-Methionin ist bei 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin hingegen um 13 % niedriger als bei 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin. Das könnte unter Annahme eines endogenen D-Aminosäuremetabolismus einerseits darauf hindeuten, dass die Menge an internen D-Aminosäuren begrenzt sein muss und damit auch die Präadaptation ohne exogene Zugabe von D-Aminosäuren limitiert ist. Andererseits könnte es auf einen dominierenden toxischen Effekt durch Wasserstoffperoxid hindeuten, da bei höherem Se-

lektionsdruck mehr Protein und somit auch mehr Wasserstoffperoxid gebildet wird (Abb. 4.2). Die IC_{50} -Werte der Stämme mit MitoM $RgDAAO^{R285A}$ nehmen bei 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin bei den Experimenten mit und ohne Zugabe von D-Alanin oder D-Methionin im Vergleich zu den Experimenten bei 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin zu. Hier verursacht die erhöhte Menge an inaktivem Redoxenzym vermutlich ebenfalls eine Präadaptation der Parasiten, die deren Sensitivität gegenüber Paraquat verringert. Da in diesen Stämmen kein Wasserstoffperoxid gebildet werden kann, dominiert bei diesem Selektionsdruck noch der positive Anpassungseffekt, vermutlich durch Hochregulierung von Peroxiredoxinen, die als Chaperone fungieren, wie TPx-2 [207].

IC_{50} -Werte der transgenen Stämme mit IMS $RgDAAO^{WT}$ oder IMS $RgDAAO^{R285A}$ für Paraquat

Bei den Stämmen mit IMS $RgDAAO^{WT}$ wurde bei einem Selektionsdruck von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin sowohl mit als auch ohne Zugabe von D-Aminosäuren keine Präadaptation beobachtet. Dies könnte mit einem schlecht funktionierenden Import des Redoxenzyms in das kleine Kompartiment des mitochondrialen Intermembranraums zu erklären sein. Wenn nur ein Bruchteil des cytosolisch gebildeten Enzyms importiert wird reicht die bei 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin im Cytosol gebildete Menge des Redoxenzym nicht aus um eine merkliche Präadaptation des Parasiten hervorzurufen. Das kleine Kompartiment könnte ggf. auch durch zu hohe Wasserstoffperoxidkonzentrationen überladen sein, welches ins Cytosol diffundieren könnte. Aufgrund von zu hohen Proteinmengen an $RgDAAO^{WT}$ bzw. $RgDAAO^{R285A}$ könnte es zudem verstärkt zu Mistargeting kommen wodurch wiederum mehr Protein im Cytosol verbleibt. Allerdings konnte diese Hypothese bei höherem Selektionsdruck von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin trotz höherer Enzymmengen und höherer Wasserstoffperoxidkonzentrationen im Parasiten nicht bestätigt werden. Es könnte jedoch auch sein, dass das Redoxenzym nicht vollständig im mitochondrialen Intermembranraum ankommt, da Teile davon, beispielsweise die Zielsequenz oder der 3xHA-Tag zuvor von Proteasen abgebaut wurden, wie zuvor durch Westernblotanalyse des Stammes mit IMS $RgDAAO^{WT}$ bzw.

4.2. STRESSISTANCE-PROJEKT

IMS $RgDAAO^{R285A}$ gezeigt wurde. Auch die Ergebnisse der IFA-Mikroskopie unterstützen diese Vermutungen zumindest bei einem Selektionsdruck von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin, da für die Stämme mit IMS $RgDAAO^{\text{WT}}$ und IMS $RgDAAO^{R285A}$ kein α -HA-Signal beobachtet wurde. Der IC_{50} -Wert des Stamms mit IMS $RgDAAO^{R285A}$ lag nach Zugabe von D-Alanin schwach signifikant höher als der des Stammes mit IMS $RgDAAO^{\text{WT}}$ mit D-Alanin. In diesem Fall scheint für den Stamm mit IMS $RgDAAO^{\text{WT}}$ der toxische Effekt der Wasserstoffperoxidbildung zu dominieren (Abb. 4.2), diese Vermutung konnte jedoch bei höherem Selektionsdruck von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin nicht bestätigt werden. Daher ist es wahrscheinlicher, dass bei niedrigem Selektionsdruck noch keine Präadaptation aus oben genannten Gründen stattgefunden hat. Stattdessen führte die Zugabe von D-Alanin offenbar zu einem positiven Anpassungseffekt des Stamms mit IMS $RgDAAO^{R285A}$ mit D-Alanin, der die Sensitivität gegenüber Paraquat verringerte. Dieser Effekt konnte jedoch weder bei 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin, noch in anderen Kompartimenten reproduziert werden.

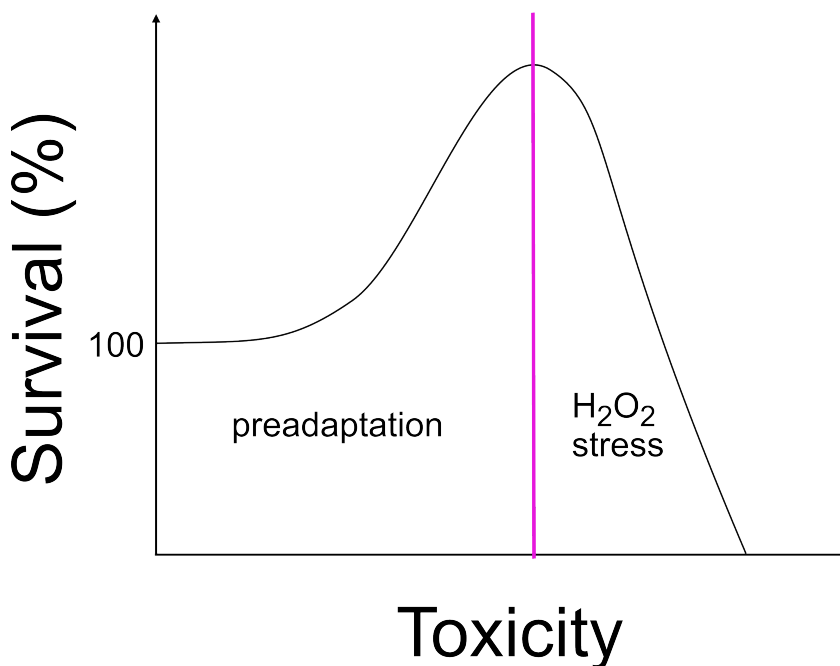


Abbildung 4.2: Präadaptationshypothese von *P. falciparum* Parasiten transgener Stämme mit $RgDAAO^{WT}$. Schematische Auftragung der Überlebensfähigkeit der Parasiten gegenüber Paraquat gegen die Toxizität, die potenziell von zu hohen Enzymmengen oder Wasserstoffperoxidkonzentrationen ausgeht. Die durchschnittliche Überlebensfähigkeit der Parasiten nur gegenüber Paraquat wird hier rein schematisch als 100 % angenommen. Es ist anzunehmen, dass es durch die Anwesenheit des Redoxenzym $RgDAAO^{WT}$ und der Bildung von Wasserstoffperoxid zunächst zu einer Präadaptation des Parasiten kommt. Dies könnte beispielsweise durch Hochregulation von Peroxiredoxinen geschehen, was den Parasiten widerstandsfähiger gegenüber Paraquat macht und somit die Überlebensfähigkeit steigert (linker Teil der Kurve bis zum Kurvenmaximum). Eine Erhöhung des Selektionsdrucks führt zu höheren Enzymmengen und höheren Wasserstoffperoxidkonzentrationen im Parasiten. Ab einem gewissen Punkt kommt es vermutlich vereinzelt zu toxischen Effekten durch Wasserstoffperoxid oder übermäßigem Proteinstress wodurch die Überlebensfähigkeit gegenüber Paraquat absinkt (rechter Teil der Kurve).

Bei Erhöhung des Selektionsdrucks auf 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin und damit verbundener Erhöhung des Enzymmenge und der gebildeten Wasserstoffperoxidmenge wurde eine Präadaptation der Stämme mit IMS $RgDAAO^{WT}$ sichtbar. Die IC_{50} -Werte des Stämme mit IMS $RgDAAO^{WT}$ lagen jeweils mit oder ohne D-Aminosäurezugabe hochsignifikant höher als die der Stämme mit IMS $RgDAAO^{R285A}$. Durch die Erhöhung der Enzymmenge findet vermutlich ein ausreichender Transport in den mitochondrialen Intermembranraum statt. Die Parasiten präadaptieren sich vermutlich aufgrund von Proteinstress und erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentrationen, beispielsweise durch Hochregulierung von Peroxire-

doxinen. Bei einem kleinen Kompartiment wie dem mitochondrialen Intermembranraum sollte der Proteinstress durch die hohen Mengen an importiertem Redoxenzym stärker ins Gewicht fallen als in anderen, größeren Kompartimenten, diese Hypothese konnte jedoch anhand der Daten nicht bestätigt werden. Die Parasiten mit IMS *RgDAAO*^{WT} präadaptieren sich nicht stärker als in anderen Kompartimenten. Es kommt jedoch auch nicht zu einer höheren Sensitivität der Parasiten gegenüber Paraquat, aufgrund der Toxizität von Wasserstoffperoxid (Abb. 4.2) bei 15 µg/ml Blasticidin, wie es beim Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Aminosäuren der Fall ist. Das deutet darauf hin, dass nicht die gesamte Menge an im Cytosol gebildetem Redoxenzym den mitochondrialen Intermembranraum erreicht. Toxische Effekte von Wasserstoffperoxid treten bei Stämmen mit IMS *RgDAAO*^{WT} vermutlich erst bei noch höheren Selektionsdrücken auf. Da auch Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} ohne Zugabe von D-Aminosäuren einen Präadaptationseffekt zeigen und eine verringerte Sensitivität gegenüber Paraquat aufweisen ist auch hier ein endogener D-Aminosäuremetabolismus zu erwarten.

Die experimentellen Beobachtungen können gut anhand von Abbildung 4.2 zusammengefasst werden. In den meisten Fällen kommt es zu einer Präadaptation der Parasiten womit eine verringerte Sensitivität gegenüber Paraquat einhergeht. Diese Präadaptation erfolgt sowohl für Stämme mit *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe von D-Aminosäuren, aber auch ohne D-Aminosäuren, was auf das Vorhandensein eines endogenen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* hindeutet. Durch den Proteinstress und die Bildung von Wasserstoffperoxid kommt es beispielsweise zur Hochregulierung von Peroxiredoxinen. Auch Stämme mit inaktiver *RgDAAO*^{R285A} zeigen einen schwachen Anpassungseffekt, aufgrund von Proteinstress. Die Präadaptation der Parasiten ist nur jedoch begrenzt möglich und in einzelnen Fällen, nach Erhöhung des Selektionsdrucks auf 15 µg/ml Blasticidin wird der Effekt rückläufig und die Toxizität von Wasserstoffperoxid und die Belastung durch hohe Enzymmengen überwiegt. Das spiegelt sich in einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Paraquat wider, wie beispielsweise beim Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} bei erhöhtem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin und nach Zugabe von D-Alanin.

4.2.4 Fazit und Ausblick zum STRESSistance-Projekt

Die D-Aminosäureoxidase aus *Rhodotorula gracilis* konnte erfolgreich heterolog in *P. falciparum* gebildet werden. Die Bildung des Redoxenzym wurde mittels Westernblot-Analyse für die Stämme mit Cyto, MitoM und IMS $RgDAAO^{WT}$ bzw. $RgDAAO^{R285A}$ nachgewiesen (Abb. 3.8). Für den Stamm mit DV $RgDAAO^{WT}$ wurde keine Westernblotanalyse durchgeführt, da das Konstrukt DV $RgDAAO^{R285A}$ nicht erfolgreich transfiziert werden konnte. Die Blasticidin-abhängige Bildung des Enzyms konnte für die Stämme mit Cyto $RgDAAO^{WT}$ und MitoM $RgDAAO^{WT}$ mittels Westernblotanalyse gezeigt werden. Die korrekte Lokalisation des Redoxenzym wurde mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie für die Stämme mit Cyto und MitoM $RgDAAO^{WT}$ bzw. $RgDAAO^{R285A}$ bei einem Selektionsdruck von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin gezeigt (Abbildungen 3.10, 3.12). Für die Stämme mit IMS $RgDAAO^{WT}$ bzw. $RgDAAO^{R285A}$ sowie DV $RgDAAO^{WT}$ war das Ergebnis, selbst bei erhöhtem Selektionsdruck von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin, negativ (Abbildungen 3.11, 3.13). Da die Parasiten bis zu einer Blasticidinkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sehr gut lebensfähig waren, könnte die Immunofluoreszenzmikroskopie bei diesem Selektionsdruck ein α -HA Signal für die Stämme mit IMS $RgDAAO^{WT}$ bzw. $RgDAAO^{R285A}$ sowie DV $RgDAAO^{WT}$ liefern. Mit Paraquat als Positivkontrolle konnte gezeigt werden, dass Stämme mit funktioneller $RgDAAO^{WT}$ generell eine geringere Sensitivität gegenüber Paraquat aufwiesen als die Stämme mit inaktivem Enzym $RgDAAO^{R285A}$. In Anwesenheit des $RgDAAO^{WT}$ Enzyms kam es unabhängig von der Zugabe von D-Aminosäuren vermutlich zu einer Präadaptation der Parasiten. Es ist anzunehmen, dass es als Reaktion auf Proteinstress und erhöhte Wasserstoffperoxidkonzentrationen, beispielsweise zur Hochregulierung von Peroxiredoxinen kam, was den Parasiten widerstandsfähiger gegenüber Paraquat machte. Vereinzelt wurde auch ohne Zugabe exogener D-Aminosäuren eine verringerte Sensitivität der Parasiten gegenüber Paraquat beobachtet, was auf einen endogenen D-Aminosäuremetabolismus in *P. falciparum* hindeutete. Eine mögliche Quelle endogener D-Aminosäuren könnte der Apicoplast sein, der ursprünglich durch sekundäre Endosymbiose einer Rotalge als Primärendosymbiont entstanden ist [204], [201], [203]. Durch die Endosymbiose könnten Ge-

ne, die für Enzyme codieren, die am D-Aminosäuremetabolismus beteiligt sind, durch prokaryotische Endosymbionten einst auf *Plasmodien* durch Bildung des Apicoplast übertragen worden sein [206]. Am stärksten war der Präadaptationseffekt beim Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} nach Zugabe einer D-Aminosäure. Der Stamm konnte sich sehr gut an die erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentrationen anpassen und gleichzeitig seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Paraquat erhöhen. Bei erhöhtem Selektionsdruck von 15 µg/ml Blasticidin wurde der Präadaptationseffekt schwächer bzw. gegenläufig und die Toxizität von Wasserstoffperoxid dominierte, was zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Paraquat führte. Der Anpassungseffekt der Parasiten gegenüber Proteinstress und Wasserstoffperoxid ist also limitiert. Der sehr starke Anpassungseffekt des Stammes mit MitoM *RgDAAO*^{WT} mit einer D-Aminosäure, aber auch die Limitierung des Anpassungseffekts bei Überlastung durch zu hohe Enzymmengen oder zu hohe Wasserstoffperoxidkonzentrationen machen den Stamm ausgehend von den IC₅₀-Werten für die Positivkontrolle Paraquat zu einem attraktiven und interessanten Kandidaten für Folgemessungen mit Antimalariamedikamenten, insbesondere Atovaquon, welches in den Mitochondrien wirkt. Die Transfektion des Plasmids DV *RgDAAO*^{R285A} in den *Pf3D7*^{WT} Stamm, sowie die Westernblotanalyse der Stämme mit DV *RgDAAO*^{WT} bzw. DV *RgDAAO*^{R285A} sind noch durchzuführen. Für den Stamm mit DV *RgDAAO*^{R285A} muss auch die Lokalisation des Redoxenzym mittels Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Durch die IC₅₀-Messungen der transgenen Stämme für Paraquat konnte prinzipiell eine Positivkontrolle etabliert werden, um in künftigen IC₅₀-Messungen den kompartimentspezifischen Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Wirkweise von Antimalariamitteln zu untersuchen. Auf Basis der Ergebnisse für die Positivkontrolle Paraquat kann für die transgenen Stämme künftig sowohl eine potenziell verringerte Suszeptibilität als auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Antimalariamedikamenten untersucht werden. Die IC₅₀-Messungen sind noch für die Antimalariamittel Chloroquin, Artemisinin und Atovaquon durchzuführen, sowie mit den Stämmen 3D7 DV *RgDAAO*^{WT} und 3D7 DV *RgDAAO*^{R285A} für die Positivkontrolle Paraquat.

