



**Untersuchung der Oxidativen-Stress-Hypothese für die  
Blutstadien des menschlichen Malaria-Erregers *Plasmodium  
falciparum***

Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern Landau  
zur Verleihung des akademischen Grades

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

genehmigte Dissertation

DE – 386

vorgelegt von

Britta Husemann

geboren in Neustadt an der Weinstraße

Betreuer: Prof. Dr. Marcel Deponte

Kaiserslautern, den 22.05.2025



## Erklärung

Hiermit bestätige ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet habe.

Kaiserslautern, den \_\_\_\_\_

### Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Antonio Pierik

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marcel Deponte

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Stefanie Müller-Schüssele

Prüfer: Prof. Dr. Georg Manolikakes



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Britta Husemann  
Geburtsort Neustadt an der Weinstraße

## Ausbildung

März 2021 – Heute RPTU Kaiserslautern-Landau, Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Promotion im Bereich Biochemie bei Prof. Marcel Deponte  
**„Untersuchung der Oxidativen-Stress-Hypothese für die Blutstadien des menschlichen Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*“**

Oktober 2018 – Januar 2021 Technische Universität Kaiserslautern  
Masterstudium Chemie: Master of science, Abschlussnote 1.7  
Masterarbeit im Bereich Biochemie bei Prof. Marcel Deponte  
**„Etablierung des Split-DHFR Systems zur Untersuchung mitochondrialer Protein-Protein Interaktionen in *Plasmodium falciparum*“**

April 2016 – September 2018 Technische Universität Kaiserslautern  
Bachelorstudium Chemie: Bachelor of science, Abschlussnote 2.4  
Bachelorarbeit im Bereich Organische Chemie bei Prof. Jens Hartung  
**„Bromierte Zimtsäurederivate als Bromierungsreagenzien“**



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Marcel Deponte für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis, die Bereitstellung der Themen und die Betreuung während meiner Promotion bedanken. In der Promotionszeit konnte ich mich persönlich weiterentwickeln und meine eigenen Ideen in die Arbeit einfließen lassen. Bei wissenschaftlichen Problemen hast du mir immer mit gutem Rat und Ideen weitergeholfen, sodass ich meine eigene wissenschaftliche Arbeitsweise entwickeln konnte.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner gesamten Promotionskommission Prof. Dr. Stefanie Müller-Schüssele, Prof. Dr. Georg Manolikakes und Prof. Dr. Antonio Pierik für die Übernahme dieser Tätigkeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern meines *Thesis Advisory Committees*, Prof. Dr. Stefanie Müller-Schüssele und Prof. Dr. Bruce Morgan, für die Betreuung, die Unterstützung und wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Ebenfalls besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefanie Müller-Schüssele und Sadia Sayed Tamanna für die große Unterstützung bei der Optimierung und Aufnahme der Mikroskopiebilder. Dr. Julien Guizetti und Christoph Wenz vom Universitätsklinikum Heidelberg danke ich für die Unterstützung beim Erlernen der Immunfluoreszenzmikroskopie in ihrem Labor.

Ich möchte dem gesamtem GRK2737-STRESSistance danken, dass sie mich in dieser Zeit begleitet haben. Besonders hervorzuheben ist hier Gabriele Amoroso für die Organisation vieler lehrreicher und interessanter Seminare, Workshops und Retreats, sowie der Hilfe bei bürokratischen Aufgaben.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Tobias Dansen des *University Medical Center Utrecht* danke ich für die Bestimmung der *Oxygen consumption rate*. Ebenfalls Frau Jessica Kehrer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Lanzer des Universitätsklinikums Heidelberg danke ich für die Oxidationsmessungen der Chac1-Stämme.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Kollegen Lukas, Eileen, Felix, Lea, Laura, Philipp, Fabian, Luzia und Sophie die mich während meiner Zeit begleitet haben. Vielen Dank für eure Unterstützung! Mit euch hat die Laborzeit viel Spaß gemacht. Auch wenn nicht immer alles einfach war, ich konnte mich immer auf euer offenes Ohr, nette Gespräche und euren Rat verlassen. Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Studenten, die ich während meiner Laborzeit betreuen durfte und die mich bei Teilen meiner Arbeit unterstützt haben (Masterarbeit: Lea, Bachelorarbeit: Nico, Praktikum: Lea, Alissa und Girish).

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Partner Daniel. Ihr habt mich auch in schweren Zeiten unterstützt und ich bin unendlich dankbar euch an meiner Seite zu haben. Daniel, vielen Dank, dass du dir jeden Tag meine Geschichten aus dem Labor angehört hast. Du hast mich, wenn ich mal

wieder alles schlecht gesehen habe, aufgebaut und warst immer bei mir, egal welche Entscheidung ich getroffen habe.

Zuletzt möchte ich allen Freunden danken, die ich während meiner Unizeit kennen und schätzen gelernt habe. Hier im Besonderen zu nennen sind: Raphi und Max. Danke, dass wir alle zusammen so tolle Zeiten verbringen konnten. Egal ob während der Fachschaftsratszeit, Unipartys, Festivals, einem gemütlichen Spieleabend oder gemeinsamen Mittagessen-Dates, es hat immer Spaß gemacht Zeit mit euch zu verbringen und auch mal nicht über Labor und Uni zu reden.

## Abkürzungsverzeichnis

ACP	Acyl-Carrier-Protein
AOP	<i>Antioxidant protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bsd	Blasticidin-Desaminase
Chac1	<i>mouse glutathionspezifische <math>\gamma</math>-Glutamylcyclotransferase 1</i>
Crt	<i>Chloroquine resistance transporter</i>
Cyto	Cytosol
DAAO	D-Aminosäureoxidase
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHODH	Dihydroorotatdehydrogenase
DV	Verdauungsvakuole ( <i>digestive vacuole</i> )
EBL	<i>Erythrocyte binding-like protein</i>
eIF2 $\alpha$	<i>translation initiation factor 2 subunit-<math>\alpha</math></i>
EMP1	<i>erythrocyte membrane protein 1</i>
ERAD	<i>proteasome-based ER-associated protein degradation</i>
Exp2	<i>Exported protein 2</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe/S-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glp	<i>Glutaredoxin-like protein</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GST	Glutathiontransferase

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSP60	<i>heat shock protein 60</i>
HT1	<i>hexose transporter 1</i>
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IM	innere mitochondriale Membran
IMS	Intermembranraum des Mitochondriums
iRBC	Infizierte rote Blutzellen
ISC	<i>Iron-Sulfur Cluster Assembly</i>
ITN	<i>Insecticide-treated mosquito nets</i>
<i>k<sub>cat</sub></i>	<i>Turnover number</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LZ	Leucinzipper
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
Mba1	<i>Inner membrane-associated ribosome receptor 1</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance 1 transporter</i>
Mia40	<i>Mitochondrial intermembrane space assembly</i>
MitoM	mitochondriale Matrix
MPI	mitochondrialer Proteinimport
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSP	<i>Merozoite surface protein</i>
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NOX	NADPH-Oxidasen
NPP	<i>New permeability pathway</i>

Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-released factor</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxidanionradikal
OH <sup>·</sup>	Hydroxylradikal
OM	<i>Outer mitochondrial Membrane</i>
OXA	<i>Oxidase assembly insertase</i>
PAM	<i>Presequence translocase-associated protein</i>
PCA	Protein-Fragment-Komplementationsassay
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCT <sub>1/2</sub>	<i>Parasite clearance half-time</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Plrx	Plasmoredoxin
POI	<i>Protein of interest</i>
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PPM	Parasitenplasmamembran
Prx	Peroxiredoxin
PSAC	<i>Plasmodial surface anion channel</i>
Q	Ubiquinon
QH <sub>2</sub>	Ubiquinol
RBC	Rote Blutzellen
Rhs	<i>Reticulocyte-binding protein homologs</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAM	<i>Sorting and assembly machinery</i>
SOD	Superoxiddismutase
STEVOR	<i>subtelomeric variable open reading frame</i>

Suf	<i>Sulfur formation</i>
tBOOH	<i>tert-Butylhydroperoxid</i>
TIM	<i>Translocase of the inner mitochondrial membrane</i>
TOM	<i>Translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
Trx	Thioredoxin
uRBC	Uninfizierte rote Blutzellen
WHO	<i>World health organisation</i>
WR	WR99210
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1.1. STRESSistance.....	1
1.2. Untersuchung der <i>Glutaredoxin-like proteins</i> Glp1, Glp2 und Glp3 in <i>Plasmodium falciparum</i> .....	3
1.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay mit Split-Dihydrofolatreduktase .....	4
2. Einleitung.....	5
2.1. <i>Plasmodium falciparum</i> : Lebenszyklus, Eckdaten und Verbreitung .....	5
2.1.1. Eckdaten und Verbreitung.....	8
2.2. Oxidativer Stress: Konzept und Hypothesen.....	9
2.2.1. Oxidative-Stress-Hypothese im Malaria-Parasiten <i>Plasmodium</i> .....	10
2.3. Heterologe Redoxenzyme .....	14
2.3.1. <i>Toxoplasma gondii</i> Katalase .....	14
2.3.2. <i>Rhodotorula gracilis</i> D-Aminosäureoxidase.....	16
2.4. Glutaredoxine und <i>Glutaredoxin-like proteins</i> .....	17
2.5. Protein-Fragment-Komplementationsassay (PCA) .....	20
2.5.1. Split-Dihydrofolatreduktase (Split-DHFR).....	22
2.5.2. Mitochondrialer Proteinimport in Opisthokonten und <i>Plasmodium</i> .....	23
2.5.3. <i>small Tims</i> im Intermembranraum des Mitochondriums.....	27
3. Zielsetzung.....	29
4. Material und Methoden .....	31
4.1. Material .....	31
4.1.1. Technische Geräte .....	31
4.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	32
4.1.3. Chemikalien .....	33
4.1.4. Verwendete Stammlösungen .....	36
4.1.5. Verwendete Programme .....	37
4.2. Sterilisation.....	37
4.3. Molekularbiologische Methoden in <i>Escherichia coli</i> .....	37