Anhang

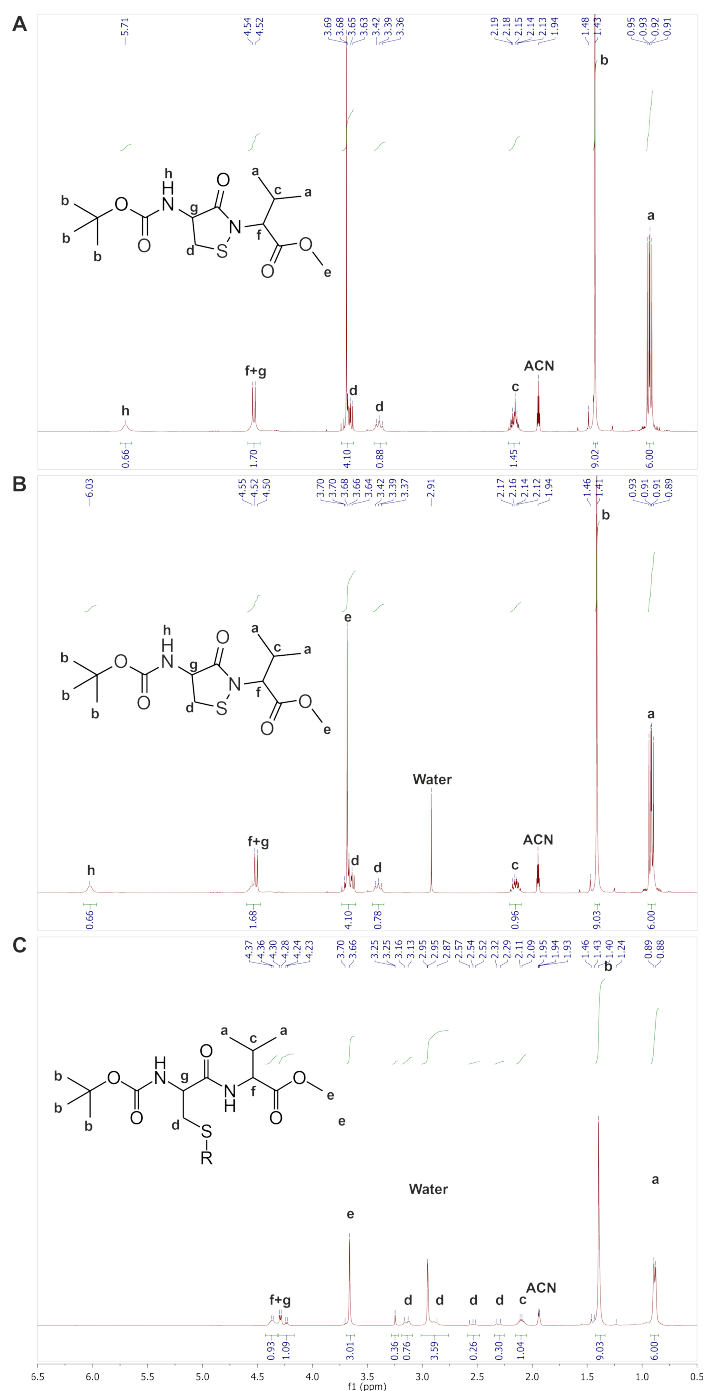


Abbildung S1: A) ¹H-NMR-Spektren von 60 mM SA in CD₃CN, B) nach Zugabe von 60 eq D₂O und C) nach weiterer Zugabe von 1 eq NaOH (R=OH/O⁻ auch andere R möglich). Spektren wurden 1,5 min mit 400 Hz bei RT aufgenommen. Abbildung wurde aus [1] übernommen.

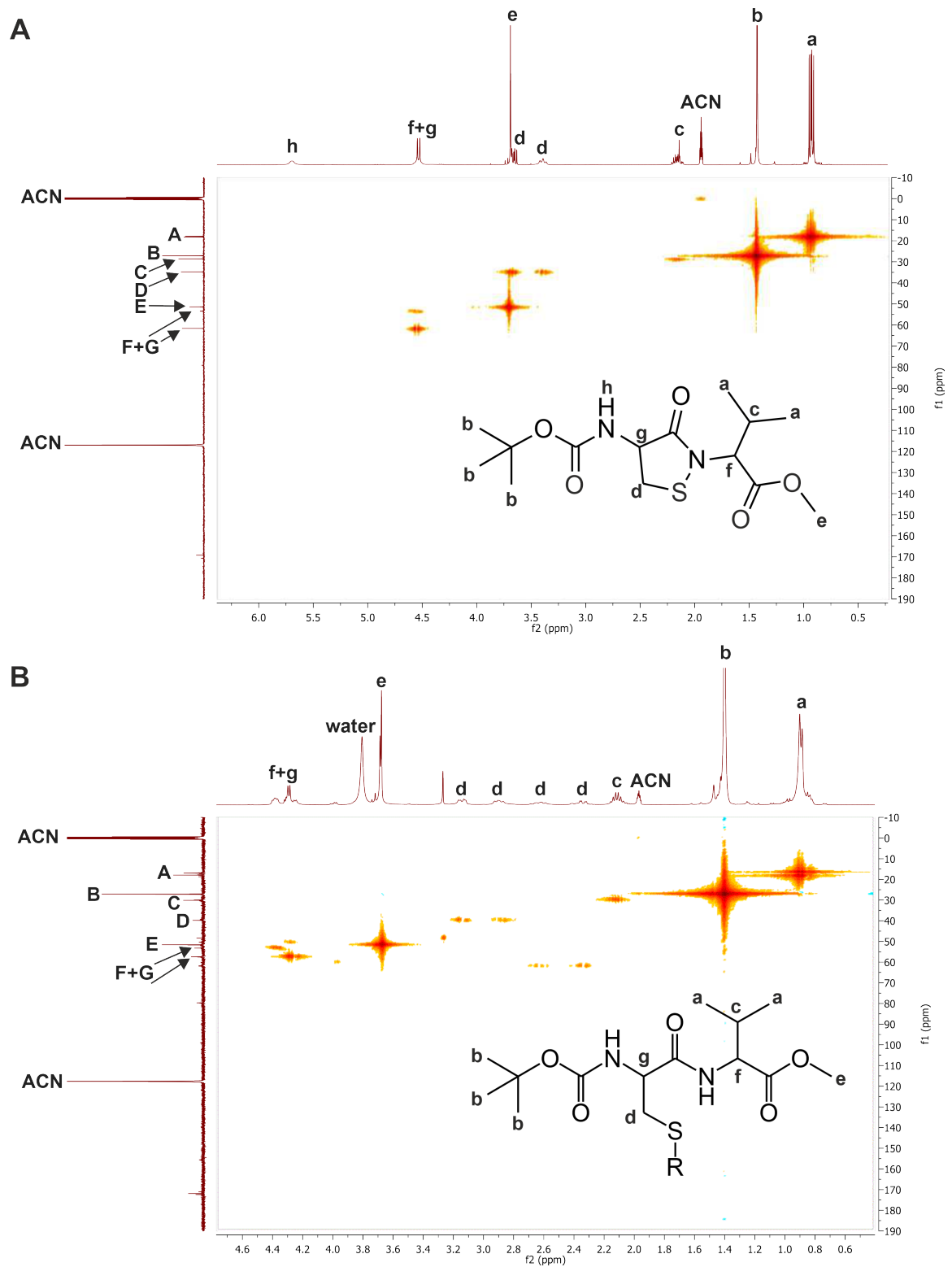


Abbildung S2: A) ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von 60 mM SA in CD_3CN B) nach Zugabe von 60 eq D_2O und 1 eq NaOH ($\text{R}=\text{OH}/\text{O}^-$, auch andere R möglich). Alle Spektren wurden über 28,5 min mit 400 Hz bei RT aufgenommen. Abbildung wurde aus [1] übernommen.

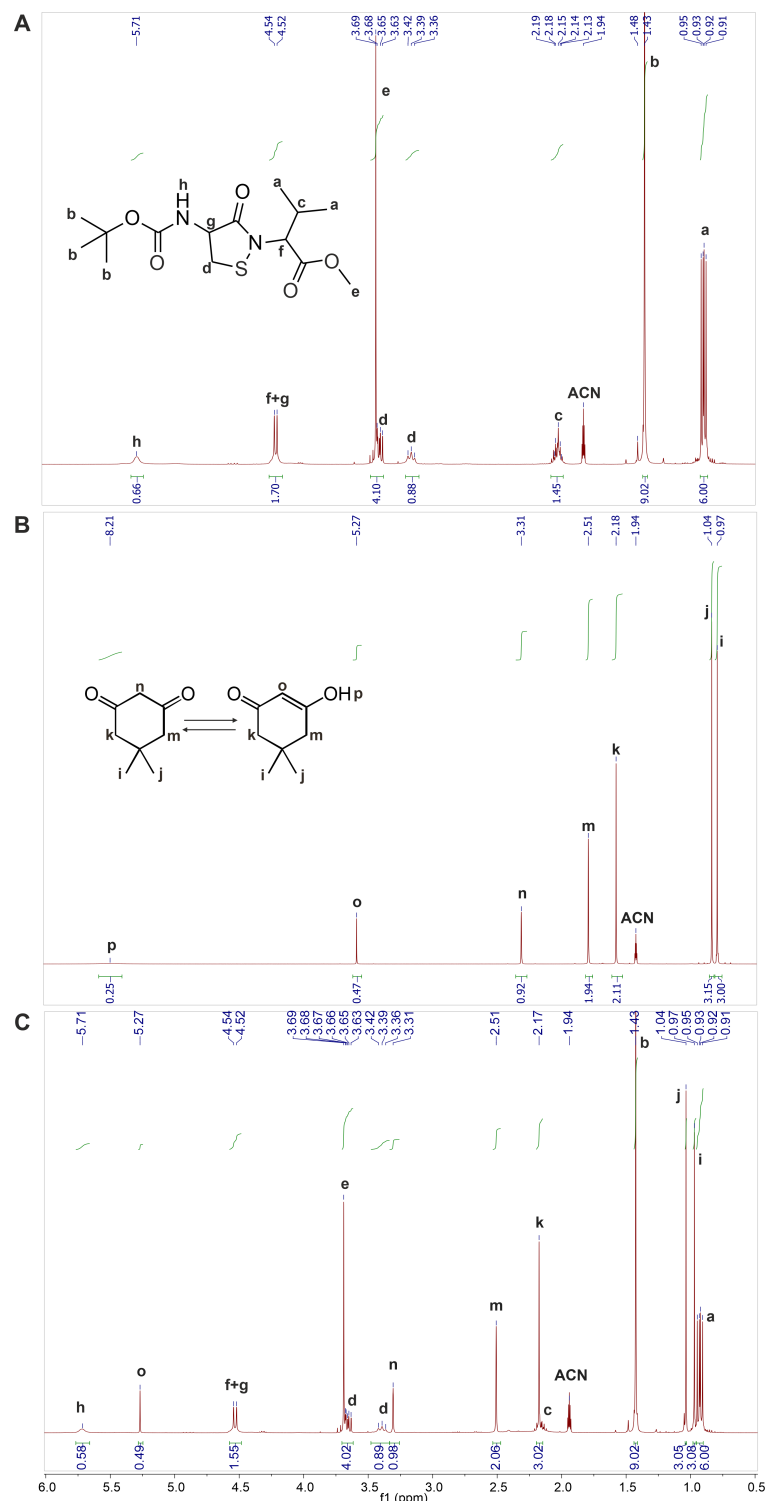


Abbildung S3: A) ^1H -NMR-Spektren von 60 mM SA, B) 60 mM Dimedon oder C) 60 mM SA und 60 mM Dim in wasserfreiem CD_3CN bei RT. SA und Dim wurden über Nacht inkubiert. Dim liegt in einer stabilen Keto- und Enolform vor, wodurch die alternativen chemischen Verschiebungen zustande kommen. Spektrum C zeigt keine zusätzlichen NMR-Signale. In wasserfreiem CD_3CN findet keine Reaktion zwischen SA und Dim statt, Spektrum C ist eine Überlagerung der Signale der Spektren A und B. Abbildung wurde aus [1] übernommen.

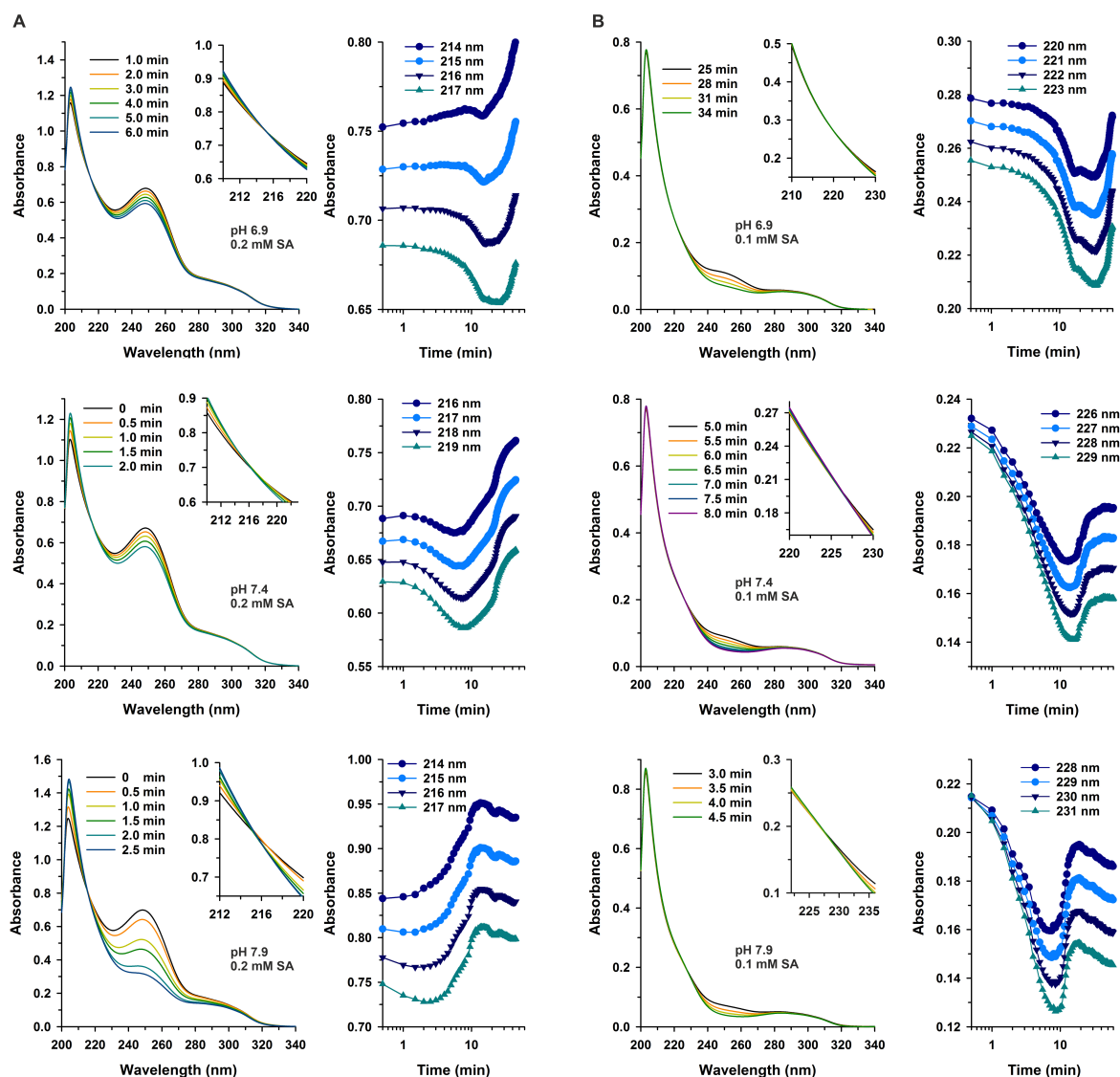


Abbildung S4: Analyse isosbestischer Punkte der pH-abhängigen Ringöffnung von SA in 33% ACN und 67% PBS bei 25 °C. A) Spektrale Veränderungen bei pH 6,9, 7,4 oder 7,9 während der ersten Reaktionsphase (links) zeigen einen potenziellen isosbestischen Punkt zwischen 214 und 216 nm (rechts). B) Spektrale Veränderungen während der zweiten Reaktionsphase (links) ergaben einen potenziellen isosbestischen Punkt zwischen 220 und 230 nm (rechts). Abbildung wurde aus [1] übernommen.