4.3.1. Restriktionsverdau von DNA.....	37
4.3.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	38
4.3.3. Ligation von Plasmid-DNA .....	38
4.3.4. Amplifikation von DNA-Konstrukten mittels <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	38
4.3.5. Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i> .....	39
4.3.6. Minipräparation von Plasmid-DNA.....	39
4.3.7. Midipräparation von Plasmid-DNA.....	40
4.4. Zellbiologische Verfahren und genetische Manipulation von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	40
4.4.1. Einfrieren von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	41
4.4.2. Auftauen von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	41
4.4.3. Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	41
4.4.4. Giemsa-Ausstriche .....	41
4.4.5. D-Sorbitol-Synchronisation von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	42
4.4.6. Sterilisierung von Plasmid-DNA für <i>Plasmodium falciparum</i> Transfektion .....	42
4.4.7. Transfektion von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	42
4.5. Phänotypisierung .....	43
4.5.1. Westernblotanalyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Kulturen.....	43
4.5.2. SDS-Gele zur Proteinanalyse.....	44
4.5.3. Westernblotanalyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Zelllysaten .....	45
4.5.4. Immunfluoreszenzanalyse von fixierten <i>Plasmodium falciparum</i> .....	46
4.5.5. Wachstumsanalyse von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	46
4.5.6. IC <sub>50</sub> -Messungen mit <i>Plasmodium falciparum</i> Kulturen .....	46
4.5.7. Glutathionbestimmung des Erythrozyten mit <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen .....	47
4.5.8. Selektion und Isolierung von genomischer DNA .....	48
4.5.9. WR-Selektion und Wachstumsanalyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Kulturen .....	49
5. Ergebnisse.....	51
5.1. STRESSistance.....	51
5.1.1. Klonierung der <i>Toxoplasma gondii</i> Katalase und <i>Rhodotorula gracilis</i> D-Aminosäureoxidase Konstrukte.....	51

5.1.2. Produktion der heterologen Redoxenzyme in <i>Plasmodium falciparum</i> .....	54
5.1.3. Lokalisation von heterologer <i>Toxoplasma gondii</i> Katalase und <i>Rhodotorula gracilis</i> D-Aminosäureoxidase in <i>Plasmodium falciparum</i> .....	57
5.1.4. Wachstumsanalyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen mit heterologen Redoxenzymen .....	58
5.1.5. IC <sub>50</sub> -Analysen von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen mit heterologen Redoxenzymen ...	67
5.1.6. Analyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen mit heterologer Chac1 oder DAAO mit STEVOR-Exportsignal.....	88
5.2. Untersuchung der <i>Glutaredoxin-like proteins</i> Glp1, Glp2 und Glp3 in <i>Plasmodium falciparum</i> .....	93
5.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay (PCA) mit Split-Dihydrofolatreduktase (Split-DHFR) .....	97
5.3.1. Vektorplanung .....	97
5.3.2. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Split-mDHFR-System .....	97
6. Diskussion.....	103
6.1. STRESSistance: Oxidative-Stress-Hypothese in <i>Plasmodium falciparum</i> und Wirkmechanismus von verschiedenen Antimalariamitteln.....	103
6.1.1. Produktion und Charakterisierung von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen mit kompartiment-spezifischer Erhöhung und Erniedrigung der Wasserstoffperoxidmenge .....	103
6.1.2. Analyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen mit kompartiment-spezifischer Erhöhung und Erniedrigung der Wasserstoffperoxidmenge auf ihr Wachstumsverhalten .....	104
6.1.3. Analyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen mit kompartiment-spezifischer Erhöhung und Erniedrigung der Wasserstoffperoxidmenge auf ihre Sensitivität gegenüber Antimalariamitteln .....	106
6.1.4. Analyse von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen mit verringerter Glutathionmengen oder erhöhter Wasserstoffperoxidmenge im Erythrozyten.....	111
6.2. Funktionale Charakterisierung von <i>PfΔglp1</i> , <i>PfΔglp2</i> und <i>PfΔglp1</i> Doppelknockout-Stämmen .....	113
6.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay mit Split-Dihydrofolatreduktase .....	115
7. Fazit und Ausblick.....	117

7.1. STRESSistance.....	117
7.2. Funktionale Charakterisierung von <i>PfΔglp1</i> , <i>PfΔglp2</i> und <i>PfΔglp1</i> Doppelknockout-Stämmen .....	121
7.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay mit Split-Dihydrofolatreduktase .....	121
8. Anhang.....	123
8.1. STRESSistance DNA-Sequenzen der synthetisierten Sequenzen .....	123
8.1.1. Sequenzen der genutzten Targetingsequenzen .....	123
8.1.2. IC <sub>50</sub> -Analyse der Stämme mit heterologer Katalase mit Menadion .....	129
8.1.3. Statistik zu den IC <sub>50</sub> -Analysen der Stämme mit heterologer Katalase und DAAO.....	130
8.1.4. Verdopplungszeitanalyse.....	147
8.2. Split-mDHFR-DNA-Sequenzen der synthetisierten Konstrukte.....	151
8.2.1. DNA-Sequenz MCS2-Linker-mDHFR <sup>N-term</sup> .....	151
8.2.2. DNA-Sequenz MCS1-Linker-mDHFR <sup>C-term</sup> -skip2A .....	151
8.2.3. DNA-Sequenz MCS1-Linker-mDHFR <sup>C-term-I115A</sup> skip2A.....	152
8.2.4. DNA-Sequenz MCS2-Tim9 .....	152
8.2.5. DNA-Sequenz MCS2-Tim13 .....	152
8.2.6. DNA-Sequenz MCS1-Tim10 .....	152
8.2.7. DNA-Sequenz MCS1-Tim8 .....	152
9. Literatur .....	153

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. STRESSistance

In dieser Arbeit wurde die Oxidative-Stress-Hypothese des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* kritisch hinterfragt und durch kompartiment-spezifische Produktion und Entfernung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) analysiert. Hierzu wurden erfolgreich Plasmodienstämme mit den heterologen Redoxenzymen D-Aminosäureoxidase (DAAO) von *Rhodoturula gracilis* oder der Katalase von *Toxoplasma gondii* in den Kompartimenten Cytosol (Cyto), Verdauungsvakuole (DV), mitochondriale Matrix (MitoM) und Intermembranraum des Mitochondriums (IMS) hergestellt. Die Produktion der Proteinkonstrukte wurde mittels Westernblotanalyse charakterisiert. Zur Analyse wurden Wachstumskurven der Stämme mit kompartiment-spezifischer Erniedrigung und Erhöhung von  $H_2O_2$  durchgeführt, bei denen ein Einfluss der  $H_2O_2$ -Menge auf das Wachstum des Parasiten beobachtet werden konnte. Die Verringerung der  $H_2O_2$ -Menge im Parasiten führte zu nur geringen Wachstumsdefekten, hingegen führte die Produktion von  $H_2O_2$  im Cytosol und in der mitochondrialen Matrix zu einem verringerten Wachstum verglichen mit der Negativkontrolle. Für den Stamm mit erhöhter  $H_2O_2$ -Menge in der Verdauungsvakuole wurde ein erhöhtes Wachstum beobachtet. Zusätzlich wurden  $IC_{50}$ -Werte der Substanzen Paraquat, Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau ermittelt. Paraquat wurde als Positivkontrolle genutzt und erzeugte sowohl in den Stämmen mit verringerten  $H_2O_2$ -Mengen als auch mit erhöhten  $H_2O_2$ -Mengen im Cytosol und der mitochondrialen Matrix eine signifikante Steigerung der Sensitivität im Vergleich zu den jeweiligen Negativkontrollen. Mit den anderen hier getesteten Substanzen wurden kaum Sensitivitätsunterschiede zur Negativkontrolle beobachtet. Aufgrund D-Aminosäure-unabhängiger Unterschiede in den  $IC_{50}$ -Werten der DAAO-Stämme kann die Hypothese eines bisher unbekanntem endogenen D-Aminosäurestoffwechsels im Parasiten aufgestellt werden. Zusätzlich können, durch die in dieser Arbeit erzeugten Ergebnisse, Aussagen über proteintoxische Effekte heterologer Proteine getroffen werden.

In this work, the oxidative stress hypothesis of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* was critically questioned and analyzed by compartment-specific production and removal of hydrogen peroxide. For this purpose, Plasmodium strains with the heterologous redox enzymes D-amino acid oxidase of *Rhodoturula gracilis* or the catalase of *Toxoplasma gondii* were successfully produced in the compartments cytosol, digestive vacuole, mitochondrial matrix and intermembrane space of the mitochondrion. The production of the protein constructs was characterized by western blot analysis. For further analysis, growth curves of the strains with compartment-specific decrease and increase of hydrogen peroxide were performed. An influence of the amount of hydrogen peroxide on the growth

of the parasite could be observed. Removal of  $H_2O_2$  in the parasite led to only minor growth defects, whereas the production of  $H_2O_2$  in the cytosol and in the mitochondrial matrix led to decreased growth compared to the negative control. A positive effect on growth was observed for the strain with increased  $H_2O_2$  amounts in the digestive vacuole. In addition,  $IC_{50}$  values of the substances paraquat, artesunate, chloroquine, atovaquone and methylene blue were determined. Paraquat was used as a positive control and produced a significant increase in sensitivity both in the strains with decreased  $H_2O_2$  amounts and with increased  $H_2O_2$  amounts in the cytosol and the mitochondrial matrix compared to the negative controls. With the other substances tested here, hardly any differences in sensitivity compared to the negative control could be observed. Due to the D-amino acid-independent differences in the  $IC_{50}$  values of the DAAO strains, the hypothesis of a previously unknown endogenous D-amino acid metabolism in the parasite can be made. In addition, the results obtained in this study can be used to draw conclusions about the proteotoxic effects of endogenously introduced proteins.