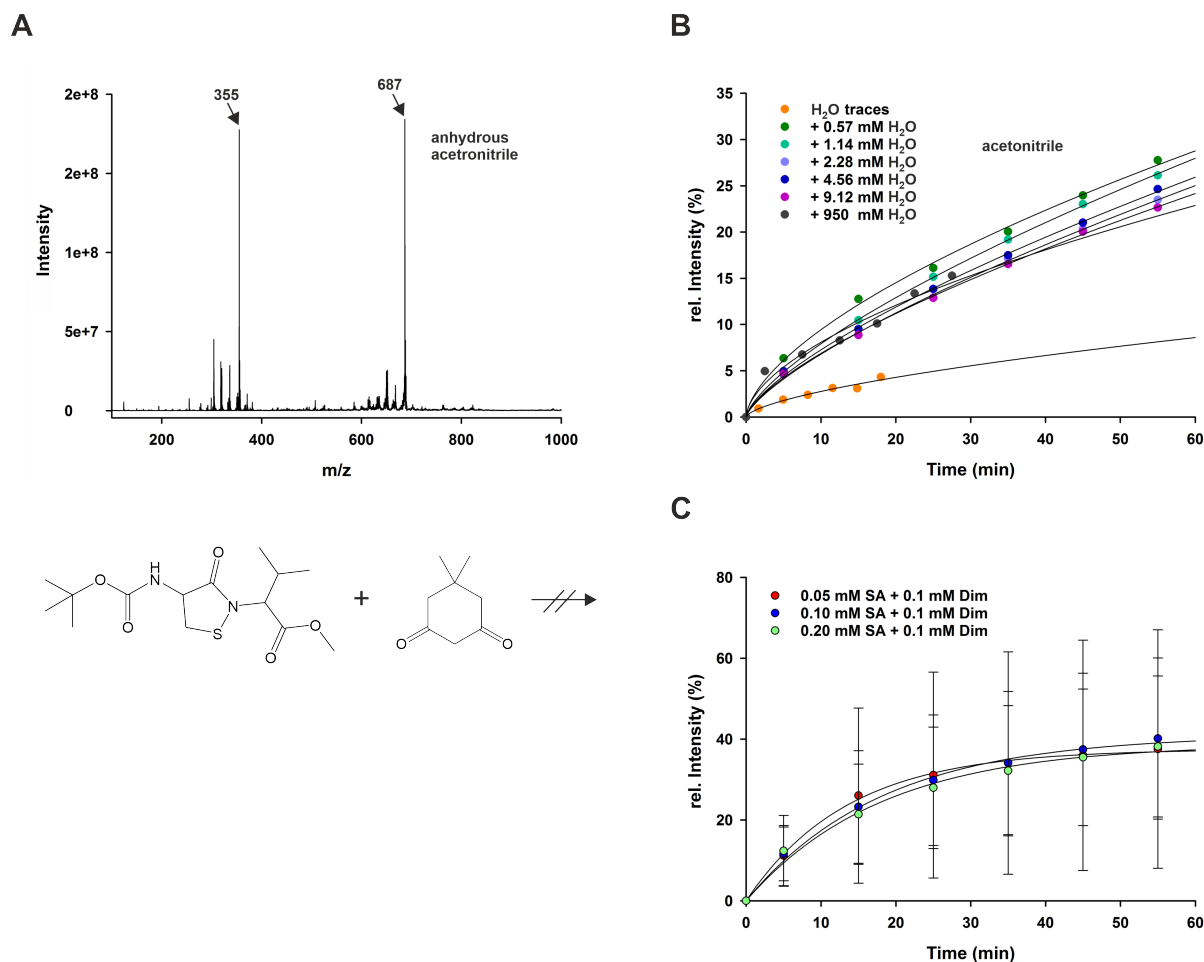


Abbildung S5: ESI-MS-Analyse der wasserabhängigen Reaktion zwischen SA und Dimedon. A) Nach Inkubation von 0,1 mM SA mit 0,1 mM Dimedon in wasserfreiem CH_3CN für 60 Minuten bei RT wurde keine Reaktion beobachtet. Die Massenspektren zeigten Natrium-koordiniertes monomeres und dimeres SA (355 bzw. 687 m/z) und kein SA-Dim-Addukt. B) Die Bildung des SA-Dim-Addukts wurde nach Inkubation in CH_3CN mit Spuren von Wasser bei $\text{pH}=5$ nachgewiesen. Eine Erhöhung der Wasserkonzentration bis zu 900 μM beschleunigte die Adduktbildung nicht. Die Bildung des Thioethers, in Form einer kovalenten Addukt-Bindung, zwischen Dimedon und SA wurde wie in Abbildung S6 nachgewiesen. C) Das Variieren der SA-Konzentration in CH_3CN mit 570 μM H_2O hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit mit 0,1 mM Dimedon (Dim). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von fünf unabhängigen Messungen. Abbildung wurde aus [1] übernommen.

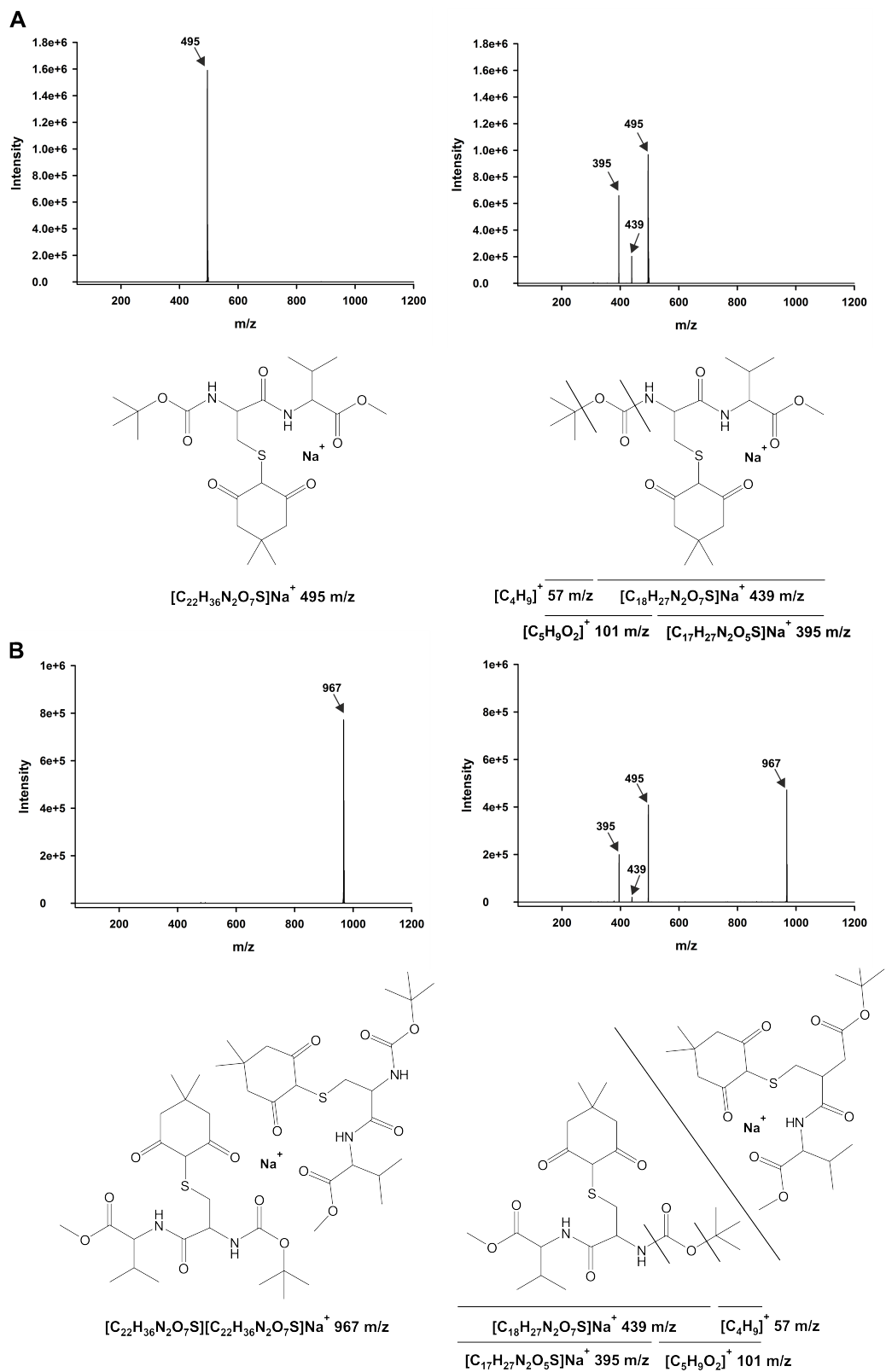


Abbildung S6: Fragmentationsanalyse der monomeren- und dimeren Thioether-Addukts von SA und Dim. Massenspektren von isoliertem (links) und fragmentiertem (rechts) monomerem (A) und dimerem (B) SA-Dim-Addukt koordiniert an Na^+ . Abbildung adaptiert aus [1].

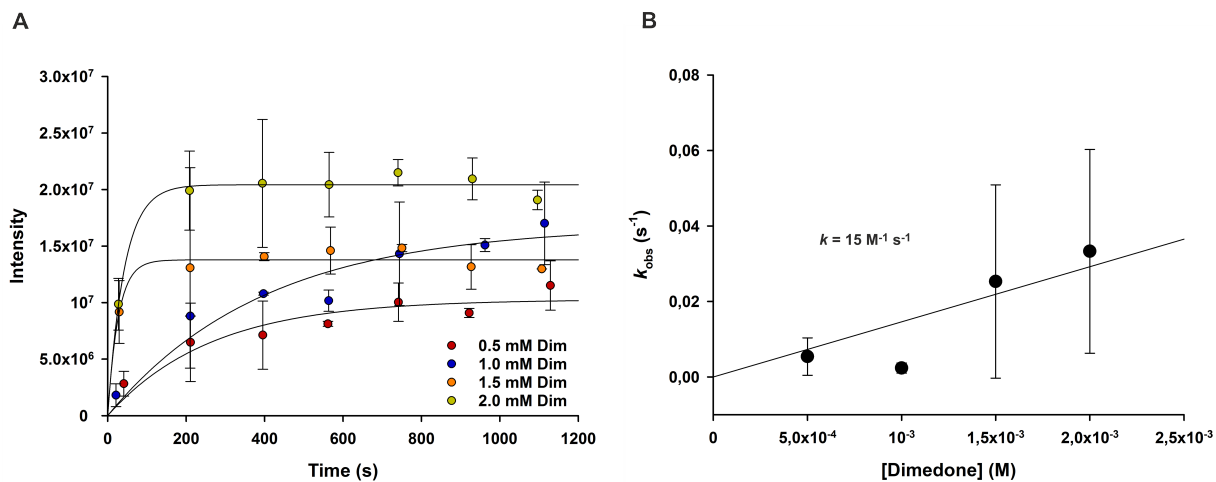


Abbildung S7: ESI-MS-Analyse der Reaktion zwischen Dimedon und der *in situ* gebildeten Sulfensäure aus 0,1 mM SA in einer Mischung aus 33 % ACN und 67 % PBS2 bei pH 7,4 und RT. A) Die Spektren wurden zu den angegebenen Zeitpunkten über 60 s Messzeit gemittelt. Aus den gemittelten Spektren wurden die Intensitäten des Produktpeaks bei 495 m/z bestimmt. B) Die k_{obs} -Werte aus Panel A wurden gegen die entsprechende Dim-Konzentration aufgetragen. Die angegebene Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung wurde aus der Steigung der linearen Regression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Messungen. Abbildung wurde aus [1] übernommen.

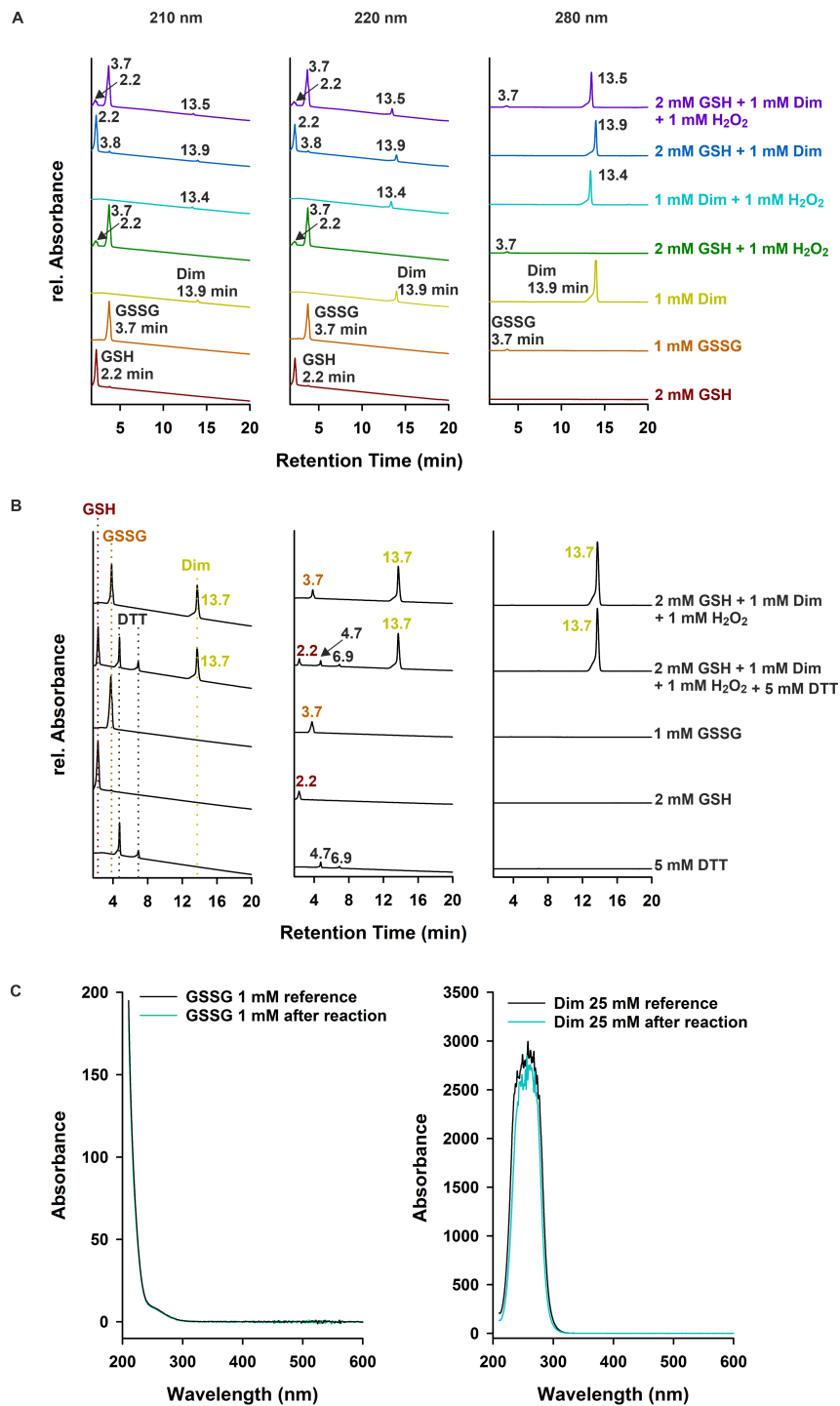


Abbildung S8: A) Chromatogramme der Einzelsubstanzen GSH, GSSG und Dim, Referenzmessungen von GSH oder Dim mit H₂O₂ und von GSH mit Dim zum Ausschluss unerwünschter Nebenreaktionen, sowie die eigentliche Konkurrenzreaktion zwischen 2 mM GSH, 1 mM H₂O₂ und 1 mM Dimedon. B) Derivatisierungsexperiment. Durch Zugabe eines 5-fachen Überschusses an DTT (5 mM) im Vergleich zur GSSG-Konzentration, wurde ein vollständiger Umsatz von GSSG zu GSH beobachtet. Abbildung wurde aus [1] übernommen.

Sequenzierungsergebnisse

Alle klonierten Konstrukte wurden korrekt sequenziert und sind im folgenden aufgelistet. Die Sequenzabschnitte sind, wie im Konstruktnamen entsprechend eingefärbt. Die Restriktionsschnittstellen sind in Magenta markiert.

Konstrukt pHBIRH-IMS¹⁻⁴⁹ 3xHA-RGDAO²⁻³⁶⁸, K367G, WT

Verwendete Primer: P19 (RgDAO/seq/s) und P20 (RgDAO/seq/as)

a) Nukleotidsequenz:

```

1 ... ATCACTAGTATGAAAAGAAGTTTTAGATCAATGTTAAGAAGTATATTTATGAGAAATATTATA
66 TTTCTTAACATCAAATATTAGTTCAATAATTATATTTTGTGTTAGTATATCATTTTTAGGATATT
131 TTGGTAAAGAATTACATAATAATAATAAAGGAAGTGGTTCAGGAAGTGGTTCAGGATCCTATCC
196 TATGATGTTCCAGATTATGCAGGTTATCCTTATGATGTACCAGATTATGCTGGTTATCCTTATGA
261 TGTTCCCTGATTATGCAGCGGCCCACATAGTCAAAAAAGAGTAGTTGTATTAGGTTCCAGGAGTTA
326 TTGGTTTATCATCAGCATTAAATTTAGCAAGAAAAGGTTATTCAGTTCATATATTAGCTAGAGAT
391 TTACCAGAAGATGTTAGTTCACAAACATTTGCAAGTCCTTGGGCAGGAGCTAATTGGACACCATT
456 TATGACATTAACAGATGGTCCAAGACAAGCTAAATGGGAAGAATCAACATTTAAAAAATGGGTTG
521 AATTAGTACCAACAGGACATGCTATGTGGTAAAAAGGTACAAGAAGATTTGCACAAAAATGAAGAT
586 GGATTATTAGGTCATTGGTATAAAGATATAACACCAAATTATAGACCATTACCAAGTTCAGAATG
651 TCCACCAGGAGCTATAGGTGTTACTTATGATACATTAAGTGTACATGCACCAAAAATATTGTCAAT
716 ATTTAGCTAGAGAATTACAAAAATTGGGAGCAACATTTGAAAGAAGAACAGTAACAAGTTTAGAA
781 CAAGCATTTGATGGTGCTGATTTAGTTGTAATGCAACAGGATTAGGTGCAAAAATCAATAGCTGG
846 AATTGATGATCAAGCAGCTGAACCAATTAGAGGTCAAACAGTTTTAGTAAAAAGTCCATGTAAAA
911 GATGTACAATGGATAGTTCAGATCCAGCATCACCAGCTTATATAATTCCAAGACCAGGTGGAGAA
976 GTTATTTGTGGAGGAACCTTATGGAGTTGGTGATTGGGATTTATCAGTTAATCCAGAAACAGTACA
1041 AAGAATATTTAAACATTGTTTAAGATTAGATCCAACAATTAGTTCAGATGGAACAATAGAAGGTA
1106 TAGAAGTTTTAAGACATAATGTAGGATTAGCACCAGCTAGAAGAGGTGGACCAAGAGTTGAAGCA
1171 GAAAGAATTGTATTACCATTAGATAGAACAAAAAGTCCATTATCATTAGGAAGAGGTAGTGCAAG

```

1236 AGCAGCTAAAGAAAAAGAAGTTACATTAGTACATGCTTATGGATTTAGTTCAGCTGGTTATCAAC
1301 AATCATGGGGTGCAGCTGAAGATGTTGCACAATTAGTAGATGAAGCATTTCAAAGATATCATGGA
1366 GCAGCAAGAGAATCAGGTTTATAAGAGCTCGCT...

b) Aminosäuresequenz:

1 TSMKRSFRSMLRSIFMRILYFLTSNISSIIIFCVSISFLGYFGKELHNNNKSGSGSGSGSY^{PSYD}
66 VPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYAAAHSQKRVVVLGSGVIGLSSALILARKGYSVHILARDLP
131 EDVSSQTFASPWAGANWTPFMTLTDGPRQAKWEESTFKKWVELVPTGHAMWLKGTTRRFAQNEGL
196 LGHWYKDITPNYRPLPSSECPPGAIGVTYDTLSVHAPKYCQYLARELQKLGATFERRTVTSLEQA
261 FDGADLVVNATGLGAKSIAGIDDQAAEPIRGQTVLVKSPCKRCTMDSSDPASPAYIIPRPGGEVI
326 CGGTYGVDWDLVSNPETVQRILKHCLRLDPTISSDGTIEGIEVLRHNVGLRPARRGGPRVEAER
391 IVLPLDRTKSPLSLGRGSARAAKEKEVTLVHAYGFSSAGYQQSWGAAEDVAQLVDEAFQRYHGAA
456 RESGL-EI

Konstrukt pHBIRH-IMS¹⁻⁴⁹ 3xHA-RGDAO²⁻³⁶⁸, K367G, R285A

Verwendete Primer: P11 (*RgDAAO*^{R285A}/s), P12 (*RgDAAO*^{R285A}/as),
P19 (*RgDAAO*/seq/s), P20 (*RgDAAO*/seq/as)

a) Nukleotidsequenz:

1 ...ATC^{ACTAGT}ATGAAAAGAAGTTTTAGATCAATGTTAAGAAGTATATTTATGAGAATATTATA
66 TTTCTTAACATCAAATATTAGTTCAATAATTATATTTTGTGTTAGTATATCATTTTTAGGATATT
131 TTGGTAAAGAATTACATAATAATAATAAAGGAAGTGGTTCAGGAAGTGGTTCAGGATCC^{TATCC}
196 TATGATGTTCCAGATTATGCAGGTTATCC^{TATGATGTACCAGATTATGCTGGTTATCC}TATGA
261 TGTTCCTGATTATGCAGCGGCCGCACATAGTCAAAAAAGAGTAGTTGTATTAGGTTCCAGGATTA
326 TTGGTTTATCATCAGCATAATTTTAGCAAGAAAAGGTTATTCAGTTCATATATTAGCTAGAGAT
391 TTACCAGAAGATGTTAGTTCACAAACATTTGCAAGTCCTTGGGCAGGAGCTAATTGGACACCATI
456 TATGACATTAACAGATGGTCCAAGACAAGCTAAAATGGGAAGAATCAACATTTAAAAAATGGGTTG
521 AATTAGTACCAACAGGACATGCTATGTGGTTAAAAGGTACAAGAAGATTTGCACAAAAATGAAGAT
586 GGATTATTAGGTCATTGGTATAAAGATATAACACCAAATTATAGACCATTACCAAGTTCAGAAATG
651 TCCACCAGGAGCTATAGGTGTTACTTATGATACATTAAGTGTACATGCACCAAAAATATTGTCAAT

716 **ATTTAGCTAGAGAATTACAAAAATTGGGAGCAACATTTGAAAGAAGAACAGTAACAAGTTTAGAA**
781 **CAAGCATTGATGGTGCTGATTTAGTTGTAATGCAACAGGATTAGGTGCAAAATCAATAGCTGG**
846 **AATTGATGATCAAGCAGCTGAACCAATTAGAGGTCAAACAGTTTTAGTAAAAAGTCCATGTAAAA**
911 **GATGTACAATGGATAGTTCAGATCCAGCATCACCAGCTTATATAATTCCAAGACCAGGTGGAGAA**
976 **GTTATTTGTGGAGGAACCTTATGGAGTTGGTGATTGGGATTTATCAGTTAATCCAGAAACAGTACA**
1041 **AAGAATATTTAAACATTGTTTAAGATTAGATCCAACAATTAGTTCAGATGGAACAATAGAAGGTA**
1106 **TAGAAGTTTAAAGACATAATGTAGGATTA**GC**ACCAGCTAGAAGAGGTGGACCAAGAGTTGAAGCA**
1171 **GAAAGAATTGTATTACCATTAGATAGAACAAAAAGTCCATTATCATTAGGAAGAGGTAGTGCAAG**
1236 **AGCAGCTAAAGAAAAAGAAGTTACATTAGTACATGCTTATGGATTTAGTTCAGCTGGTTATCAAC**
1301 **AATCATGGGGTGCAGCTGAAGATGTTGCACAATTAGTAGATGAAGCATTTCAAAGATATCATGGA**
1366 **GCAGCAAGAGAATCAGGTTTATAA**GAGCTC**GCT...**

b) Aminosäuresequenz:

1 **TS**MKRSFRSMLRSIFMRILYFLTSNISSI**IIFCVSISFLGYFGKELHNNNKGS**SGSGS**GS**YPYD
66 **VPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYA**AAA**HSQKR**VVVLGSGVIGLSSALILARKGYSVHILARDLP
131 **EDVSSQTFASPWAGANWTPFMTLTDGPRQAKWEESTFKKWELVPTGHAMWLKGTTRRFAQ**NEDGL
196 **LGHWYKDITPNYRPLPSSECPPGAIGVTYD**TL SVHAPKYCQYLARELQKLGATFERRTVTSLEQA
261 **FDGADLVVNATGLGAKSIAGIDDQAAEPIRGQTVLVKSPCKR**CTMDSSDPASPAYIIPRPGGEVI
326 **CGGTYGVGDWDLVSNPETVQRILKHC**LRDPTISSDGTIEGIEVLRHNVGL**A**PARRGGPRVEAER
391 **IVLPLDR**TKSPLSLGRGSARAAKEKEVTLVHAYGFSSAGYQQSWGAAEDVAQLVDEAFQRYHGAA
456 **RESGL**-**EL**

Konstrukt pHBIRH-IMS¹⁻⁴⁹ roGFP2-RGDAAO²⁻³⁶⁸, K367G, WT

Verwendete Primer: P19 (*RgDAAO*/seq/s), P20 (*RgDAAO*/seq/as),

P30 (roGFP2/seq/as), P31 (roGFP2/seq2/as)

a) Nukleotidsequenz

1 ...ATC**ACTAGT**ATGAAAAGAAGTTTTAGATCAATGTTAAGAAGTATATTTATGAGAATATTATA
66 **TTTCTTAACATCAAATATTAGTTCAATAATTATATTTTGTGTTAGTATATCATT**TTTAGGATATT
131 **TTGGTAAAGAATTACATAATAATAATAAAGGAAGTGGTTCAGGAAGTGGTTCAGGATCCGCAAGC**

196 GAATTCTCAAAGGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCCTATTTTAGTCGAATTGGACGGTGA
261 CGTTAATGGTCATAAGTTTAGTGTTAGTGGTGAAGGTGAAGGTGACGCAACATACGGTAAATGTA
326 CCTTGAAGTTTATTTCAACTACTGGTAAATTGCCAGTTCCTTGGCCAACCTTTGGTAACCACTTTA
391 ACATATGGTGTACAATGTTTCAGTAGATACCCTGATCATATGAAACAACACGACTTTTTCAAGTC
456 TGCTATGCCAGAAGGTTACGTTCAAGAAAGAACTATTTTCTTTAAGGATGACGGTAACTACAAGA
521 CCAGAGCAGAAGTCAAATTTGAAGGTGACACTTTGGTTAACAGAATCGAATTGAAGGGTATCGAT
586 TTCAAGGAAGACGGTAACATCTTGGGTCATAAATTGGAATACAACACTACAACACTGTCACAATGTATA
651 CATAATGGCCGATAAGCAAAAAGAAATGGTATCAAAGTCAACTTCAAGATCAGACATAACATCGAAG
716 ATGGTTCGTGTTCAATTAGCTGACCACTATCAACAAAATACACCTATTGGTGACGGTCTGTGTTTG
781 TTACCAGACAACCATTACTTGTCTACCTGCTCAGCTTTATCCAAAGATCCAAATGAAAAGAGAGA
846 CCATATGGTATTGTTAGAATTTGTCACCGCAGCAGGTATCACATTGGGTATGGATGAATTGTATA
911 AAAGTAGCGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGAGGAGGATCAGGA
976 GGAGGAGGATCAGGAGGAGGAGGATCAGGAGGAGAAATTCGGGCCGCACATAGTCAAAAAAGAGT
1041 AGTTGTATTAGGTTCCAGGAGTTATTGGTTTATCATCAGCATTAAATTTAGCAAGAAAAGGTTATT
1106 CAGTTCATATATTAGCTAGAGATTTACCAGAAGATGTTAGTTCACAAACATTTGCAAGTCCCTGG
1171 GCAGGAGCTAATTGGACACCATTTATGACATTAACAGATGGTCCAAGACAAGCTAAATGGGAAGA
1236 ATCAACATTTAAAAAATGGGTTGAATTAGTACCAACAGGACATGCTATGTGGTTAAAAGGTACAA
1301 GAAGATTTGCACAAAATGAAGATGGATTATTAGGTCATTGGTATAAAGATATAACACCAAAATTAT
1366 AGACCATTACCAAGTTCAGAATGTCCACCAGGAGCTATAGGTGTTACTTATGATACATTAAGTGT
1431 ACATGCACCAAAAATATTGTCAATATTTAGCTAGAGAATTACAAAAATTGGGAGCAACATTTGAAA
1496 GAAGAACAGTAACAAGTTTAGAACAAGCATTGATGGTGCTGATTTAGTTGTAAATGCAACAGGA
1561 TTAGGTGCAAAAATCAATAGCTGGAATTGATGATCAAGCAGCTGAACCAATTAGAGGTCAAACAGT
1626 TTTAGTAAAAAGTCCATGTAAAAGATGTACAATGGATAGTTCAGATCCAGCATCACCAGCTTATA
1691 TAATTCCAAGACCAGGTGGAGAAGTTATTTGTGGAGGAACCTTATGGAGTTGGTGATTGGGATTTA
1756 TCAGTTAATCCAGAAACAGTACAAAAGAATATTA AACATTGTTTAAGATTAGATCCAACAATTAG
1821 TTCAGATGGAACAATAGAAGGTATAGAAGTTTAAAGACATAATGTAGGATTAAGACCAGCTAGAA
1886 GAGGTGGACCAAGAGTTGAAGCAGAAAAGAAATTGATTACCATTAGATAGAACAAAAAGTCCATTA
1951 TCATTAGGAAGAGGTAGTGCAAGAGCAGCTAAAGAAAAAGAAGTTACATTAGTACATGCTTATGG

2016 **ATTAGTTCAGCTGGTTATCAACAATCATGGGGTGCAGCTGAAGATGTTGCACAATTAGTAGATG**
2081 **AAGCATTTCAAAGATATCATGGAGCAGCAAGAGAATCAGGTTTATAAGAGCTC**GCT...

b) Aminosäuresequenz:

1 **TS**MKRSFRSMLRSIFMRILYFLTSNISSIIIFCVSISFLGYFGKELHNNNKSGSGSGSG**GS**ASEF
66 **SKGEEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKLTLLKFISTTGKLPVPWPTLVTTLY**
131 **GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGUIDFK**
196 **EDGNILGHKLEYNYNCHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLP**
261 **DNHYLSTCSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYKTSGGSGGGSGGGSGGGSGGG**
326 **SGSGGGSGGGEFAAA**HSQKRVVVLGSGVIGLSSALILARKGYSVHILARDLPEDVSSQTFASPWAG
391 **ANWTPFMTLTDGPRQAKWEESTFKKWVELVPTGHAMWLKGTTRFAQNEGGLLGHWYKDIIPNYRP**
456 **LPSSECPPGAIGVTYDTLVHAPKYCQYLARELQKLGATFERRTVTSLEQAFDGADLVVNATGLG**
521 **AKSIAGIDDQAAEPIRGQTVLVKSPCKRCTMDSSDPASPAYIIPRPGGEVICGGTYGVGDWDLV**
586 **NPETVQRILKHCLRLDPTISSDGTIEGIEVLRHNVGLRPARGGPRVEAERIVLPLDRTKSPLSL**
651 **GRGSARAAKEKEVTLVHAYGFSSAGYQQSWGAAEDVAQLVDEAFQRYHGAARESGL** - **EL**