## 1.2. Untersuchung der *Glutaredoxin-like proteins* Glp1, Glp2 und Glp3 in *Plasmodium falciparum*

Zur Untersuchung der drei *Glutaredoxin-like proteins* (Glp) in *Plasmodium falciparum* wurden SLI-Konstrukte kodierend für *PFGLP1* oder *PFGLP2* kloniert. Die Gene für die Selektionsmarker wurden so gewählt, dass ein Knockout in bereits bestehenden 3D7  $\Delta glp2$ - und NF54  $\Delta glp3$ -Stämmen möglich ist. Nach erfolgreicher Klonierung wurden diese Konstrukte in allen Kombinationen in den 3D7  $\Delta glp2$ - oder NF54  $\Delta glp3$ -Stamm transfiziert und erfolgreich auf das Plasmid selektioniert. Nur bei der Selektion der Integration des potentiellen NF54  $\Delta glp3 glp1$ -Stamms wurden Parasiten beobachtet, jedoch konnte kein eindeutiger Doppelknockout-Stamm erzeugt werden. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Funktion von *PfGlp1* und *PfGlp3* durch das noch vorhandene *PfGlp2* oder andere Proteine kompensiert werden kann. Über die Essentialität der Kombination *PFGLP3/PFGLP2* und *PFGLP1/PFGLP2* kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, jedoch kann die nicht erfolgreiche Selektion ein Hinweis für eine essentielle Funktion sein. Um Aussagen über die generelle Funktion der drei Glps treffen zu können, müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

To study the three glutaredoxin-like proteins (Glp) in *Plasmodium falciparum*, SLI constructs encoding *PFGLP1* or *PFGLP2* were cloned and the genes for the selection markers were chosen to allow knockout in existing 3D7  $\Delta glp2$  and NF54  $\Delta glp3$  strains. After successful cloning, these constructs were transfected in all combinations into the 3D7  $\Delta glp2$  or NF54  $\Delta glp3$  strain and successfully selected for the plasmid. Parasites could only be observed when selecting the integration of the potential NF54  $\Delta glp3 glp1$  strain, but no pure double knockout strain could be generated. These results indicate that the function of *PfGlp1* and *PfGlp3* can be compensated by the remaining *PfGlp2* or other proteins. No clear statement can be made about the essentiality of the combination of *PFGLP3/PFGLP2* and *PFGLP1/PFGLP2*, but the lack of successful selection can be an indication of an essential function. In order to be able to make statements about the general function of the three Glps, further tests must be carried out.

### 1.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay mit Split-Dihydrofolatreduktase

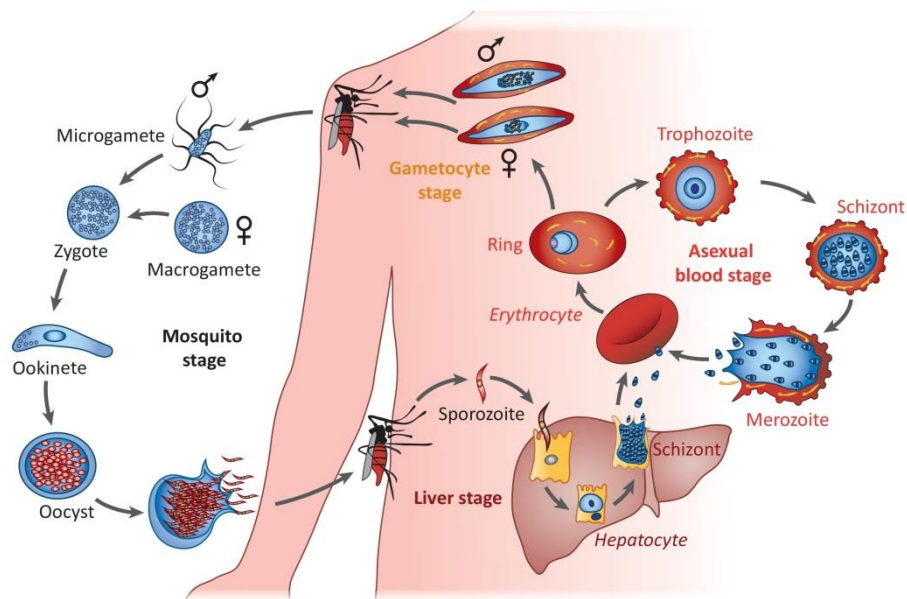
Der Protein-Fragment-Komplementationsassay mit der Split-Dihydrofolatreduktase (Split-DHFR) sollte in dieser Arbeit als Ein-Plasmid-System in *Plasmodium falciparum* etabliert und die Interaktion der mitochondrialen *small Tims* untersucht werden. Es wurden bereits in der Masterarbeit erfolgreich Konstrukte kodierend für die Split-DHFR-Fragmente fusioniert an die *small Tims* Tim8, Tim9, Tim10 oder Tim13 kloniert und erfolgreich in 3D7 WT-Parasiten transfiziert. In dieser Arbeit wurden WR-Selektionsversuche mit diesen Stämmen durchgeführt, um die Interaktion von Tim8/13 und Tim10/9 zu verifizieren. Diese konnten trotz Anpassung der Versuchsbedingungen nicht erfolgreich durchgeführt werden. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle einer bekannten Protein-Protein-Interaktion das Gen des GCN4 Leucinzippers aus *Saccharomyces cerevisiae* an die Gene der Split-DHFR-Fragmente kloniert und das Plasmid erfolgreich transfiziert. Auch mit diesen Stämmen konnte kein erfolgreicher WR-Selektionsversuch durchgeführt werden, weshalb zusammenfassend gesagt werden kann, dass es nicht möglich war das von Levray *et al.* bereits in *Plasmodium falciparum* als Cotransfektion etablierte Split-DHFR System als ein-Plasmid System zu etablieren.

The protein fragment complementation assay with the split-dihydrofolate reductase (split-DHFR) was to be established in this work as a single-plasmid system in *Plasmodium falciparum* and the interaction of the mitochondrial small Tims was to be investigated. Constructs coding for the split-DHFR fragments fused to the small Tims Tim8, Tim9, Tim10 or Tim13 were already successfully cloned in the master thesis and successfully transfected into 3D7 WT parasites. In this work, WR selection experiments were performed with these strains to verify the interaction of Tim8/13 and Tim10/9. This could not be done successfully despite adaptation of the experimental conditions. Additionally, as a positive control of a known protein-protein interaction, the gene of the GCN4 leucine zipper from *Saccharomyces cerevisiae* was cloned to the genes of the split-DHFR fragments and the plasmid was successfully transfected. It was also not possible to carry out a successful WR selection experiment with these strains. It can be summarized that it was not possible to establish the split-DHFR system already established as a cotransfection in *Plasmodium falciparum* by Levray *et al.* as a single-plasmid system.

## 2. Einleitung

### 2.1. *Plasmodium falciparum*: Lebenszyklus, Eckdaten und Verbreitung

Die menschliche Malaria wird durch Infektion mit Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht. Die relevantesten Arten sind *P. falciparum* und *P. vivax*.<sup>1,2</sup> Der Parasit hat einen komplexen Lebenszyklus im Hauptwirt, der weiblichen Anophelesmücke und dem Zwischenwirt, dem Menschen (Abbildung 1). In der Stechmücke findet die Gametogonie und die asexuelle Replikation durch Sporogonie statt.<sup>3</sup>



**Abbildung 1** Lebenszyklus des Parasiten *Plasmodium falciparum* im Hauptwirt, der weiblichen Anophelesmücke, und dem Zwischenwirt, dem Menschen. Quelle: Maier et al 2019<sup>4</sup>

Der Lebenszyklus im Menschen kann in unterschiedliche Stadien unterteilt werden. Während eines Blutmahls einer infizierten, weiblichen Anophelesmücke werden Sporozoiten zusammen mit gerinnungshemmendem Speichel in die Injektionsstelle injiziert. Die übertragenen Parasiten treten aktiv in den Blutstrom ein und befallen in der prä-erythrozytären Schizogonie Hepatozyten.<sup>3,5</sup> Die Invasion wird durch einen Co-Rezeptor vermittelt, welcher aus Thrombospondin-Domänen auf dem Circumsporozoiten-Protein und dem Thrombospondin-verwandeten Adhäsionsprotein besteht. Diese Domäne bindet spezifisch an Heparinsulfat-Proteoglykane auf Hepatozyten in der Nähe des sinusoidalen Endothels und den Kupffer-Zellen.<sup>6,7</sup> In den Hepatozyten durchläuft der Parasit innerhalb von neun bis 16 Tagen eine asexuelle Replikation, die exo-erythrozytäre Schizogonie. Diese beginnt mit dem Übergang vom Trophozoiten zum frühen Schizonten-Stadium, indem die DNA-Replikation und Kernteilung (Karyokinese) einsetzen. Das Mitochondrium und der Apikoplast wachsen und bilden ein großes, miteinander verbundenes Netzwerk.<sup>8,9</sup> Zudem kommt es zu starkem Membranwachstum, welches im Zytomer-Stadium zur Zytokinese von einem einzelnen Kern und wichtigen Organellen in

einer neu gebildeten Plasmamembran endet.<sup>8</sup> Diese gebildeten exo-erythrozytären Merozoiten im Inneren der Hepatozyten können, durch Freisetzung aus der Leber, Erythrozyten befallen.<sup>3,8</sup>

Die erythrozytäre Schizogonie beginnt durch Invasion der Erythrozyten durch Merozoiten.<sup>6</sup> Merozoiten erkennen die Erythrozytenmembran und knüpfen reversibel an diese an. Während dieser Prä-Invasion spielt das *Merozoite surface protein (PfMSP)* eine zentrale Rolle. Dieses Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-assoziierte Protein befindet sich als integrales Membranprotein auf der Membran des freien Merozoiten und führt zur Bindung an den Erythrozyten.<sup>3,10,11</sup> Es kommt zu einer starken Interaktion zwischen Merozoiten und dem Erythrozyten, was zu einer Actomyosin-vermittelten Deformation der Wirtszelle führt. In diesem Schritt sind Proteinliganden, wie die *erythrocyte binding-like proteins (EBLs)* und *Plasmodium falciparum reticulocyte-binding protein homologs (PfRh)*s involviert, welche spezifische Rezeptoren auf dem Erythrozyten binden. Zusätzlich kommt es durch eine Änderung der cytosolischen Calciumionenkonzentration zu Aktivierung der nachfolgenden Schritte der Invasion.<sup>11,12</sup> Es folgt eine Reorganisation des Merozoiten, so dass das apikale Ende an der Erythrozytenmembran anliegt, gefolgt von der irreversiblen Anheftung des Merozoiten durch die Bildung der *tight junction*. Anschließend kommt es zur Freisetzung des Rhoprien- und Mikronemen-Inhaltes, welche die parasitäre Vakuole bilden.<sup>3,11-14</sup> Der Parasit bewegt sich aktiv mithilfe des Actomyosin-Motors in den Erythrozyten. Durch die Fusion der Membran am hinteren Ende des Merozoiten, ist der Parasit in der parasitophoren Vakuole und dem Erythrozyten eingeschlossen.<sup>11,12,14</sup>