Konstrukt pHBIRH-IMS¹⁻⁴⁹ roGFP2- RGDAO²⁻³⁶⁸, K367G, R285A

Verwendete Primer: P19 (*RgDAAO*/seq/s), P20 (*RgDAAO*/seq/as),
P30 (roGFP2/seq/as), P31 (roGFP2/seq2/as)

a) Nukleotidsequenz:

1 ...ATC**ACTAGT**ATGAAAAGAAGTTTTAGATCAATGTTAAGAAGTATATTTATGAGAATATTATA
66 **TTTCTTAACATCAAATATTAGTTCAATAATTATATTTTGTGTTAGTATATCATTTTTAGGATATT**
131 **TTGGTAAAGAATTACATAATAATAATAAAGGAAGTGGTTCAGGAAGTGGTTCAGGATCGCAAGC**
196 **GAATTCTCAAAGGGTGAAGAATTGTTACAGGTGTTGTTCCATTTTATGTCGAATTGGACGGTGA**
261 **CGTTAATGGTCATAAGTTTAGTGTAGTGGTGAAGGTGAAGGTGACGCAACATACGGTAAATTGA**
326 **CCTTGAAGTTTATTTCAACTACTGGTAAATTGCCAGTTCCTTGGCCAACTTTGGTAACCACTTTA**
391 **ACATATGGTGTACAATGTTTCAGTAGATACCCTGATCATATGAAACAACACGACTTTTTCAGTC**
456 **TGCTATGCCAGAAGTTACGTTCAAGAAAGAACTATTTTCTTTAAGGATGACGGTAACTACAAGA**
521 **CCAGAGCAGAAGTCAAATTTGAAGGTGACACTTTGGTTAACAGAATCGAATTGAAGGGTATCGAT**

586 **TTCAAGGAAGACGGTAACATCTTGGGTCATAAAATTGGAATACAACACTACAACGTGCACAATGTATA**
651 **CATAATGGCCGATAAGCAAAGAATGGTATCAAAGTCAACTTCAAGATCAGACATAACATCGAAG**
716 **ATGGTTCGTGTTCAATTAGCTGACCACTATCAACAAAATACACCTATTGGTGACGGTCCTGTTTTG**
781 **TTACCAGACAACCATTACTTGTCTACCTGCTCAGCTTTATCCAAAGATCCAAATGAAAAGAGAGA**
846 **CCATATGGTATTGTTAGAATTTGTCACCGCAGCAGGTATCACATTGGGTATGGATGAATTGTATA**
911 **AAACTAGCGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGAGGAGGATCAGGA**
976 **GGAGGAGGATCAGGAGGAGGAGGATCAGGAGGAGAATTCGCGGCCGCACATAGTCAAAAAAGAGT**
1041 **AGTTGTATTAGGTTCCAGGAGTTATTGGTTTTATCATCAGCATTAAATTTTAGCAAGAAAAGGTTATT**
1106 **CAGTTCATATATTAGCTAGAGATTTACCAGAAGATGTTAGTTCACAAACATTTGCAAGTCCTTGG**
1171 **GCAGGAGCTAATTGGACACCATTTATGACATTAACAGATGGTCCAAGACAAGCTAAATGGGAAGA**
1236 **ATCAACATTTAAAAAATGGGTTGAATTAGTACCAACAGGACATGCTATGTGGTTAAAAGGTACAA**
1301 **GAAGATTTGCACAAAATGAAGATGGATTATTAGGTCATTGGTATAAAGATATAACACCAAATTAT**
1366 **AGACCATTACCAAGTTCAGAATGTCCACCAGGAGCTATAGGTGTTACTTATGATACATTAAGTGT**
1431 **ACATGCACCAAAAATATTGTCAATATTTAGCTAGAGAATTACAAAAATTGGGAGCAACATTTGAAA**
1496 **GAAGAACAGTAACAAGTTTAGAACAAGCATTGATGGTGCTGATTTAGTTGTAAATGCAACAGGA**
1561 **TTAGGTGCAAAATCAATAGCTGGAATTGATGATCAAGCAGCTGAACCAATTAGAGGTCAAACAGT**
1626 **TTTAGTAAAAAGTCCATGTAAAAGATGTACAATGGATAGTTCAGATCCAGCATCACCAGCTTATA**
1691 **TAATCCAAGACCAGGTGGAGAAGTTATTTGTGGAGGAACCTTATGGAGTTGGTGATTGGGATTTA**
1756 **TCAGTTAATCCAGAAACAGTACAAAGAATATTTAAAACATTGTTTAAGATTAGATCCAACAATTAG**
1821 **TTCAGATGGAACAATAGAAGGTATAGAAGTTTAAAGACATAATGTAGGATTA**GC**ACCAGCTAGAA**
1886 **GAGGTGGACCAAGAGTTGAAGCAGAAAAGAAATTGTATTACCATTAGATAGAACAAAAAGTCCATTA**
1951 **TCATTAGGAAGAGGTAGTGCAAGAGCAGCTAAAGAAAAAGAAGTTACATTAGTACATGCTTATGG**
2016 **ATTTAGTTCAGCTGGTTATCAACAATCATGGGGTGCAGCTGAAGATGTTGCACAATTAGTAGATG**
2081 **AAGCATTTCAAAGATATCATGGAGCAGCAAGAGAATCAGGTTTATAAG**AGCTC**GCT...**

b) Aminosäuresequenz:

1 **ISMKRSFRSMLRSIFMRILYFLTSNISSIIIFCVSISFLGYFGKELHNNNKSGSGSGSGS**CS**ASEF**
66 **SKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFISTTGKLPVPWPPTLVTTLY**
131 **GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGIIDFK**

196 EDGNILGHKLEYNYNCHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLP
261 DNHYLSTCSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKTSGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
326 GSGGGGSGGEFAAAHSQKRVVVLGSGVIGLSSALILARKGYSVHILARDLPEDVSSQTFASPWAG
391 ANWTPFMTLTDGPRQAKWEESTFKKWVELVPTGHAMWLKGTRRFAQNEDGLLGHWYKDIPTNYRP
456 LPSSECPPGAIGVTYDTLSVHAPKYCQYLARELQKLGATFERRTVTSLEQAFDGADLVVNATGLG
521 AKSIAGIDDQAAEPIRGQTVLVKSPCKRCTMDSSDPASPAYIIPRPGGEVICGGTYGVGDWDLV
586 NPETVQRILKHCLRLDPTISSDGTIEGIEVLRHNVGLAPARRGGPRVEAERIVLPLDRTKSPLSI
651 GRGSARAAKEKEVTLVHAYGFSSAGYQQSWGAAEDVAQLVDEAFQRYHGAARESGL - EI

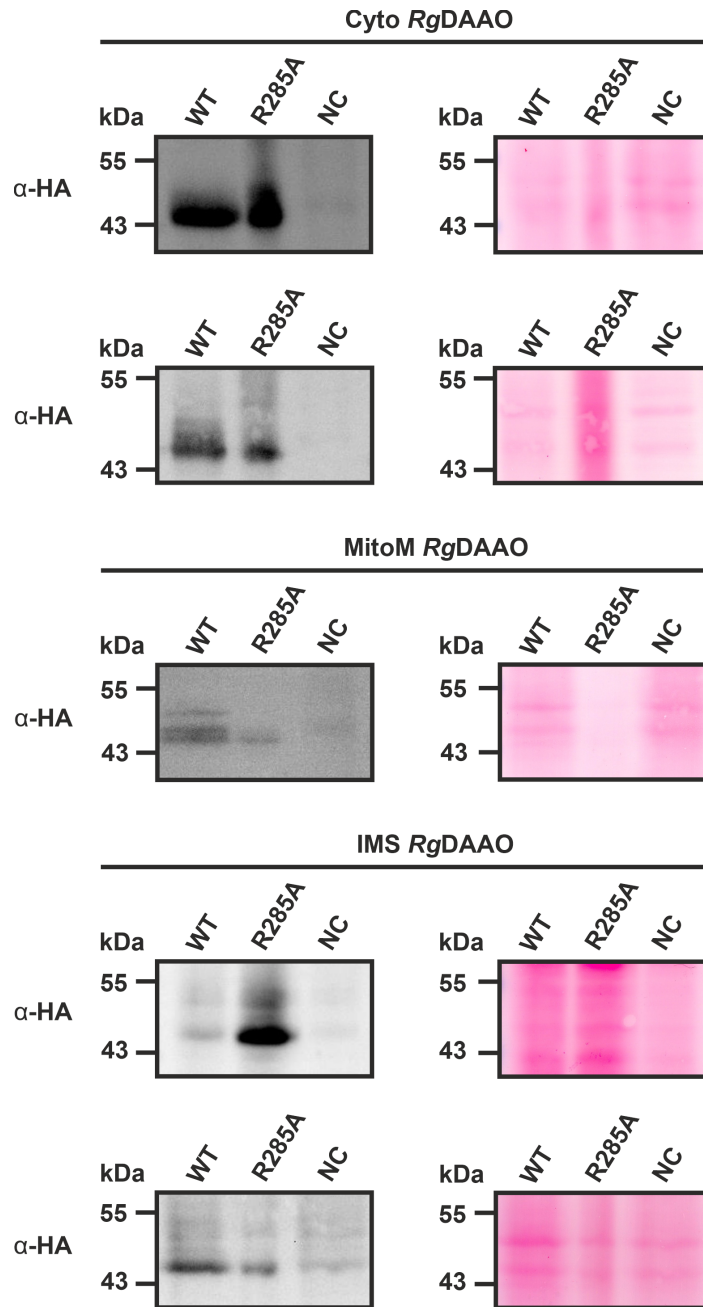


Abbildung S9: Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto, MitoM und IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A}. Die Westernblot-Proben wurden mittels Magnetsäulenisolierung aus 40 ml Kultur bei einem Selektionsdruck von 4 µg/ml Blasticidin und einer Parasitämie > 5 % gewonnen. Von jeder Lysatprobe wurden 3 x 10⁷ Parasiten in einem 10 %igen SDS-Gel geladen und mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und zunächst mit Ponceau-Reagenz gefärbt (rechts) bzw. anschließend mit einem α-HA Primärantikörper (Hase), sowie einem α-Hase Sekundärantikörper behandelt (links). Von links nach rechts sind die Stämme 3D7 *RgDAAO*^{WT}, 3D7 *RgDAAO*^{R285A} und die Negativkontrolle (pHBIRH, NC) aufgetragen. Für die Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} wurde eine Bande bei 43,8 kDa erwartet, 3D7 MitoM *RgDAAO*^{WT} bzw. 3D7 *RgDAAO*^{R285A} zeigten drei Banden bei 43,8 kDa, ≈46,0 kDa und 51,0 kDa und die Stämme mit IMS *RgDAAO*^{WT} bzw. *RgDAAO*^{R285A} zwei Banden bei 43,8 kDa und 52,6 kDa (berechnete Größe: 50,4 kDa).

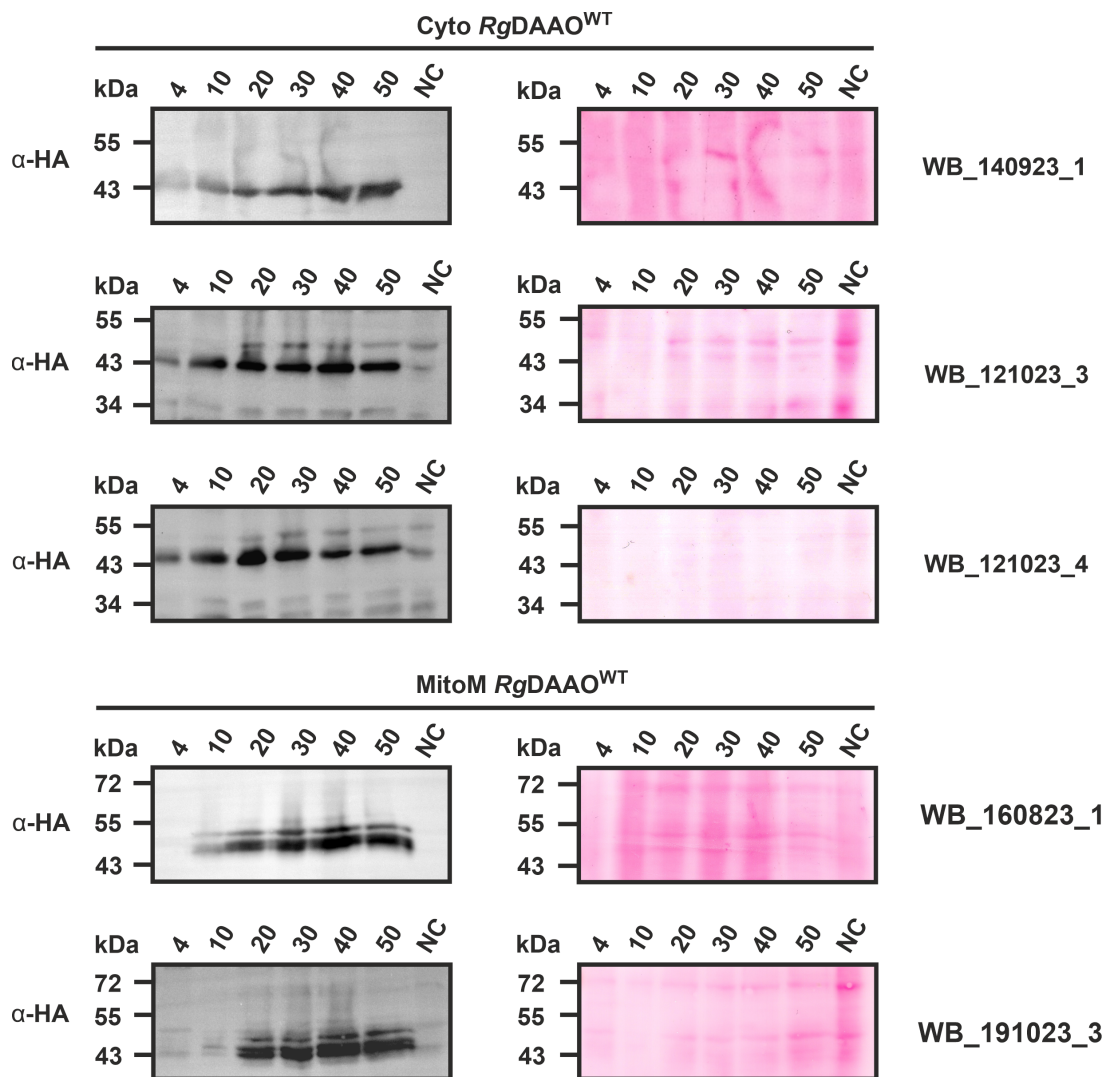


Abbildung S10: Quantitative Westernblot-Analyse der Stämme mit Cyto *RgDAAO*^{WT} und MitoM *RgDAAO*^{WT} in Abhängigkeit der Blasticidinkonzentration. A) Die Westernblot-Proben wurden mittels Magnetsäulenisolierung aus 40 ml Kultur bei einer Parasitämie > 5 % gewonnen. Von jeder Lysatprobe wurden 3×10^7 Parasiten in einem 10 %igen SDS-Gel geladen und mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Die der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und zunächst mit Ponceau-Reagenz gefärbt (rechts) bzw. anschließend mit einem α -HA Primärantikörper vom Hasen, sowie einem α -Hase Sekundärantikörper behandelt (links). Die Blasticidinkonzentration wurde zwischen 4-50 μ g/ml variiert, als Negativkontrolle (NC) wurde der ursprüngliche pHBRH-Vektor ganz rechts aufgetragen. Die erwartete Größe des Enzyms im Stamm mit *CytoRgDAAO*^{WT} beträgt 43,8 kDa. Für den Stamm mit MitoM *RgDAAO*^{WT} liegt die Größe des Enzyms inklusive MitoM Zielsequenz bei 51,0 kDa. Die anderen Banden zeigen das Protein nach mitochondrialem Import nach teilweiser- (\approx 46,0 kDa) bzw. kompletter Abspaltung (43,8 kDa) der MitoM Zielsequenz.

Wissenschaftlicher Werdegang

10 / 2020 – 07 / 2024

Promotion

Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau (RPTU)

AG Deponte Biochemie

Thema der Doktorarbeit: „Kritische Analyse der Eignung von Dimedon zur Sulfensäure-detektion und der Relevanz von Wasserstoffperoxid für die Wirkung von Antimalaria-Medikamenten“

10 / 2017 – 08 / 2020

Master of Science Chemie

Technische Universität Kaiserslautern (TUK)

04 / 2013 – 12 / 2017

Bachelor of Science Chemie

Technische Universität Kaiserslautern (TUK)

Literaturverzeichnis

- [1] Bischoff, E., Lang, L., Zimmermann, J., Luczak, M., Kiefer, A.M., Niedner-Schatteburg, G., Manolikakes, G., Morgan, B., & Deponte, M. Glutathione kinetically outcompetes reactions between dimedone and a cyclic sulfenamide or physiological sulfenic acids. *Free radical biology & medicine*, 208:165–177, 2023. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.005.
- [2] Ligeza, A., Tikhonov, A.N., Hyde, J.S., & Subczynski, W.K. Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study. *Biochimica et biophysica acta*, 1365(3):453–463, 1998. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/s0005-2728(98)00098-x.
- [3] Imlay, J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 11(7):443–454, 2013. doi: 10.1038/nrmicro3032.
- [4] Rigoulet, M., Yoboue, E.D., & Devin, A. Mitochondrial ros generation and its regulation: mechanisms involved in h(2)o(2) signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 14(3):459–468, 2011. doi: 10.1089/ars.2010.3363.
- [5] Roos, G. & Messens, J. Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free radical biology & medicine*, 51(2):314–326, 2011. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031.
- [6] Schrader, M. & Fahimi, H.D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(12):1755–1766, 2006. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.006.
- [7] Mortezaee, K. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nadph) oxidase (nox) and liver fibrosis: A review. *Cell biochemistry and function*, 36(6):292–302, 2018. doi: 10.1002/cbf.3351.
- [8] Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of toxicology*, 97(10):2499–2574, 2023. doi: 10.1007/s00204-023-03562-9.
- [9] Forman, H.J., Maiorino, M., & Ursini, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 49(5):835–842, 2010. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi9020378.
- [10] Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., & Ursini, F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3):763–780, 2011. doi: 10.1089/ars.2010.3397.
- [11] Sies, H. & Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 311(1152):617–631, 1985. doi: 10.1098/rstb.1985.0168.
- [12] Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12):1058–1071, 1986. ISSN 0570-0833. doi: 10.1002/anie.198610581.
- [13] Deponte, M. Glutathione and glutathione-dependent enzymes. In *Redox Chemistry and Biology of Thiols*, pages 241–275. Elsevier, 2022. ISBN 9780323902199. doi: 10.1016/B978-0-323-90219-9.00017-0.
- [14] Kachur, A.V., Koch, C.J., & Biaglow, J.E. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free radical research*, 28(3):259–269, 1998. ISSN 1071-5762. doi: 10.3109/10715769809069278.

- [15] Andrés, C.M.C., La Pérez de Lastra, J.M., Juan, C.A., Plou, F.J., & Pérez-Lebeña, E. Chemistry of hydrogen peroxide formation and elimination in mammalian cells, and its role in various pathologies. *Stresses*, 2(3):256–274, 2022. doi: 10.3390/stresses2030019.
- [16] Valko, M., Morris, H., & Cronin, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10): 1161–1208, 2005. ISSN 0929-8673. doi: 10.2174/0929867053764635.
- [17] Barton, D.H.R. & Nakanishi, K., editors. *Comprehensive natural products chemistry*. Elsevier, Saint Louis, England, 1999. ISBN 978-0-08-091283-7.
- [18] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1):44–84, 2007. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- [19] Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Alvarez, B., & Radi, R. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chemical reviews*, 118(3):1338–1408, 2018. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00568.
- [20] Deponte, M. & Lillig, C.H. Enzymatic control of cysteinyl thiol switches in proteins. *Biological chemistry*, 396(5): 401–413, 2015. doi: 10.1515/hsz-2014-0280.
- [21] Winterbourn, C.C. & Metodiewa, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free radical biology & medicine*, 27(3-4):322–328, 1999. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00051-9.
- [22] Alcock, L.J., Perkins, M.V., & Chalker, J.M. Chemical methods for mapping cysteine oxidation. *Chemical Society reviews*, 47(1):231–268, 2018. doi: 10.1039/C7CS00607A.
- [23] Paulsen, C.E. & Carroll, K.S. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical reviews*, 113(7):4633–4679, 2013. doi: 10.1021/cr300163e.
- [24] Deribe, Y.L., Pawson, T., & Dikic, I. Post-translational modifications in signal integration. *Nature structural & molecular biology*, 17(6):666–672, 2010. doi: 10.1038/nsmb.1842.
- [25] Salsbury, F.R., Knutson, S.T., Poole, L.B., & Fetrow, J.S. Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 17(2):299–312, 2008. ISSN 0961-8368. doi: 10.1110/ps.073096508.
- [26] Allison, W.S. Formation and reactions of sulfenic acids in proteins. *Accounts of Chemical Research*, 9(8):293–299, 1976. ISSN 0001-4842. doi: 10.1021/ar50104a003.
- [27] Poole, L.B. & Nelson, K.J. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Current opinion in chemical biology*, 12(1):18–24, 2008. ISSN 1367-5931. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.01.021.
- [28] Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G.E. Free radicals in biological materials. *Nature*, 174(4432):689–691, 1954. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/174689a0.
- [29] Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., & Fenn, W.O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science (New York, N.Y.)*, 119(3097):623–626, 1954. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.119.3097.623.

- [30] Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*, 11(3):298–300, 1956. ISSN 0022-1422. doi: 10.1093/geronj/11.3.298.
- [31] Lushchak, V.I. & Storey, K.B. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI journal*, 20:956–967, 2021. ISSN 1611-2156. doi: 10.17179/excli2021-3596.
- [32] Sies, H. & Jones, D. Oxidative stress. In Fink, G., editor, *Encyclopedia of stress*, pages 45–48. Elsevier, Amsterdam, 2007. ISBN 9780123739476. doi: 10.1016/B978-012373947-6.00285-3.
- [33] Sies, H., Berndt, C., & Jones, D.P. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86:715–748, 2017. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
- [34] Selye, H. Stress without distress. In Serban, G., editor, *Psychopathology of Human Adaptation*, pages 137–146. Springer US, Boston, MA and s.l., 1976. ISBN 978-1-4684-2240-5. doi: 10.1007/978-1-4684-2238-2_backslash\$textunderscore.
- [35] Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology*, 11:613–619, 2017. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
- [36] Sagristá, M.L., García, A.E., Africa De Madariaga, M., & Mora, M. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds n-acetyl-l-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free radical research*, 36(3):329–340, 2002. ISSN 1071-5762. doi: 10.1080/10715760290019354.
- [37] Speisky, H., Gómez, M., Carrasco-Pozo, C., Pastene, E., Lopez-Alarcón, C., & Olea-Azar, C. Cu(i)-glutathione complex: a potential source of superoxide radicals generation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(13):6568–6574, 2008. doi: 10.1016/j.bmc.2008.05.026.
- [38] Nappi, A.J. & Vass, E. Comparative studies of enhanced iron-mediated production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid, and selected catechols. *Biochimica et biophysica acta*, 1336(2):295–302, 1997. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/s0304-4165(97)00039-1.
- [39] Degrossoli, A., Müller, A., Xie, K., Schneider, J.F., Bader, V., Winklhofer, K.F., Meyer, A.J., & Leichert, L.I. Neutrophil-generated hocl leads to non-specific thiol oxidation in phagocytized bacteria. *eLife*, 7, 2018. doi: 10.7554/elife.32288.
- [40] Gupta, V. & Carroll, K.S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(2):847–875, 2014. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.040.
- [41] Rhee, S.G. & Kil, I.S. Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins. *Annual review of biochemistry*, 86:749–775, 2017. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014431.
- [42] Ma, L.H., Takanishi, C.L., & Wood, M.J. Molecular mechanism of oxidative stress perception by the orp1 protein. *The Journal of biological chemistry*, 282(43):31429–31436, 2007. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M705953200.
- [43] Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., & Toledano, M.B. A thiol peroxidase is an h2o2 receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4):471–481, 2002. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01048-6.

- [44] Pople, J.M.M. & Chalker, J.M. A critical evaluation of probes for cysteine sulfenic acid. *Current opinion in chemical biology*, 60:55–65, 2021. ISSN 1367-5931. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.07.011.
- [45] Shi, Y. & Carroll, K.S. Comments on 'a critical evaluation of probes for cysteine sulfenic acid'. *Current opinion in chemical biology*, 60:131–133, 2021. ISSN 1367-5931. doi: 10.1016/j.cbpa.2021.01.004.
- [46] Forman, H.J., Davies, M.J., Krämer, A.C., Miotto, G., Zaccarin, M., Zhang, H., & Ursini, F. Protein cysteine oxidation in redox signaling: Caveats on sulfenic acid detection and quantification. *Archives of biochemistry and biophysics*, 617:26–37, 2017. doi: 10.1016/j.abb.2016.09.013.
- [47] Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K., & Barford, D. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1b involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*, 423(6941):769–773, 2003. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature01680.
- [48] Yang, J., Groen, A., Lemeer, S., Jans, A., Slijper, M., Roe, S.M., den Hertog, J., & Barford, D. Reversible oxidation of the membrane distal domain of receptor ptpalpha is mediated by a cyclic sulfenamide. *Biochemistry*, 46(3):709–719, 2007. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi061546m.
- [49] Lee, J.W., Soonsanga, S., & Helmann, J.D. A complex thiolate switch regulates the bacillus subtilis organic peroxide sensor ohrr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21):8743–8748, 2007. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0702081104.
- [50] Qian, J., Klomsiri, C., Wright, M.W., King, S.B., Tsang, A.W., Poole, L.B., & Furdai, C.M. Simple synthesis of 1,3-cyclopentanedione derived probes for labeling sulfenic acid proteins. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(32):9203–9205, 2011. doi: 10.1039/c1cc12127h.
- [51] Benitez, L.V. & Allison, W.S. The inactivation of the acyl phosphatase activity catalyzed by the sulfenic acid form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by dimedone and olefins. *The Journal of biological chemistry*, 249(19):6234–6243, 1974. ISSN 0021-9258. doi: 10.1016/S0021-9258(19)42244-8.
- [52] Yang, J., Gupta, V., Tallman, K.A., Porter, N.A., Carroll, K.S., & Liebler, D.C. Global, in situ, site-specific analysis of protein s-sulfenylation. *Nature protocols*, 10(7):1022–1037, 2015. doi: 10.1038/nprot.2015.062.
- [53] Waszczak, C., Akter, S., Eeckhout, D., Persiau, G., Wahni, K., Bodra, N., van Molle, I., de Smet, B., Vertommen, D., Gevaert, K., de Jaeger, G., van Montagu, M., Messens, J., & van Breusegem, F. Sulfenome mining in arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31):11545–11550, 2014. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1411607111.
- [54] Klomsiri, C., Nelson, K.J., Bechtold, E., Soito, L., Johnson, L.C., Lowther, W.T., Ryu, S.E., King, S.B., Furdai, C.M., & Poole, L.B. Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins. *Methods in enzymology*, 473:77–94, 2010. doi: 10.1016/S0076-6879(10)73003-2.
- [55] Seo, Y.H. & Carroll, K.S. Quantification of protein sulfenic acid modifications using isotope-coded dimedone and iodo-dimedone. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(6):1342–1345, 2011. doi: 10.1002/anie.201007175.

- [56] Do, D.T., Le, T.Q.T., & Le, N.Q.K. Using deep neural networks and biological subwords to detect protein s-sulfenylation sites. *Briefings in bioinformatics*, 22(3), 2021. doi: 10.1093/bib/bbaa128.
- [57] Khan, Z.U. & Pi, D. Deepsspred: A deep learning based sulfenylation site predictor via a novel nsegmented optimize federated feature encoder. *Protein and peptide letters*, 28(6):708–721, 2021. doi: 10.2174/0929866527666201202103411.
- [58] Wang, L., Zhang, R., & Mu, Y. Fu-sulfpred: Identification of protein s-sulfenylation sites by fusing forests via chou's general pseaac. *Journal of theoretical biology*, 461:51–58, 2019. doi: 10.1016/j.jtbi.2018.10.046.
- [59] Wang, X., Yan, R., Li, J., & Song, J. Sohpred: a new bioinformatics tool for the characterization and prediction of human s-sulfenylation sites. *Molecular bioSystems*, 12(9):2849–2858, 2016. doi: 10.1039/c6mb00314a.
- [60] Xu, Y., Ding, J., & Wu, L.Y. isulf-cys: Prediction of s-sulfenylation sites in proteins with physicochemical properties of amino acids. *PLoS one*, 11(4):e0154237, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0154237.
- [61] Deponte, M. The incomplete glutathione puzzle: Just guessing at numbers and figures? *Antioxidants & redox signaling*, 27(15):1130–1161, 2017. doi: 10.1089/ars.2017.7123.
- [62] Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5):3217–3266, 2013. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- [63] Deponte, M. Mitochondrial protein import in malaria parasites. In Hommel, M. & Kremsner, P.G., editors, *Encyclopedia of Malaria*, pages 1–13. Springer New York, New York, NY, 2021. ISBN 978-1-4614-8757-9. doi: 10.1007/978-1-4614-8757-9\backslash\$textunderscore.
- [64] Deponte M., editor. *Redox chemistry and biology of thiols Chapter 12*. Academic Press, London, UK, 2022.
- [65] Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J.M., Durán, R., Freeman, B.A., Radi, R., & Alvarez, B. Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry*, 47(1):358–367, 2008. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi701520y.
- [66] Gupta, V. & Carroll, K.S. Profiling the reactivity of cyclic c-nucleophiles towards electrophilic sulfur in cysteine sulfenic acid. *Chemical science*, 7(1):400–415, 2016. ISSN 2041-6520. doi: 10.1039/C5SC02569A.
- [67] Gupta, V., Yang, J., Liebler, D.C., & Carroll, K.S. Diverse redoxome reactivity profiles of carbon nucleophiles. *Journal of the American Chemical Society*, 139(15):5588–5595, 2017. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/jacs.7b01791.
- [68] Shi, Y., Fu, L., Yang, J., & Carroll, K.S. Wittig reagents for chemoselective sulfenic acid ligation enables global site stoichiometry analysis and redox-controlled mitochondrial targeting. *Nature chemistry*, 13(11):1140–1150, 2021. doi: 10.1038/s41557-021-00767-2.
- [69] Stöcker, S., van Laer, K., Mijuskovic, A., & Dick, T.P. The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs. *Antioxidants & redox signaling*, 28(7):558–573, 2018. doi: 10.1089/ars.2017.7162.
- [70] World Health Organization. *World Malaria Report*. Geneva, 2023. ISBN 9789240086173.

- [71] Escalante, A.A. & Ayala, F.J. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24):11373–11377, 1994. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.91.24.11373.
- [72] Barta, J.R. Phylogenetic analysis of the class Sporozoa (phylum Apicomplexa Levine, 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. *The Journal of Parasitology*, 75(2):195–206, 1989. ISSN 0022-3395.
- [73] Bartoloni, A. & Zammarchi, L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 4(1):e2012026, 2012. doi: 10.4084/MJHID.2012.026.
- [74] Phillips, M.A., Burrows, J.N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R.H., van Voorhis, W.C., & Wells, T.N.C. Malaria. *Nature reviews. Disease primers*, 3:17050, 2017. doi: 10.1038/nrdp.2017.50.
- [75] Wernsdorfer, W.H., editor. *Malaria: Principles and practice of malariaology: p. 707-734*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988. ISBN 0443024170.
- [76] Lucius, R. & Loos-Frank, B. *Biologie von Parasiten*. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2. Aufl. edition, 2008. ISBN 978-3-540-37707-8. doi: 10.1007/978-3-540-37709-2.
- [77] Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S.G., Cox-Singh, J., Thomas, A., & Conway, D.J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet (London, England)*, 363(9414):1017–1024, 2004. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15836-4.
- [78] World Health Organization. *Management of Severe Malaria: A Practical Handbook*. World Health Organization, Geneva, 3rd ed. edition, 2012. ISBN 9789241548526.
- [79] Wah, S.T., Hananantachai, H., Kerdpin, U., Plabplueng, C., Prachayasittikul, V., & Nuchnoi, P. Molecular basis of human cerebral malaria development. *Tropical medicine and health*, 44:33, 2016. ISSN 1348-8945. doi: 10.1186/s41182-016-0033-6.
- [80] Moriarty, L.F., Nkoli, P.M., Likwela, J.L., Mulopo, P.M., Sompwe, E.M., Rika, J.M., Mavoko, H.M., Savigel, S.S., Jones, S., Ntamabyaliro, N.Y., Kaputu, A.K., Lucchi, N., Subramaniam, G., Niang, M., Sadou, A., Ngoyi, D.M., Muyembe Tamfum, J.J., Schmedes, S.E., Plucinski, M.M., Chowell-Puente, G., Halsey, E.S., & Kahunu, G.M. Therapeutic efficacy of artemisinin-based combination therapies in Democratic Republic of the Congo and investigation of molecular markers of antimalarial resistance. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 105(4):1067–1075, 2021. doi: 10.4269/ajtmh.21-0214.
- [81] World Health Organization. *WHO Guidelines for Malaria*. Geneva, 2023.
- [82] Accrombessi, M., Cook, J., Dangbenon, E., Yovogan, B., Akpovi, H., Sovi, A., Adoha, C., Assongba, L., Sidick, A., Akinro, B., Ossè, R., Tokponnon, F., Aïkpon, R., Ogouyemi-Hounto, A., Padonou, G.G., Kleinschmidt, I., Messenger, L.A., Rowland, M., Ngufor, C., Protopopoff, N., & Akogbetu, M.C. Efficacy of pyriproxyfen-pyrethroid long-lasting insecticidal nets (lins) and chlorfenapyr-pyrethroid lins compared with pyrethroid-only lins for malaria control in Benin: a cluster-randomised, superiority trial. *Lancet (London, England)*, 401(10375):435–446, 2023. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02319-4.