Im Erythrozyten findet eine asexuelle Teilung statt. Der Parasit entwickelt sich durch drei intrazelluläre Stadien. Hierbei ist er abhängig von der Nährstoffversorgung des Wirts, weshalb er durch Einfügen von Proteinen in die Wirtszellplasmamembran neue Permeationswege erzeugt.<sup>15-17</sup> Um den Proteinexport zu gewährleisten baut der Parasit eine sekretorische Maschinerie, die sogenannte *Maurer's cleft*, auf.<sup>17</sup> Eine dieser Modifikationen sind Ausbuchtungen der Membran, die sogenannten *knobs*, welche dazu dienen, den Parasiten am Endothel zu verankern. Das sogenannte *erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1)* ermöglicht das Anheften der infizierten Erythrozyten an die Gefäßwand.<sup>3,17-19</sup> Dies ermöglicht die Umgehung der Milzpassage. Um das Immunsystem des Wirts zu umgehen werden unterschiedliche Isoformen von *PfEMP1* auf der Oberfläche des Erythrozyten präsentiert.<sup>11</sup>

Der Parasit bildet für ca. 20 h das Ringstadium, gefolgt vom Trophozoitenstadium. Diese Phase zeichnet sich durch starke Proteinsynthese, sowie durch den Verdau des erythrozytären Hämoglobins aus.<sup>20</sup> Nährstoffe, Abfallprodukte und Medikamente benötigen entweder einen Membrantransport durch die drei Membranen, welche das Cytosol des Parasiten von der extrazellulären Umgebung abschirmen, oder kleine ungeladene Moleküle können direkt durch die Lipiddoppelmembranen diffundieren. Der *new permeability pathway (NPP)* ermöglicht einen gesteigerten Nährstoffinflux in infizierte Erythrozyten.<sup>21</sup>

Durch die Insertion von zum Beispiel *plasmodial surface anion channel* (PSAC) in die Erythrozytenmembran können im Trophozoitenstadium ausreichend Aminosäuren, Nukleoside und Zucker aufgenommen werden.<sup>21-23</sup> Nach der Aufnahme in den Erythrozyten müssen die Nährstoffe anschließend durch weitere Transporter wie zum Beispiel dem *Plasmodium falciparum exported protein 2* (PfExp2) durch die parasitophore Vakuole transportiert werden. Dieser hat eine duale Funktion und kann neben dem Export von Parasitenproteinen in den Erythrozyten auch als Kanal durch die Membran der parasitophoren Vakuole dienen.<sup>21,24</sup> Zum Schluss wird der Nährstofftransport durch die Parasitenplasmamembran (PPM) durch spezifische Transporter, zum Beispiel den *Plasmodium falciparum apicomplexan amino acid transporter* oder den *Plasmodium falciparum hexose transporter* (HT1), vermittelt.<sup>21,25,26</sup> Die Aufnahme von Hämoglobin aus dem Cytosol des Erythrozyten erfolgt direkt über Endozytose am Cytostom, einer Einstülpung der Doppelmembran.<sup>21,27</sup> Das dadurch aufgenommene *host cell cytosol* (HCC) wird zum spezialisierten Lysozym, der Verdauungsvakuole, transportiert und dort abgebaut. Während dieses Prozesses entstehen, neben dem freien Eisen-(II)-Häm, welches zu nicht-toxischem, inertem Hämozoin umgewandelt wird, auch Aminosäuren, welche von dem Parasiten als Bausteine genutzt werden.<sup>3,6,20,21,27,28</sup> Zudem liefern die Endozytose und der Abbau von erythrozytären Bestandteilen Platz, welcher für das Wachstum des Parasiten im Erythrozyten notwendig ist.<sup>21,27,29,30</sup>

Im späten Trophozoiten kommt es zur DNA-Synthese und die erste Kernteilung leitet das Schizontenstadium ein. Dieses charakterisiert sich durch bis zu 20 nukleare Teilungen ohne Zytokinese und Vervielfältigung des Mitochondriums und des Apikoplasten. Zudem kommt es zur vermehrten Anhäufung von Lipidvakuolen, welche später zum Aufbau von Membranen genutzt werden.<sup>31</sup> Nach der Zytokinese lysieren die Erythrozyten und Merozoiten werden freigesetzt, welche weitere nicht-infizierte Erythrozyten befallen können. Innerhalb der Erythrozyten ist der Parasit vor dem Immunsystem des Wirtes geschützt, weshalb eine körperliche Reaktion in Form von erhöhter Körpertemperatur nur bei Hämozoinfreisetzung und Anwesenheit von freien Merozoiten beobachtet wird. Der intraerythrozytäre Zyklus dauert bei *Plasmodium falciparum* 48 h.<sup>3,6</sup>

Ein kleiner Teil der Merozoiten in Erythrozyten differenziert zu Gameozyten, welche essentiell für die Übertragung in die weibliche Anophelesmücke sind.<sup>6</sup> Diese durchlaufen keine Schizogonie und können während einer Blutmahlzeit einer weiblichen Anophelesmücke aufgenommen werden. Gametozyten entwickeln sich im Mitteldarm der Anophelesmücke zu Gameten, welche verschmelzen und Zygoten bilden. Die anschließend entstehenden Ookineten können die Wand des Mitteldarms durchdringen und sich an der Innenseite zu Oozyten entwickeln. Diese durchlaufen die Sporogonie. Die dabei entstehenden Sporozoiten werden in die Speicheldrüse transportiert und können auf den menschlichen Zwischenwirt übertragen werden.<sup>3</sup>

### 2.1.1. Eckdaten und Verbreitung

Global gab es in 2023 laut WHO schätzungsweise 263 Millionen Malariafälle in 85 Malaria-endemischen Ländern und Regionen, was einem Anstieg von 11 Millionen Fällen gegenüber 2022 entspricht. 2023 lag die Malariainzidenz bei 60 Fällen pro 1000 gefährdeten Einwohnern, was einen geringen Anstieg gegenüber 2022 bedeutet. Die höchste Belastung mit insgesamt 94 % der Malariafälle gab es in Afrika. Die meisten Fälle wurden mit 26 % in Nigeria und mit 13 % in der Demokratischen Republik Kongo festgestellt.<sup>32</sup> Im Vergleich zu 576 000 Malariatoten im Jahr 2019 stieg diese Zahl im Jahr 2020 um 10 % auf 631 000, mit seit 2015 jährlich 76 % Kindern unter 5 Jahren.<sup>33</sup> Die Anzahl an Todesfällen sank im Jahr 2023 wieder auf 597 000. Die Mortalitätsrate (Tote pro 100 000 gefährdeter Einwohner) von Malaria sank im Jahr 2023 im Vergleich zum Vorjahr gering auf 13,7. Laut WHO konnten im Zeitraum von 2000 – 2023 schätzungsweise 2,2 Milliarden Malariafälle und 12,7 Millionen Todesfälle verhindert werden. Die Eliminierung und Eingrenzung von Malaria haben in vielen Ländern an Schwung gewonnen. Die Zahl Malaria-endemischer Länder sank von 85 in 2022 auf 83 im Jahr 2023. In 2023 wurden Länder wie Aserbaidschan, Belize und Kap Verde als malariafrei zertifiziert. 2024 hat ebenfalls Ägypten den Status malariafrei erlangt.<sup>32</sup>

Dieser Entwicklung zugrunde liegt die erfolgreiche Auslieferung von 2,9 Milliarden insektizid-behandelten Stechmückennetzen (*insecticide-treated mosquito nets* ITNs) im Zeitraum von 2004 bis 2022. Hierfür wurden z.B. Pyrethroid-Chlorofenapyr und Pyrethroid-Pyriproxyfen Netze verwendet. Ersteres führt durch die Substanzen Pyrethroid und Pyrrol zu einer Tötung der Stechmücke und zweiteres bewirkt eine Störung des Wachstums und der Fortpflanzung der Stechmücke.<sup>34</sup> Zudem wurden zwischen 2010 und 2023 weltweit mehr als 4,5 Milliarden Behandlungen mit einer Artemisinin-basierten Kombinationstherapie durchgeführt.<sup>32</sup> Neben dieser Therapie empfiehlt die WHO die Impfung mit den Malariaimpfstoffen RTS,S/AS01 und R21. RTS,S wurde bereits in 6 Millionen Dosen ausgeliefert und führte zu einem Rückgang der Gesamttodesfälle im frühen Kindesalter um 13 % und eine Reduktion von schweren Malariafällen in den Anwendungsgebieten Ghana, Kenia und Malawi.<sup>32</sup> Dieser Wirkstoff ist ein rekombinantes Protein, welches auf das Circumsporoziten-Protein von *Plasmodium falciparum* abzielt. Dieses Protein liegt im prä-erythrozytären Stadium vor. Ein Teil der Circumsporoziten-Sequenz ist mit freiem Hepatitis-B-Oberflächenantigen fusioniert, wird koexprimiert und mit Adjuvans AS01 formuliert.<sup>33,35</sup> Zusätzlich wurde im Oktober 2023 der Impfstoff R21 als weiterer sicherer und effektiver Impfstoff von der WHO empfohlen. Dieses Impfstoff-Immunogen ist sehr ähnlich zu dem bereits genutzten RTS,S Wirkstoff, jedoch fehlen 80 % des Hepatitis-B-Oberflächenantigens. Dies führt zu einer erhöhten Dichte an Circumsporoziten-Protein auf der Partikeloberfläche, was zu einer hohen Menge an malariaspezifischen Anti-Asn-Ala-Asn-Pro (NANP)-Antikörpern führt.<sup>36</sup>

## 2.2. Oxidativer Stress: Konzept und Hypothesen

“Oxidation-reduction (redox) reactions are central to the existence of life. Reactive species of oxygen, nitrogen and sulfur mediate redox control of a wide range of essential cellular processes.”<sup>37</sup> Die Reduktion und Oxidation von schwefel-haltigen Aminosäuren wie Cystein spielt eine zentrale Rolle in der Redoxregulation in grundlegenden biologischen Prozessen. Der Redoxmetabolismus ist ein kritischer Unterpunkt des zellulären Metabolismus und ist ein fein reguliertes Netzwerk aus Redoxreaktionen, oxidativen posttranslationalen Modifikationen und deren Auswirkungen.<sup>38</sup> Unter Redoxhomöostase bezeichnet man das Gleichgewicht und die Aufrechterhaltung des Redoxstatus innerhalb der Zelle. Der bisher viel genutzte Begriff des „oxidativen Stresses“ beschreibt die Störung von Redoxsignalwegen und die Schädigung von Molekülen aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen sogenannten „Oxidantien“ und „Antioxidantien“.<sup>37,39</sup> In der Biologie werden viele Enzyme oder *small molecules* als „Antioxidantien“ beschrieben. Diese reagieren entweder mit einzelnen *reactive oxygen species* (ROS), um eine Schädigung zu verringern oder können auch Teil der Redox-Signalübertragung sein.<sup>40</sup> Viele dieser Antioxidantien sind enzymatische Systeme wie Superoxiddismutasen (SOD) oder Peroxidasen mit spezifischen Reaktivitäten gegenüber verschiedenen „ROS“, welche jedoch selten benannt werden.<sup>40,41</sup> Ebenso sollte statt dem generalisierten Begriff „oxidative damage“ die oxidative Modifikation oder der chemische Prozess aus dem diese Schädigung hervorgeht genauer benannt werden und auch der Einfluss von Reparations- und Abwehrmechanismen sollte für die Interpretation herangezogen werden.<sup>40</sup>

Der inflationär genutzte Begriff ROS soll verschiedene sauerstoffhaltige Moleküle beschreiben, die während des Metabolismus als Nebenprodukt entstehen, wobei davon ausgegangen wurde, dass sie ausschließlich toxische Effekte hervorrufen.<sup>38</sup> Dieser Sammelbegriff umfasst eine große Bandbreite an Molekülen mit unterschiedlichsten Eigenschaften, Reaktivitäten und Interaktionen, die oft nicht weiter spezifiziert werden.<sup>40</sup> Durchaus kann eine erhöhte Konzentration von reaktiven Molekülen zu wahllosen und irreversiblen Oxidationen von Biomolekülen wie DNA, Lipiden und Proteinen führen und diese dauerhaft schädigen. Jedoch spielen spezifische „ROS“-Moleküle, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), eine differenzierte und essentielle Rolle in der Regulierung der Zellfunktion.<sup>38,42,43</sup> Hierbei sind physiologische Oxidationsmittel wie  $H_2O_2$  das Signalmolekül um Enzymaktivitäten und -funktionen zu kontrollieren und zu modifizieren.<sup>37,38,44</sup> Für zelluläre Antworten auf redox-Stress werden redox-sensitive Proteine benötigt, die durch Modifikation durch „Oxidantien“ ihre Funktion ändern.<sup>37,42</sup> Eine wichtige Gruppe dieser redox-regulierten Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die bei erhöhter physiologischer Oxidation aktiviert werden.<sup>37,45,46</sup> In diesem Zusammenhang sind die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor erythroid 2-released factor* (Nrf2) und sein Inhibitor *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) für das Erkennen von physiologischen Änderungen des Oxidationsstatus zu nennen.<sup>37,47</sup> Keap1 ist ein Sensor für Oxidationsmittel und

Elektrophile. Dieser bindet Nrf2, welches über eine Cullin 3-based Ubiquitin Ligase bei niedrigem Oxidationsstatus ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut wird.<sup>37,38,48</sup> Bei erhöhtem Oxidationsstatus kommt es zur Oxidation spezifischer Cystein-Reste und Konformationsänderungen in Keap1, wodurch Nrf2 freigesetzt wird und in den Zellkern diffundiert. Dies hat die Expression von Genen zur Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase und der Produktion von Cofaktoren für Redox-Reaktionen, wie GSH und NADPH, zur Folge.<sup>37,38,49</sup>

Zwei physiologisch relevante Moleküle die unter den Begriff ROS fallen sind das Superoxidanionradikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) und  $H_2O_2$ , welches sequenziell aus  $O_2^{\cdot-}$  produziert werden kann.<sup>38</sup>  $O_2^{\cdot-}$  wird zum Beispiel von spezifischen Enzymen wie NADPH-Oxidasen (NOXs)<sup>38,50</sup> oder bei der Einelektronen-Reduktion von Sauerstoff am Komplex I und III der mitochondrialen Elektronentransportkette produziert.<sup>38,51</sup> Die intrazelluläre Konzentration von  $O_2^{\cdot-}$  ist gering, da es entweder spontan oder enzymvermittelt durch SODs zur Disproportionierung zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  kommt.<sup>38,52</sup> Eine direkte Produktion von  $H_2O_2$  kann durch Flavoenzymen wie die NADPH-Oxidase NOX4<sup>53</sup>, Monoaminoxidasen oder Xanthinoxidasen<sup>54</sup> erfolgen. Die Disproportionierung von  $H_2O_2$  wird zum Beispiel durch Häm-haltige Katalasen, Glutathionperoxidase<sup>55</sup> und Thiol-abhängige Peroxiredoxine<sup>56</sup> katalysiert. Für die anschließende Reduktion der oxidierten Enzymthiole werden niedermolekulare Thiole wie Glutathion und Enzyme wie Glutathionreduktase, Thioredoxin und Thioredoxinreduktase benötigt. Zudem gibt es weitere intrazelluläre Quellen von  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$ . Hierzu zählen zum Beispiel das endoplasmatische Retikulum (ER), Mitochondrien, Peroxisomen und der Nukleus. Während der Proteinfaltung im ER werden intramolekulare Disulfidbrücken gebildet, welches in der Produktion von  $H_2O_2$  resultieren kann.<sup>38,57</sup> In den Peroxisomen entsteht  $H_2O_2$  beispielsweise als Nebenprodukt der Oxidasen, wie *fatty acyl-coenzyme A oxidase*, wird jedoch direkt durch eine Katalase wieder abgebaut.<sup>38,58</sup>

### 2.2.1. Oxidative-Stress-Hypothese im Malaria-Parasiten *Plasmodium*

Die Blutstadien des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* entwickeln sich in den Erythrozyten des menschlichen Wirts. Hier ist angeblich die Detoxifikation von „ROS“ eine große Herausforderung für den Parasiten.<sup>59</sup> Diese Umgebung ist aufgrund der vergleichsweise hohen Sauerstoffkonzentration und des Hämoglobins pro-oxidativ.<sup>60</sup> Aufgrund seines schnellen und effektiven Wachstums benötigt der Parasit eine hohe metabolische Rate, weshalb viele toxische, redox-aktive Nebenprodukte anfallen sollen.<sup>59,60</sup> Außerdem baut der Parasit während seines Lebenszyklus Hämoglobin in der Verdauungsvakuole ab, um die Aminosäuren des Hämoglobins zu nutzen, was in einer Freisetzung von toxischem Häm und der Produktion von „ROS“ resultieren soll.<sup>60,61</sup> Zudem sollen neben dem metabolischen „oxidativen Stress“ auch die vom Immunsystem des Wirts produzierten „ROS“ zur oxidativen Gesamtbelastung des Parasiten beitragen.<sup>59</sup> Durch diese Faktoren wird davon ausgegangen, dass der Parasit einer hohen Menge an oxidativen Faktoren ausgesetzt wird, die durch ein gutes

antioxidatives System im Gleichgewicht gehalten werden müssen. Hierfür hat der Parasit ein System aus zahlreichen Thioredoxin- und Glutathion-abhängigen Enzymen sowie Superoxiddismutasen, die das Redoxmilieu aufrechterhalten.<sup>59-63</sup> Interessanterweise besitzt *Plasmodium* jedoch keine Katalase oder klassische Glutathionperoxidasen.<sup>59,61,64</sup>

Die Datenlage zu differenzierten Auswirkungen von spezifischen „ROS“ ist in der Malariaforschung unpräzise und undurchsichtig. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann aufgrund seiner Ladungsfreiheit durch Membranen in Zellen diffundieren. Durch die Anwesenheit von Katalasen, Peroxiredoxinen und Glutathionperoxidasen im Erythrozyten wird die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration konstant im picomolaren Bereich gehalten.<sup>65</sup> Durch diese Eigenschaft lässt sich der extrem hohe IC<sub>50</sub>-Wert von 78 ± 10 mM bei *Plasmodium falciparum* 3D7 WT Parasiten unter exogener Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erklären. Verglichen dazu ist der IC<sub>50</sub>-Wert des Elektrophils *tert*-Butylhydroperoxid (tBOOH) deutlich geringer, bei 81 ± 6 µM, da es durch die Katalase im Erythrozyten nicht abgebaut werden kann.<sup>66</sup> Ebenso das Elektrophil Diamid, welches zu unspezifischen Disulfidbildungen führt, hat einen IC<sub>50</sub>-Wert im vergleichbaren micromolaren Bereich (90 ± 10 µM).<sup>66</sup> Zudem wurde gezeigt, dass einige Peroxiredoxine (Prx), das cytosolische TPx-1 und 1-Cys-Prx, im Blutstadium des Parasiten entbehrlich sind.<sup>67-69</sup> Ebenso ist das *antioxidant protein* (PfaOP) der Prx5 Subfamilie, welches dual im Apikoplasten und im Cytosol lokalisiert ist,<sup>70</sup> nicht essentiell für das Überleben des Parasiten.<sup>71</sup>

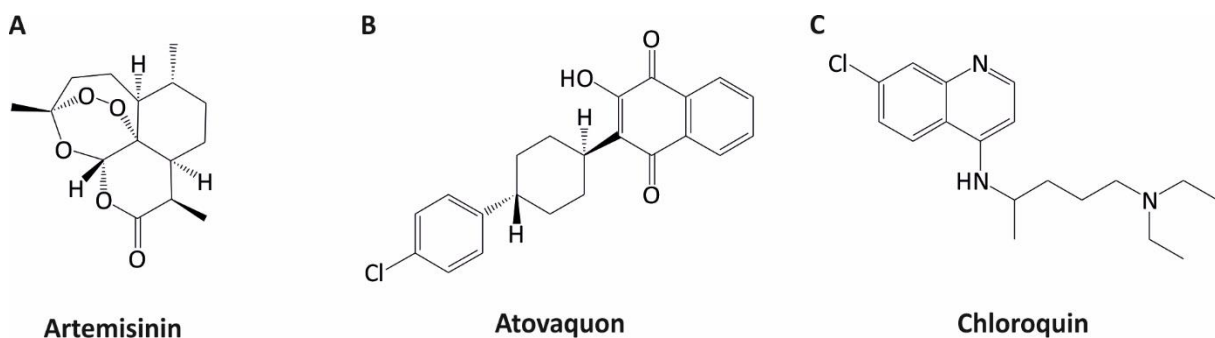
#### 2.2.1.1. Einfluss und Wirkweise verschiedener Antimalariamittel auf *Plasmodium falciparum*