- [83] Tinto, H., Otieno, W., Gesase, S., Sorgho, H., Otieno, L., Liheluka, E., Valéa, I., Sing'oei, V., Malabeja, A., Valia, D., Wangwe, A., Gvozdenovic, E., Guerra Mendoza, Y., Jongert, E., Lievens, M., Roman, F., Schuerman, L., & Lusingu, J. Long-term incidence of severe malaria following rts,s/as01 vaccination in children and infants in africa: an open-label 3-year extension study of a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet. Infectious diseases*, 19(8): 821–832, 2019. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30300-7.
- [84] Datoo, M.S., Natama, M.H., Somé, A., Traoré, O., Rouamba, T., Bellamy, D., Yameogo, P., Valia, D., Tegneri, M., Ouedraogo, F., Soma, R., Sawadogo, S., Sorgho, F., Derra, K., Rouamba, E., Orindi, B., Ramos Lopez, F., Flaxman, A., Cappuccini, F., Kailath, R., Elias, S., Mukhopadhyay, E., Noe, A., Cairns, M., Lawrie, A., Roberts, R., Valéa, I., Sorgho, H., Williams, N., Glenn, G., Fries, L., Reimer, J., Ewer, K.J., Shaligram, U., Hill, A.V.S., & Tinto, H. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, r21 in adjuvant matrix-m, with seasonal administration to children in burkina faso: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 397(10287):1809–1818, 2021. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00943-0.
- [85] Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S.L., & Ménard, R. Imaging movement of malaria parasites during transmission by anopheles mosquitoes. *Cellular microbiology*, 6(7): 687–694, 2004. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00395.x.
- [86] Sidjanski, S. & Vanderberg, J.P. Delayed migration of plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57(4):426–429, 1997. doi: 10.4269/ajtmh.1997.57.426.
- [87] Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. Quantitative imaging of plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*, 12(2):220–224, 2006. ISSN 1078-8956. doi: 10.1038/nm1350.
- [88] Mota, M.M. & Rodriguez, A. Migration through host cells: the first steps of plasmodium sporozoites in the mammalian host. *Cellular microbiology*, 6(12):1113–1118, 2004. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00460.x.
- [89] Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S., Mordelet, E., van Rooijen, N., Medvinsky, A., Ménard, R., & Amino, R. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *The Journal of experimental medicine*, 210(5): 905–915, 2013. doi: 10.1084/jem.20121130.
- [90] Frevert, U., Usynin, I., Baer, K., & Klotz, C. Nomadic or sessile: can kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cellular microbiology*, 8(10):1537–1546, 2006. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00777.x.
- [91] Prudêncio, M., Rodriguez, A., & Mota, M.M. The silent path to thousands of merozoites: the plasmodium liver stage. *Nature reviews. Microbiology*, 4(11):849–856, 2006. doi: 10.1038/nrmicro1529.
- [92] Lingelbach, K. & Joiner, K.A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding plasmodium and toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *Journal of cell science*, 111 (Pt 11):1467–1475, 1998. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.111.11.1467.
- [93] Sá E Cunha, C., Nyboer, B., Heiss, K., Sanches-Vaz, M., Fontinha, D., Wiedtke, E., Grimm, D., Przyborski, J.M., Mota, M.M., Prudêncio, M., & Mueller, A.K. Plasmodium berghei exp-1 interacts with host apolipoprotein h during plasmodium liver-stage development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7):E1138–E1147, 2017. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1606419114.

- [94] Roques, M., Bindschedler, A., Beyeler, R., & Heussler, V.T. Same, same but different: Exploring plasmodium cell division during liver stage development. *PLoS pathogens*, 19(3):e1011210, 2023. doi: 10.1371/journal.ppat.1011210.
- [95] Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menard, R., & Heussler, V.T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5791):1287–1290, 2006. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1129720.
- [96] de Niz, M., Burda, P.C., Kaiser, G., Del Portillo, H.A., Spielmann, T., Frischknecht, F., & Heussler, V.T. Progress in imaging methods: insights gained into plasmodium biology. *Nature reviews. Microbiology*, 15(1):37–54, 2017. doi: 10.1038/nrmicro.2016.158.
- [97] Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S., & Mitchell, G.H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitology today (Personal ed.)*, 16(10):427–433, 2000. ISSN 0169-4758. doi: 10.1016/s0169-4758(00)01755-5.
- [98] Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T., & Trager, W. Fine structure of human malaria in vitro. *The Journal of protozoology*, 25(4):443–452, 1978. ISSN 0022-3921. doi: 10.1111/j.1550-7408.1978.tb04167.x.
- [99] Lin, C.S., Uboldi, A.D., Marapana, D., Czabotar, P.E., Epp, C., Bujard, H., Taylor, N.L., Perugini, M.A., Hodder, A.N., & Cowman, A.F. The merozoite surface protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by plasmodium falciparum. *The Journal of biological chemistry*, 289(37):25655–25669, 2014. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M114.586495.
- [100] Kadekoppala, M. & Holder, A.A. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the msp1 complex and the msp7 family. *International journal for parasitology*, 40(10):1155–1161, 2010. ISSN 0020-7519. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.04.008.
- [101] Koch, M. & Baum, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. *Cellular microbiology*, 18(3):319–329, 2016. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/cmi.12557.
- [102] Cowman, A.F., Tonkin, C.J., Tham, W.H., & Duraisingh, M.T. The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. *Cell host & microbe*, 22(2):232–245, 2017. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.003.
- [103] Sam-Yellowe, T.Y. The role of the maurer's clefts in protein transport in plasmodium falciparum. *Trends in parasitology*, 25(6):277–284, 2009. doi: 10.1016/j.pt.2009.03.009.
- [104] Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L., & Braun Breton, C. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *International journal for parasitology*, 36(1):23–36, 2006. ISSN 0020-7519. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.10.001.
- [105] Sharma, Y.D. Knobs, knob proteins and cytoadherence in falciparum malaria. *The International journal of biochemistry*, 23(9):775–789, 1991. ISSN 0020-711X. doi: 10.1016/0020-711x(91)90061-q.
- [106] Leech, J.H., Barnwell, J.W., Aikawa, M., Miller, L.H., & Howard, R.J. Plasmodium falciparum malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. *The Journal of cell biology*, 98(4):1256–1264, 1984. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.98.4.1256.

- [107] Pasternak, N.D. & Dzikowski, R. Pfemp1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite plasmodium falciparum. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(7): 1463–1466, 2009. doi: 10.1016/j.biocel.2008.12.012.
- [108] Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F., & Howard, R.J. Cloning the p. falciparum gene encoding pfemp1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, 82(1):77–87, 1995. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/0092-8674(95)90054-3.
- [109] Smith, J.D., Rowe, J.A., Higgins, M.K., & Lavstsen, T. Malaria’s deadly grip: cytoadhesion of plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cellular microbiology*, 15(12):1976–1983, 2013. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/cmi.12183.
- [110] Guizetti, J. & Scherf, A. Silence, activate, poise and switch! mechanisms of antigenic variation in plasmodium falciparum. *Cellular microbiology*, 15(5):718–726, 2013. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/cmi.12115.
- [111] Scherf, A., Lopez-Rubio, J.J., & Riviere, L. Antigenic variation in plasmodium falciparum. *Annual review of microbiology*, 62:445–470, 2008. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093134.
- [112] Lazarus, M.D., Schneider, T.G., & Taraschi, T.F. A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Journal of cell science*, 121(11):1937–1949, 2008. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.023150.
- [113] Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar, A.D., & Madsen, S.K. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*, 404(6775):307–310, 2000. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/35005132.
- [114] Francis, S.E., Sullivan, D.J., & Goldberg, D.E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite plasmodium falciparum. *Annual review of microbiology*, 51:97–123, 1997. doi: 10.1146/annurev.micro.51.1.97.
- [115] van Dooren, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler, L.M., Cowman, A.F., & McFadden, G.I. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of plasmodium falciparum. *Molecular microbiology*, 57(2):405–419, 2005. ISSN 0950-382X. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04699.x.
- [116] Gerald, N., Mahajan, B., & Kumar, S. Mitosis in the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Eukaryotic cell*, 10(4):474–482, 2011. doi: 10.1128/EC.00314-10.
- [117] Wirth, C.C. & Pradel, G. Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 302(4-5):172–178, 2012. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.07.003.
- [118] Shang, X., Shen, S., Tang, J., He, X., Zhao, Y., Wang, C., He, X., Guo, G., Liu, M., Wang, L., Zhu, Q., Yang, G., Jiang, C., Zhang, M., Yu, X., Han, J., Culleton, R., Jiang, L., Cao, J., Gu, L., & Zhang, Q. A cascade of transcriptional repression determines sexual commitment and development in plasmodium falciparum. *Nucleic acids research*, 49(16):9264–9279, 2021. doi: 10.1093/nar/gkab683.
- [119] Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K.B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K.C., Duraisingh, M.T., Taylor, T.E., Milner, D.A., & Marti, M. Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science translational medicine*, 6(244):244re5, 2014. doi: 10.1126/scitranslmed.3008882.

- [120] Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A.H., Moraleda, C., Joice, R., Cisteró, P., Li Wai Suen, Connie S. N., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I., Marti, M., Alonso, P.L., Menéndez, C., Schofield, L., & Mayor, A. Molecular evidence for the localization of plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. *Blood*, 123(7):959–966, 2014. doi: 10.1182/blood-2013-08-520767.
- [121] Billker, O., Shaw, M.K., Margos, G., & Sinden, R.E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of plasmodium berghei in vitro. *Parasitology*, 115 (Pt 1):1–7, 1997. ISSN 0031-1820. doi: 10.1017/s0031182097008895.
- [122] Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A.E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R.E., & Morris, H.R. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, 392(6673): 289–292, 1998. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/32667.
- [123] Bennink, S., Kiesow, M.J., & Pradel, G. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cellular microbiology*, 18(7):905–918, 2016. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/cmi.12604.
- [124] Aly, A.S.I., Vaughan, A.M., & Kappe, S.H.I. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annual review of microbiology*, 63:195–221, 2009. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073403.
- [125] Klug, D. & Frischknecht, F. Motility precedes egress of malaria parasites from oocysts. *eLife*, 6, 2017. doi: 10.7554/eLife.19157.
- [126] Douglas, R.G., Amino, R., Sinnis, P., & Frischknecht, F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends in parasitology*, 31(8):357–362, 2015. doi: 10.1016/j.pt.2015.04.010.
- [127] Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S., & Ginsburg, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International journal for parasitology*, 34(2):163–189, 2004. ISSN 0020-7519. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.09.011.
- [128] Jortzik, E. & Becker, K. Thioredoxin and glutathione systems in plasmodium falciparum. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 302(4-5):187–194, 2012. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.07.007.
- [129] Johnson, R.M., Goyette, G., Ravindranath, Y., & Ho, Y.S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous h2o2 levels in erythrocytes. *Free radical biology & medicine*, 39(11):1407–1417, 2005. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002.
- [130] Wezena, C.A., Krafczyk, J., Staudacher, V., & Deponte, M. Growth inhibitory effects of standard pro- and antioxidants on the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Experimental parasitology*, 180:64–70, 2017. doi: 10.1016/j.exppara.2017.02.017.
- [131] Kosower, N.S. & Kosower, E.M. Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods in enzymology*, 251:123–133, 1995. doi: 10.1016/0076-6879(95)51116-4.
- [132] Sies, H., Belousov, V.V., Chandel, N.S., Davies, M.J., Jones, D.P., Mann, G.E., Murphy, M.P., Yamamoto, M., & Winterbourn, C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ros) in cell biology and physiology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 23(7):499–515, 2022. doi: 10.1038/s41580-022-00456-z.

- [133] Kimura, R., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S.i., & Kano, S. 2-cys peroxiredoxin of plasmodium falciparum is involved in resistance to heat stress of the parasite. *Parasitology international*, 62(2):137–143, 2013. doi: 10.1016/j.parint.2012.11.005.
- [134] Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S.i., & Kano, S. Disruption of the plasmodium falciparum 2-cys peroxiredoxin gene renders parasites hypersensitive to reactive oxygen and nitrogen species. *FEBS letters*, 547(1-3):140–144, 2003. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00694-x.
- [135] Djuika, C.F., Staudacher, V., Sanchez, C.P., Lanzer, M., & Deponte, M. Knockout of the peroxiredoxin 5 homologue pfaop does not affect the artemisinin susceptibility of plasmodium falciparum. *Scientific reports*, 7(1):4410, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-04277-5.
- [136] Sienkiewicz, N., Daher, W., Dive, D., Wrenger, C., Viscogliosi, E., Wintjens, R., Jouin, H., Capron, M., Müller, S., & Khalife, J. Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology*, 137(1):121–132, 2004. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.05.005.
- [137] Rhee, S.G. Overview on peroxiredoxin. *Molecules and cells*, 39(1):1–5, 2016. doi: 10.14348/molcells.2016.2368.
- [138] Richard, D., Bartfai, R., Volz, J., Ralph, S.A., Muller, S., Stunnenberg, H.G., & Cowman, A.F. A genome-wide chromatin-associated nuclear peroxiredoxin from the malaria parasite plasmodium falciparum. *The Journal of biological chemistry*, 286(13):11746–11755, 2011. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M110.198499.
- [139] Koncarevic, S., Rohrbach, P., Deponte, M., Krohne, G., Prieto, J.H., Yates, J., Rahlfs, S., & Becker, K. The malarial parasite plasmodium falciparum imports the human protein peroxiredoxin 2 for peroxide detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32):13323–13328, 2009. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0905387106.
- [140] Hall, A., Nelson, K., Poole, L.B., & Karplus, P.A. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3):795–815, 2011. doi: 10.1089/ars.2010.3624.
- [141] Sarma, G.N., Nickel, C., Rahlfs, S., Fischer, M., Becker, K., & Karplus, P.A. Crystal structure of a novel plasmodium falciparum 1-cys peroxiredoxin. *Journal of molecular biology*, 346(4):1021–1034, 2005. doi: 10.1016/j.jmb.2004.12.022.
- [142] Djuika, C.F., Huerta-Cepas, J., Przyborski, J.M., Deil, S., Sanchez, C.P., Doerks, T., Bork, P., Lanzer, M., & Deponte, M. Prokaryotic ancestry and gene fusion of a dual localized peroxiredoxin in malaria parasites. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 2(1):5–13, 2015. ISSN 2311-2638. doi: 10.15698/mic2015.01.182.
- [143] Djuika, C.F., Fiedler, S., Schnölzer, M., Sanchez, C., Lanzer, M., & Deponte, M. Plasmodium falciparum antioxidant protein as a model enzyme for a special class of glutaredoxin/glutathione-dependent peroxiredoxins. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(8):4073–4090, 2013. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.020.
- [144] Staudacher, V., Djuika, C.F., Koduka, J., Schlossarek, S., Kopp, J., Büchler, M., Lanzer, M., & Deponte, M. Plasmodium falciparum antioxidant protein reveals a novel mechanism for balancing turnover and inactivation of peroxiredoxins. *Free radical biology & medicine*, 85:228–236, 2015. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.030.