Allgemein wird postuliert, dass „oxidativer Stress“ eine zentrale Rolle in der Funktionsweise einiger Antimalariamittel spielt.<sup>72-74</sup>

Artemisinin (Abbildung 2 A) ist ein Sesquiterpen-Lakton, das aus den Blättern des Beifuß *Artemisia annua* extrahiert werden kann.<sup>75</sup> Es enthält eine Endoperoxidbrücke, welche essentiell für die Aktivität des Antimalariamittels ist.<sup>76</sup> Im Gegensatz zu den Antimalariamitteln Chloroquin oder Atovaquon, welche spezifische Ziele inhibieren, wurde berichtet, dass Artemisinin eine weite Bandbreite an Proteinen bindet und eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie die Hämoglobin-Endozytose, die Glykolyse und die Proteinsynthese und den –abbau, beeinflussen soll.<sup>77-81</sup> Diese Aktivität beruht auf der reduktiven Spaltung der Endoperoxidbrücke durch Häm<sup>2+</sup>, welches während dem Abbau von Hämoglobin freigesetzt wird. Das resultierende Radikal kann mit Proteinen und Lipiden reagieren, was zum Zelltod führen kann.<sup>72,78,80,81</sup>

Die ersten verzögerte *parasite clearance* nach Artemisinin-Behandlung wurde in West-Kambodscha beobachtet.<sup>81-83</sup> Die Resistenz ist durch die *parasite clearance half-life* (PCT<sub>1/2</sub>) von über 5 h definiert.<sup>81,84</sup> Die erste Resistenz wurde als Verlängerung der Zeit bis zur vollständigen Beseitigung der Parasiten bei identischer Medikamentendosis erkannt.<sup>85</sup> Diese Resistenz beruht auf dem Verlust der

Wirksamkeit von Artemisinin auf Parasiten im frühen Ringstadium. Die weiteren asexuellen Blutstadien zeigen keine Veränderung der Empfindlichkeit.<sup>81,86</sup> Die reduzierte Suszeptibilität geht mit einer Mutation im *PFKELCH13*-Gen einher, welches für ein Kelch Domänen-enhaltendes Protein auf Chromosom 13 kodiert. *PfKelch13* ist eines der 5 % konserviertesten Proteine in *Plasmodium* und beinhaltet eine *N*-terminale Apikomplexa-spezifische Region gefolgt von einer GGG-Domäne, einer BTB-Domäne und einer 6-blättrigen Kelch  $\beta$ -Propellerdomäne.<sup>87,88</sup> Die meisten Mutationen, welche zu einer veränderten *parasite clearance* führen, befinden sich in der  $\beta$ -Propellerdomäne. Die C580Y-Mutation ist am meisten verbreitet.<sup>88-90</sup> Auch die Mutationen R539T und I543T führen zu einem gesteigertem Überleben der Ringstadien, haben jedoch ein geringeres Vorkommen.<sup>88,91</sup> *N*-terminal GFP-getaggtetes Wildtyp- und C580Y-*PfKelch13*-Protein ist in denselben punktierten Strukturen in der räumlichen Nähe der Verdauungsvakuole<sup>92,93</sup> und in ringförmigen Strukturen nahe der Plasmamembran lokalisiert.<sup>94</sup> Es wird eine Beteiligung von *PfKelch13* in der Endozytose vorhergesagt, was zu einer verringerten Protein-Abundanz, Hämoglobin-Aufnahme und redox-abhängigen Aktivierung von Artemisinin in *PfKelch13*-Mutanten führen könnte.<sup>93,94</sup> *PfKelch13* hat hohe Ähnlichkeit zu Keap1,<sup>87,90</sup> welches in Säugetieren ein wichtiger Redox- und Elektrophil-Sensor ist und mittels seiner  $\beta$ -Propellerdomäne mit dem Transkriptionsfaktor Nrf2 interagiert.<sup>45,88,95</sup> Jedoch ist bisher kein Nrf2-Homolog in *Plasmodium falciparum* bekannt.<sup>90</sup>



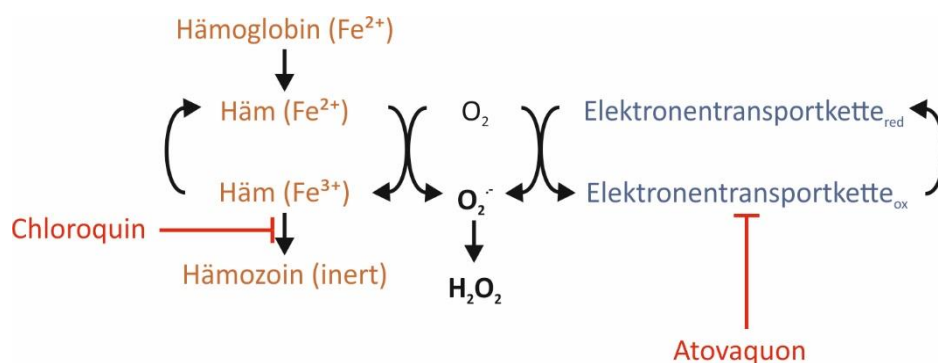
**Abbildung 2** Strukturen der Antimalariamittel Artemisinin (A), Atovaquon (B) und Chloroquin (C).

Quinolin-Antimalariamittel, wie z.B. Chloroquin (Abbildung 2 C), vollziehen ihre Funktion, indem sie den Parasiten-spezifischen Abbau von Hämoglobin hemmen (Abbildung 3). Nach Optimierung chemischer Synthesen und Durchführung toxikologischer Studien wurde Chloroquin aus einem Quinin-haltigen Alkaloid der Rinde des Chinarindenbaums derivatisiert.<sup>96</sup> Chloroquin akkumuliert als schwache Base in der Verdauungsvakuole und inhibiert die Hämozoinbildung durch Bindung an der am schnellsten wachsenden Kristallfläche,<sup>59,73,97-100</sup> wodurch es zum Anstieg von intrazellulärem freien Häm und zur Verminderung der Hämozoin-Menge kommt.<sup>81,101,102</sup> Die starke Bindung dieser Antimalariamittel an Eisenporphyrin, gepaart mit einem pH-Trapping-Effekt, führt zu einer über 1000-fachen Akkumulation in der Verdauungsvakuole.<sup>103</sup> Freies Eisen-(II)-Häm kann durch  $O_2$  zum zytotoxischen Eisen-(III)-Häm autoxydiert werden, welches durch die Fenton-Reaktion mit  $H_2O_2$

Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) erzeugen kann, was für Lipidperoxidation verantwortlich sein kann.<sup>81,104</sup> Außerdem kommt es durch den sauren pH-Wert und die hohen Sauerstoffmengen in der Verdauungsvakuole über die Fenton Reaktion zur Bildung von  $\text{OH}^\cdot$  und  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .<sup>105</sup> Hier wurde lange postuliert, dass „ROS“, welche durch die inhibierte Detoxifizierung entstehen, am Wirkmechanismus von Chloroquin beteiligt sind.<sup>59,106</sup>

Chloroquin-resistente Stämme weisen eine reduzierte Akkumulation von Chloroquin in der Verdauungsvakuole auf.<sup>107</sup> Nach Genomanalysen wurden in Chloroquin-resistenten Stämmen Mutationen im *Plasmodium falciparum* Chloroquin resistance transporter Gen (*PF CRT*) gefunden.<sup>108</sup> *PfCrt* ist ein 49 kDa großes, in der Membran der Verdauungsvakuole lokalisiertes Medikament/Metabolit-Transporterprotein, welches die wichtige Rolle des Transporters in der Regulation des Chloroquin-Effluxes unterstützt.<sup>108-111</sup> Über die physiologische Funktion des Transporters ist bekannt, dass er im Peptidtransport aus der Verdauungsvakuole des Parasiten in das Cytosol beteiligt ist.<sup>112</sup>

Ein wichtiger zusätzlicher Faktor der Resistenz von Häm-abhängigen Antimalariamitteln ist der in der Verdauungsvakuole lokalisierte *multidrug resistance 1 transporter* (*PfMDR1*),<sup>81,113,114</sup> dessen Bindedomäne im Cytosol lokalisiert ist.<sup>115</sup> Durch Reduktion der *PfMDR1*-Kopien steigt die Suszeptibilität gegenüber z.B. Mefloquin, Quininen oder auch Artemisinin-Derivaten an.<sup>115</sup> Mutationen in *PfMDR1*, wie zum Beispiel N86Y<sup>116</sup>, hemmen vermutlich den Transport von Malariamitteln aus dem Cytosol in die Verdauungsvakuole, wodurch die Konzentration von z.B. Chloroquin in der Verdauungsvakuole verringert wird. Unterstützt wird dies durch den Fakt, dass durch die N86Y-Mutation die Empfindlichkeit gegenüber Mefloquin und Lumefantrin, welche Zielmoleküle außerhalb der Verdauungsvakuole haben, größer wird, wenn der Transport in die Verdauungsvakuole reduziert ist.<sup>81,116,117</sup>



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der potentiellen Produktion von Superoxidanionradikalen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) im Metabolismus von *Plasmodium*. Links: Abbau vom Hämoglobin zu reaktivem, freiem Häm mit anschließender Detoxifizierung zu Hämoxin in der Verdauungsvakuole. Rechts: Mögliche Produktion von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  und dementsprechend  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch den Elektronentransport in der Atmungskette. Die Angriffspunkte der Antimalariamittel Chloroquin und Atovaquon sind in rot angedeutet.

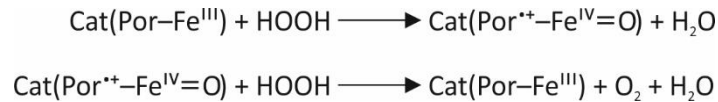
Atovaquon (Abbildung 2 B) wird als prophylaktisches Antimalariamittel oder zur Behandlung bei schwachen Formen der Malariaerkrankung eingesetzt.<sup>118,119</sup> Atovaquon inhibiert den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex der mitochondrialen Atmungskette und beeinflusst dadurch die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese im Mitochondrium (Abbildung 3).<sup>118,120</sup> Der  $bc_1$ -Komplex ist ein dimerer Proteinkomplex aus zwei identischen Monomeren, welcher aus mindestens drei Proteinuntereinheiten besteht, Cytochrom  $b$ , dem Rieske Eisen-Schwefel Protein und Cytochrom  $c_1$ .<sup>118,120</sup> Der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex überträgt Protonen über den Q-Zyklus. Zwei Ubiquinol ( $QH_2$ ) Moleküle binden in der  $Q_o$ -Seite, welche den  $Fe_2S_2$ -Cluster trägt. Es werden zwei Elektronen und zwei Protonen auf den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex übertragen. Die zwei Elektronen wandern durch das Cytochrom  $c_1$ -Protein und binden an Cytochrom  $c$  im Intermembranraum,<sup>121</sup> während zwei weitere Elektronen an der  $Q_i$ -Seite Ubiquinon (Q) zu  $QH_2$  reduzieren. Hierfür werden zusätzlich zwei Protonen aus der mitochondrialen Matrix benötigt.<sup>118,122,123</sup> Die Hauptaufgabe der Mitochondrien in den Blutstadien von *Plasmodium* ist nicht, wie in den meisten Organismen, die Durchführung des Citratzyklus als zentrales Element des Kohlenstoffmetabolismus, sondern die Herstellung von Orotat für die Pyrimidinsynthese.<sup>124-128</sup> Hierfür wird eine funktionelle Ubiquinon-abhängige Dihydroorotatdehydrogenase (DHODH) benötigt, welche Q zu  $QH_2$  reduziert.<sup>127,128</sup> Somit wird durch die Inhibition des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes durch Atovaquon die Synthese von Pyrimidinbasen verringert, welche für die DNA-Produktion notwendig ist. Es wird vorhergesagt, dass durch die Wirkweise von Atovaquon „ROS“ und „oxidativer Stress“ erzeugt wird.<sup>74,129</sup>

## 2.3. Heterologe Redoxenzyme

### 2.3.1. *Toxoplasma gondii* Katalase

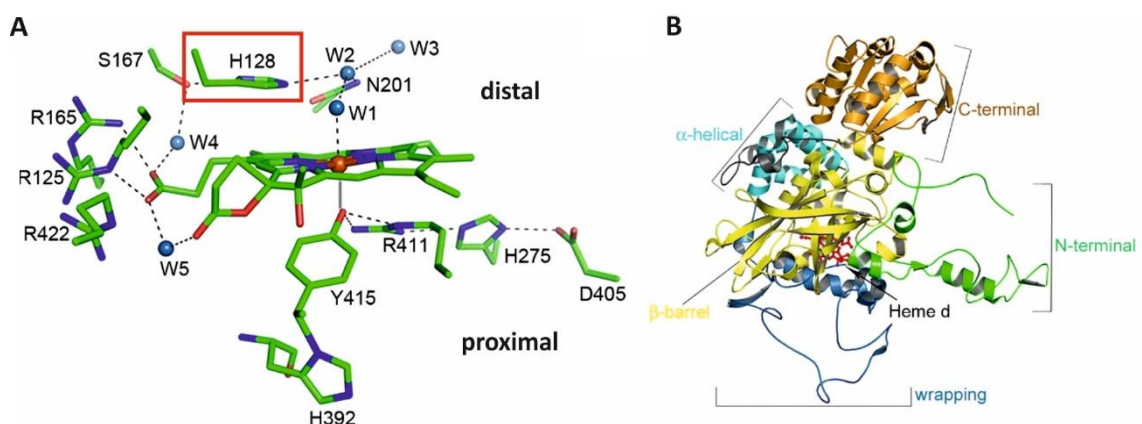
Katalase (EC 1.11.1.6)<sup>130</sup> ist eine zentrale Komponente des enzymatischen Detoxifizierungssystems und verhindert durch die Detoxifizierung von  $H_2O_2$  die Bildung von  $OH^\cdot$ . Dem Enzym vorgeschaltet ist oftmals eine SOD, welche  $O_2^{\cdot -}$  zu  $H_2O_2$  umsetzt. Zusätzlich besitzen die meisten aeroben Zellen zur Katalase Peroxiredoxine und ggf. Glutathionperoxidasen.<sup>131-134</sup>

Die Funktion der Häm-abhängigen Katalase, die Detoxifizierung von  $H_2O_2$ , verläuft über einen zweistufigen Katalysezyklus (Schema 1). Im ersten Schritt wird das Häm ( $Por-Fe^{III}$ ) von  $H_2O_2$  zur Oxoferryl-Spezies oxidiert ( $Por^+-Fe^{IV}=O$ ). Hierbei werden ein Elektron von Eisen und eins vom Porphyrinring entfernt und es entsteht ein Molekül Wasser. Im zweiten Schritt reduziert ein weiteres Molekül  $H_2O_2$  die Oxoferryl-Spezies unter Freisetzung von  $O_2$  und Wasser, wodurch der Grundzustand wieder hergestellt wird.<sup>135,136</sup>



**Schema 1** Schematische Darstellung der zweistufigen Reaktion im katalytischen Zentrum der Katalase. Por: Porphyrin;  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ : Ferryl;  $\text{Por}^{\text{•+}}$ : Porphyrin  $\pi$ -Kationradikal.<sup>136</sup>

Häm-abhängige mono-funktionale Katalasen können in drei Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe 1 beinhaltet Katalasen mit mehr als ca. 500 Aminosäureresten pro Untereinheit, welche meistens pflanzlichen Ursprungs sind. Gruppe 2 Katalasen sind Enzyme mit sehr großen Untereinheiten von ca. 750 Aminosäureresten pro Untereinheit. Diese Gruppe kommt hauptsächlich in Bakterien und Pilzen, aber vereinzelt auch in Archaea, vor. Die letzte Gruppe 3, welche in Bakterien, Archaea, Pilzen und vielen Eukaryoten vorkommt, beinhaltet kleine Untereinheiten mit ca. 500 Aminosäureresten.<sup>135</sup> Alle Katalasen dieser drei Untergruppen haben eine Einheit aus ca. 460 Aminosäuren, welche sich durch die charakteristische Tertiärstruktur auszeichnet und ausschließlich in häm-abhängigen Katalasen zu finden ist (Abbildung 4 B). Diese spezifische Faltung besteht aus einer  $\beta$ -Fass und einer  $\alpha$ -helikalen Domäne, welche mit einem langen sogenannten *wrapping loop* verbunden sind. Dieser Loop den Tyrosin-Rest (Y415), der als proximaler Ligand von Häm dient. Der  $\beta$ -Fass Domäne geht ein *N*-terminaler Arm voraus und ist *C*-terminal gefolgt von dem *wrapping* Loop und der globulären  $\alpha$ -helikalen Domäne. Die  $\beta$ -Fass Domäne kann in zwei Unterabschnitte unterteilt werden. Die erste Hälfte ( $\beta 1 - \beta 4$ ) beinhaltet die meisten Reste und definiert die Häm-Seite. Die zweite Hälfte ( $\beta 5 - \beta 8$ ) bildet die NADP(H)-Bindungstasche. Die Quartärstruktur der Katalase besteht aus kompakten Tetrameren mit D2-Molekülsymmetrie.<sup>135</sup>



**Abbildung 4** Schematische Darstellung der Katalase von *Escherichia coli*. (A) Darstellung des aktiven Zentrums der Häm-abhängigen Katalase. Die für die katalytische Aktivität essentiellen Reste H128, N201 und Y415 sind angedeutet. Als distaler Ligand dient H128 und Y415 auf der proximalen Seite; (B) Darstellung einer Untereinheit: *N*- und *C*-Terminus, die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Fass Domäne und der *wrapping loop* sind angedeutet. Die Häm-Gruppe ist rot dargestellt. Quelle: Modifiziert nach Diaz *et al* 2012<sup>135</sup> modifiziert

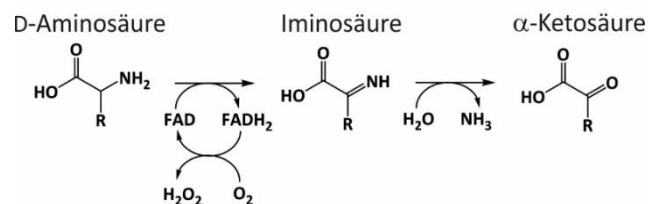
Die Häm-Bindungstasche ist über verschiedene Katalasen gut konserviert (Abbildung 4 A). Es sind drei Aminosäuren essentiell für die katalytische Aktivität. Hierbei handelt es sich um einen Tyrosin-Rest

(Y415), der proximale Ligand des Häm, ein Asparagin-Rest (N201) und das katalytische Histidin (H128) auf der Häm-distalen Seite.<sup>135-138</sup> Der Eintritt ins aktive Zentrum wird durch einen Tunnel mit aziden Aminosäuren aufgespannt und durch ein Netz aus Wassermolekülen geformt.<sup>136,139</sup> An der engsten Stelle dieses Kanals befinden sich konservierte Asp- und Ser-Reste, welche den Zugang zum aktiven Zentrum kontrollieren.<sup>136</sup>

Katalase ist ein effizientes Enzym mit hoher *turnover number* ( $k_{cat}$ ) und es besitzt die Möglichkeit mehrere Millionen  $H_2O_2$ -Moleküle pro Sekunde zu verstoffwechseln. Laut Enzymaktivitätsmodellen ist keine Sättigung mit Substrat möglich.<sup>136,140-142</sup>