- [145] Staudacher, V., Trujillo, M., Diederichs, T., Dick, T.P., Radi, R., Morgan, B., & Deponte, M. Redox-sensitive gfp fusions for monitoring the catalytic mechanism and inactivation of peroxiredoxins in living cells. *Redox biology*, 14: 549–556, 2018. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.017.
- [146] Calabrese, G., Peker, E., Amponsah, P.S., Hoehne, M.N., Riemer, T., Mai, M., Bienert, G.P., Deponte, M., Morgan, B., & Riemer, J. Hyperoxidation of mitochondrial peroxiredoxin limits h₂ o₂ -induced cell death in yeast. *The EMBO journal*, 38(18):e101552, 2019. doi: 10.15252/embj.2019101552.
- [147] Schumann, R., Lang, L., & Deponte, M. Characterization of the glutathione-dependent reduction of the peroxiredoxin 5 homolog pfaop from plasmodium falciparum. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(5):e4290, 2022. ISSN 0961-8368. doi: 10.1002/pro.4290.
- [148] Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C., & Schirmer, R.H. Glutathione-functions and metabolism in the malarial parasite plasmodium falciparum. *Biological chemistry*, 384(4):551–566, 2003. doi: 10.1515/BC.2003.063.
- [149] Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J., & Krugliak, M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical pharmacology*, 56(10):1305–1313, 1998. ISSN 0006-2952. doi: 10.1016/s0006-2952(98)00184-1.
- [150] Umhau, S., Pollegioni, L., Molla, G., Diederichs, K., Welte, W., Pilone, M.S., & Ghisla, S. The x-ray structure of d-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23):12463–12468, 2000. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.97.23.12463.
- [151] Pilone, M.S. D-amino acid oxidase: new findings. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 57(12):1732–1747, 2000. ISSN 1420-682X. doi: 10.1007/PL00000655.
- [152] Molla, G., Porrini, D., Job, V., Motteran, L., Vegezzi, C., Campaner, S., Pilone, M.S., & Pollegioni, L. Role of arginine 285 in the active site of rhodotorula gracilis d-amino acid oxidase. a site-directed mutagenesis study. *The Journal of biological chemistry*, 275(32):24715–24721, 2000. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M908193199.
- [153] Harris, C.M., Molla, G., Pilone, M.S., & Pollegioni, L. Studies on the reaction mechanism of rhodotorula gracilis d-amino-acid oxidase. role of the highly conserved tyr-223 on substrate binding and catalysis. *The Journal of biological chemistry*, 274(51):36233–36240, 1999. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.274.51.36233.
- [154] Epp, C., Raskolnikov, D., & Deitsch, K.W. A regulatable transgene expression system for cultured plasmodium falciparum parasites. *Malaria journal*, 7:86, 2008. doi: 10.1186/1475-2875-7-86.
- [155] Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., & Barrell, B. Genome sequence of the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Nature*, 419(6906):498–511, 2002. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature01097.

- [156] Allison, W.S., Benitez, L.V., & Johnson, C.L. The formation of a protein sulfenamide during the inactivation of the acyl phosphatase activity of oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by benzylamine. *Biochemical and biophysical research communications*, 52(4):1403–1409, 1973. ISSN 0006-291X. doi: 10.1016/0006-291x(73)90657-8.
- [157] Reddie, K.G. & Carroll, K.S. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Current opinion in chemical biology*, 12(6):746–754, 2008. ISSN 1367-5931. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.028.
- [158] Reddie, K.G., Seo, Y.H., Muse Iii, W.B., Leonard, S.E., & Carroll, K.S. A chemical approach for detecting sulfenic acid-modified proteins in living cells. *Molecular bioSystems*, 4(6):521–531, 2008. doi: 10.1039/b719986d.
- [159] Owen, J.B. & Butterfield, D.A. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 648:269–277, 2010. doi: 10.1007/978-1-60761-756-3\backslashtextunderscore.
- [160] Gupta, V., Paritala, H., & Carroll, K.S. Reactivity, selectivity, and stability in sulfenic acid detection: A comparative study of nucleophilic and electrophilic probes. *Bioconjugate chemistry*, 27(5):1411–1418, 2016. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00181.
- [161] Sorci, G. & Faivre, B. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1513):71–83, 2009. doi: 10.1098/rstb.2008.0151.
- [162] Kuhn, Y., Rohrbach, P., & Lanzer, M. Quantitative pH measurements in plasmodium falciparum-infected erythrocytes using phluorin. *Cellular microbiology*, 9(4):1004–1013, 2007. ISSN 1462-5814. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00847.x.
- [163] Alonso, J., Barredo, J.L., Díez, B., Mellado, E., Salto, F., García, J.L., & Cortés, E. D-amino-acid oxidase gene from rhodotorula gracilis (rhodosporidium toruloides) atcc 26217. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 4): 1095–1101, 1998. ISSN 1350-0872. doi: 10.1099/00221287-144-4-1095.
- [164] Walliker, D., Quakyi, I.A., Wellem, T.E., McCutchan, T.F., Szarfman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., & Carter, R. Genetic analysis of the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Science (New York, N.Y.)*, 236(4809):1661–1666, 1987. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.3299700.
- [165] Shiao, T.P., Erlanson, D.A., & Gordon, E.M. Selective reduction of peptide isothiazolidin-3-ones. *Organic letters*, 8 (25):5697–5699, 2006. ISSN 1523-7060. doi: 10.1021/ol062077j.
- [166] Ruddraraju, K.V., Parsons, Z.D., Llufrío, E.M., Frost, N.L., & Gates, K.S. Reactions of 1,3-diketones with a dipeptide isothiazolidin-3-one: Toward agents that covalently capture oxidized protein tyrosine phosphatase 1b. *The Journal of organic chemistry*, 80(24):12015–12026, 2015. doi: 10.1021/acs.joc.5b01949.
- [167] Bischoff Eileen Anna Agnes. Masterarbeit: Untersuchungen zur stabilität und reaktivität eines dipeptid-basierten cyclischen sulfenylamids.
- [168] Atkins, P.W., de Paula, J., & Keeler, J.J. *Physikalische Chemie*. WILEY-VCH, Weinheim, 6. auflage edition, 2022. ISBN 9783527828333.
- [169] Dame, J.B., Yowell, C.A., Omara-Opyene, L., Carlton, J.M., Cooper, R.A., & Li, T. Plasmepsin 4, the food vacuole aspartic proteinase found in all plasmodium spp. infecting man. *Molecular and biochemical parasitology*, 130(1):1–12, 2003. doi: 10.1016/s0166-6851(03)00137-3.

- [170] Bonilla, J.A., Bonilla, T.D., Yowell, C.A., Fujioka, H., & Dame, J.B. Critical roles for the digestive vacuole plasmepsins of *Plasmodium falciparum* in vacuolar function. *Molecular microbiology*, 65(1):64–75, 2007. ISSN 0950-382X. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05768.x.
- [171] Deponte, M., Hoppe, H.C., Lee, M.C.S., Maier, A.G., Richard, D., Rug, M., Spielmann, T., & Przyborski, J.M. Wherever it may roam: protein and membrane trafficking in *P. falciparum*-infected red blood cells. *Molecular and biochemical parasitology*, 186(2):95–116, 2012. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.09.007.
- [172] Lambros, C. & Vanderberg, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology*, 65(3):418–420, 1979. ISSN 0022-3395.
- [173] Deitsch, K., Driskill, C., & Wellems, T. Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of dna from human erythrocytes. *Nucleic acids research*, 29(3):850–853, 2001. doi: 10.1093/nar/29.3.850.
- [174] Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N.F., Ralph, S.A., & Fidock, D.A. Artemisinin action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends in parasitology*, 32(9):682–696, 2016. doi: 10.1016/j.pt.2016.05.010.
- [175] Siciliano, G., Santha Kumar, T.R., Bona, R., Camarda, G., Calabretta, M.M., Cevenini, L., Davioud-Charvet, E., Becker, K., Cara, A., Fidock, D.A., & Alano, P. A high susceptibility to redox imbalance of the transmissible stages of *Plasmodium falciparum* revealed with a luciferase-based mature gametocyte assay. *Molecular microbiology*, 104(2): 306–318, 2017. ISSN 0950-382X. doi: 10.1111/mmi.13626.
- [176] Mounkoro, P., Michel, T., Blandin, S., Golinelli-Cohen, M.P., Davioud-Charvet, E., & Meunier, B. Investigating the mode of action of the redox-active antimalarial drug plasmodione using the yeast model. *Free radical biology & medicine*, 141:269–278, 2019. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.026.
- [177] Alizadeh, S., Anani-Sarab, G., Amiri, H., & Hashemi, M. Paraquat induced oxidative stress, dna damage, and cytotoxicity in lymphocytes. *Heliyon*, 8(7):e09895, 2022. ISSN 2405-8440. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09895.
- [178] Bus, J.S. & Gibson, J.E. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environmental health perspectives*, 55:37–46, 1984. ISSN 0091-6765. doi: 10.1289/ehp.845537.
- [179] Yikrazuul. Redoxcycle paraquat: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=34241656>, 2014.
- [180] Gallo, V., Schwarzer, E., Rahlfs, S., Schirmer, R.H., van Zwieten, R., Roos, D., Arese, P., & Becker, K. Inherited glutathione reductase deficiency and *Plasmodium falciparum* malaria—a case study. *PloS one*, 4(10):e7303, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0007303.
- [181] Nagy, P. & Ashby, M.T. Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the oxidation of cysteine by hypohalous acid to give cysteine sulfenic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45):14082–14091, 2007. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja0737218.
- [182] Tsutsumi, R., Harizanova, J., Stockert, R., Schröder, K., Bastiaens, P.I.H., & Neel, B.G. Assay to visualize specific protein oxidation reveals spatio-temporal regulation of shp2. *Nature communications*, 8(1):466, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-00503-w.

- [183] Shi, Y. & Carroll, K.S. Parallel evaluation of nucleophilic and electrophilic chemical probes for sulfenic acid: Reactivity, selectivity and biocompatibility. *Redox biology*, 46:102072, 2021. doi: 10.1016/j.redox.2021.102072.
- [184] Sarma, B.K. & Mugesh, G. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1b (ptp1b): a biomimetic study on the unexpected formation of a sulfenyl amide intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28): 8872–8881, 2007. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja070410o.
- [185] Benchoam, D., Semelak, J.A., Cuevasanta, E., Mastrogiovanni, M., Grassano, J.S., Ferrer-Sueta, G., Zeida, A., Trujillo, M., Möller, M.N., Estrin, D.A., & Alvarez, B. Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide. *The Journal of biological chemistry*, 295(46):15466–15481, 2020. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.RA120.014728.
- [186] Cuevasanta, E., Reyes, A.M., Zeida, A., Mastrogiovanni, M., de Armas, M.I., Radi, R., Alvarez, B., & Trujillo, M. Kinetics of formation and reactivity of the persulfide in the one-cysteine peroxiredoxin from mycobacterium tuberculosis. *The Journal of biological chemistry*, 294(37):13593–13605, 2019. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.RA119.008883.
- [187] Dóka, É., Pader, I., Bíró, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballagó, K., Prigge, J.R., Pastor-Flores, D., Dick, T.P., Schmidt, E.E., Arnér, E.S.J., & Nagy, P. A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Science advances*, 2(1):e1500968, 2016. ISSN 2375-2548. doi: 10.1126/sciadv.1500968.
- [188] Pedre, B., Barayeu, U., Ezeriņa, D., & Dick, T.P. The mechanism of action of n-acetylcysteine (nac): The emerging role of h2s and sulfane sulfur species. *Pharmacology & therapeutics*, 228:107916, 2021. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107916.
- [189] Zivanovic, J., Kouroussis, E., Kohl, J.B., Adhikari, B., Bursac, B., Schott-Roux, S., Petrovic, D., Miljkovic, J.L., Thomas-Lopez, D., Jung, Y., Miler, M., Mitchell, S., Milosevic, V., Gomes, J.E., Benhar, M., Gonzalez-Zorn, B., Ivanovic-Burmazovic, I., Torregrossa, R., Mitchell, J.R., Whiteman, M., Schwarz, G., Snyder, S.H., Paul, B.D., Carroll, K.S., & Filipovic, M.R. Selective persulfide detection reveals evolutionarily conserved antiaging effects of s-sulfhydration. *Cell metabolism*, 31(1):207, 2020. doi: 10.1016/j.cmet.2019.12.001.
- [190] Pan, J. & Carroll, K.S. Persulfide reactivity in the detection of protein s-sulfhydration. *ACS chemical biology*, 8(6): 1110–1116, 2013. doi: 10.1021/cb4001052.
- [191] Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., van Dien, S.J., & Rabinowitz, J.D. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in escherichia coli. *Nature chemical biology*, 5(8):593–599, 2009. doi: 10.1038/nchembio.186.
- [192] Ponsero, A.J., Igarria, A., Darch, M.A., Miled, S., Outten, C.E., Winther, J.R., Palais, G., D’Aurèaux, B., Delaunay-Moisan, A., & Toledano, M.B. Endoplasmic reticulum transport of glutathione by sec61 is regulated by ero1 and bip. *Molecular cell*, 67(6):962–973.e5, 2017. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.012.
- [193] Ferreira, R.B., Fu, L., Jung, Y., Yang, J., & Carroll, K.S. Reaction-based fluorogenic probes for detecting protein cysteine oxidation in living cells. *Nature communications*, 13(1):5522, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-33124-z.
- [194] Antunes, F. & Brito, P.M. Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox biology*, 13:1–7, 2017. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.039.

- [195] Marinho, H.S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology*, 2:535–562, 2014. doi: 10.1016/j.redox.2014.02.006.
- [196] Boselli, A., Piubelli, L., Molla, G., Sacchi, S., Pilone, M.S., Ghisla, S., & Pollegioni, L. On the mechanism of *rhodotorula gracilis* d-amino acid oxidase: role of the active site serine 335. *Biochimica et biophysica acta*, 1702(1): 19–32, 2004. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.07.005.
- [197] Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., & Poole, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences*, 28(1):32–40, 2003. ISSN 0968-0004. doi: 10.1016/s0968-0004(02)00003-8.
- [198] Rhee, S.G. & Woo, H.A. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H_2O_2 , and protein chaperones. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3):781–794, 2011. doi: 10.1089/ars.2010.3393.
- [199] Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.W., Yun, D.J., Rhee, S.G., Cho, M.J., & Lee, S.Y. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, 117(5):625–635, 2004. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2004.05.002.
- [200] McFadden, G.I., Reith, M.E., Munholland, J., & Lang-Unnasch, N. Plastid in human parasites. *Nature*, 381(6582): 482, 1996. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/381482a0.
- [201] McFadden, G.I. The apicoplast. *Protoplasma*, 248(4):641–650, 2011. doi: 10.1007/s00709-010-0250-5.
- [202] Köhler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., & Roos, D.S. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5305):1485–1489, 1997. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.275.5305.1485.
- [203] Gould, S.B., Waller, R.F., & McFadden, G.I. Plastid evolution. *Annual review of plant biology*, 59:491–517, 2008. ISSN 1543-5008. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915.
- [204] Moore, R.B., Oborník, M., Janouskovec, J., Chrudimský, T., Vancová, M., Green, D.H., Wright, S.W., Davies, N.W., Bolch, C.J.S., Heimann, K., Slapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J.M., & Carter, D.A. A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature*, 451(7181):959–963, 2008. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature06635.
- [205] Janouskovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukes, J., & Keeling, P.J. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24):10949–10954, 2010. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1003335107.
- [206] Porras-Dominguez, J., Lothier, J., Limami, A.M., & Tcherkez, G. d-amino acids metabolism reflects the evolutionary origin of higher plants and their adaptation to the environment. *Plant, cell & environment*, 47(5):1503–1512, 2024. doi: 10.1111/pce.14826.
- [207] Kehr, S., Sturm, N., Rahlfs, S., Przyborski, J.M., & Becker, K. Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLoS pathogens*, 6(12):e1001242, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1001242.