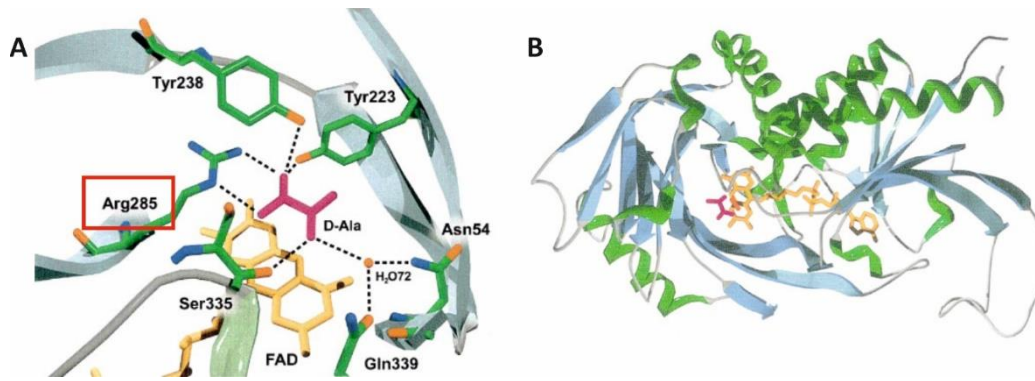
*Toxoplasma gondii* ist ein intrazellulärer einzelliger Parasit des Stammes der Apicomplexa, welcher sich in einer parasitophoren Vakuole in z.B. Makrophagen repliziert.<sup>133,143</sup> Zusätzlich zu Mitochondrien und den Kompartimenten des sekretorischen Pathways gibt es einen reduzierten Chloroplasten, den Apikoplasten, sowie phylumspezifische Komponenten des apikalen Komplexes, dichte Granula, Mikronemen und Rhoptrien.<sup>143</sup> Dieser Parasit besitzt neben einer Katalase<sup>130,143</sup> auch ein System aus Superoxiddismutasen<sup>144</sup> und Peroxiredoxinen.<sup>130,133,145</sup> Bei einer Vielzahl von pathogenen Bakterien und Pilzen ist die Katalase ein wichtiger Faktor für das Überleben im Wirt.<sup>133,146-148</sup> Jedoch besitzen einige einzellige Parasiten wie z.B. *Trypanosoma*, *Leishmania*, oder *Plasmodium falciparum* kein Katalase-kodierendes Gen.<sup>133</sup>

### 2.3.2. *Rhodotorula gracilis* D-Aminosäureoxidase



**Schema 2** Reaktionsgleichung der durch die D-Aminosäureoxidase katalysierten Reaktion. Die D-Aminosäure wird mittels gleichzeitiger Reduktion von FAD zur Iminosäure oxidiert. Bei der Regenerierung des FAD-Cofaktors durch Sauerstoff entsteht Wasserstoffperoxid. Die Iminosäure hydrolysiert unter Produktion von Ammoniak zur α-Ketosäure.

Die D-Aminosäureoxidase (DAAO, EC 1.4.3.3)<sup>149,150</sup> oxidiert die Aminogruppe ( $NH_2$ -R) von D-Aminosäuren durch Reduktion von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) (Schema 2). Das reduzierte Flavin wird durch  $O_2$  reoxidiert, wodurch  $H_2O_2$  entsteht. Die entstandene Iminosäure wird freigegeben und reagiert spontan unter Hydrolyse zur korrespondierenden α-Ketosäure und Ammoniak ( $NH_3$ ).<sup>149-153</sup> Die DAAO der Rothefe *Rhodotorula gracilis* wurde bereits in verschiedenen Versuchen genutzt und *in vitro* charakterisiert.<sup>152</sup> Dieses Enzym hat eine hohe Spezifität gegenüber D-Aminosäuren und eine relativ niedrige Affinität, von 1 mM, gegenüber D-Alanin (D-Ala).<sup>152,154</sup> Mit D-Ala als Substrat hat die DAAO von *Rhodotorula gracilis* einen  $k_{cat}$  von ca.  $20\,000\ min^{-1}$ .<sup>149,155,156</sup> Die DAAO kann als effektive genetisch-kodierte Quelle einer von D-Ala-abhängigen Produktion von  $H_2O_2$  genutzt werden.<sup>152,157</sup>



**Abbildung 5** (A) Ligand-gebundenes aktives Zentrum der D-Aminosäureoxidase aus *Rhotodorula gracilis*. Der gebundene Ligand ist D-Ala (magenta); Wasserstoffbrückenbindungen sind in unterbrochenen Linien angedeutet. (B) *Ribbon* Darstellung der DAAO Monomerstruktur. (grün:  $\alpha$ -Helices; blau:  $\beta$ -Stränge; grau: loops; gelb: FAD; lila: Ligand D-Alanin). Quelle: Modifiziert nach Pilone *et al* 2000<sup>158</sup> modifiziert

Die *RgDAAO* besteht aus 368 Aminosäuren.<sup>149,159</sup> Die Sekundärstruktur besteht aus 11  $\alpha$ -Helices und 13  $\beta$ -Strängen (Abbildung 5 B).<sup>149,160,161</sup> Die FAD-Bindungsstelle wird durch das konservierte Rossmann-Faltungsmotiv<sup>162</sup> aus  $\beta\alpha\beta$ , auch bekannt als Dinukleotid-Bindungsmotiv,<sup>149,163,164</sup> aufgebaut, welches für FAD- und NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen üblich ist.<sup>149,165,166</sup> Das native *RgDAAO*-Protein ist ein *head-to-tail* Dimer<sup>150,167</sup> aus identischen Untereinheiten, welche je ein nicht-kovalent gebundenes FAD-Molekül beinhalten.<sup>149,150,168,169</sup> Das aktive Zentrum der *RgDAAO* liegt in einem Hohlraum, welcher durch  $\beta$ -Stränge in der Nähe des Isoalloxazinrings des Flavins und der Substratbindungsstelle definiert wird. Das Flavin-Molekül befindet sich am unteren Ende dieses Hohlraumes. Die  $\beta$ -Stränge haben eine antiparallele Orientierung und sind durch Wasserstoffbrückenbindungen starr verbunden.<sup>149,170</sup> Konservierte Reste im aktiven Zentrum sind Arg285, Tyr238 und Tyr223 (Abbildung 5 A). Mutation des Arg285 zu Alanin führt zu einer Mutante, welche nicht fähig ist das Flavinsemiquinon zu stabilisieren. Demnach wird Arg285 die elektrostatische Interaktion mit dem negativ geladenen N-C=O-Lokus des Flavin-Cofaktors nachgesagt, wodurch Arg285 von Bedeutung für die Lokalisation des Substrates und des Cofaktors während der Katalyse ist.<sup>158,171</sup> Tyr223 spielt eine wichtige Funktion in der Substratbindung, was in Mutationsstudien gezeigt wurde.<sup>172</sup> Der Rest Tyr238 moduliert die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums.<sup>158</sup>

#### 2.4. Glutaredoxine und *Glutaredoxin-like proteins*

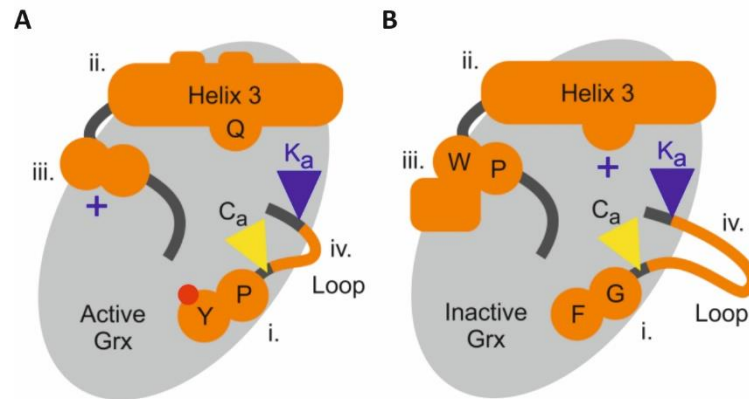
Glutaredoxine (Grx) sind Glutathion:Disulfid-Oxidoreduktasen, welche Elektronen von Glutathion auf ein inter- oder intramolekulares Disulfid übertragen (Schema 3).<sup>173</sup>



**Schema 3** Reaktionen welche durch enzymatisch aktive Glutaredoxine (Grx) katalysiert werden. Grx nutzt reduziertes Glutathion (GSH) als Elektronendonator um Glutathiondisulfid-Substrate (GSSR) und nicht-Glutathiondisulfid-Substrate (RSSR') zu reduzieren. Quelle: Modifiziert nach Liedgens *et al* 2020<sup>174</sup> modifiziert

Klassische Grx besitzen wie Glutathiontransferasen (GST), Glutathionperoxidasen<sup>175</sup> oder Peroxiredoxine (Prx)<sup>176,177</sup> eine Thioedoxinfaltung und werden somit der Thioedoxin-Familie zugeordnet. Diese Thioedoxinfaltung besteht aus vier oder fünf zentralen  $\beta$ -Strängen, welche von  $\alpha$ -Helices umgeben sind.<sup>175,178</sup> Der entscheidende Unterschied zwischen Glutaredoxinen und Thioedoxinen ist ihre Spezifität gegenüber Glutathion.<sup>179</sup>

Glutaredoxine werden in zwei Klassen eingeteilt, enzymatisch aktive Klasse I Grx<sup>179-181</sup> und enzymatisch inaktive Klasse II Grx<sup>182-185,174</sup>. Alle Glutaredoxine tragen einen reaktiven Cystein-Rest am N-Terminus der Helix  $\alpha_1$  in Form eines CxxC/S-Motivs.<sup>174,179</sup> Klasse I Grx können Glutathiondisulfid-Substrate (GSSR) und Nicht-Glutathiondisulfid-Substrate (RSSR') mittels reduziertem Glutathion (GSH) als Elektronendonator reduzieren.<sup>174</sup> Die meisten Klasse I Grx (Abbildung 6 A) tragen ein CPYC-Motiv im aktiven Zentrum<sup>174,186</sup> und nutzen GSH als Substrat zur Redoxkatalyse, wohingegen enzymatisch inaktive Klasse II Grx, GSH als Ligand für einen Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) nutzen (Abbildung 6 B).<sup>174,179,184</sup> Klasse II Grx, welche auch als *Glutaredoxin-like proteins* (Glps) bezeichnet werden, haben eine geringe oder gar keine Oxidoreduktase-Aktivität<sup>174</sup> und bilden dimere oder tetramere Holokomplexe, welche über einen Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Cluster verbunden sind.<sup>187</sup> Hierbei koordinieren jeweils der reaktive Cystein-Rest im aktiven Zentrum und zwei nicht-kovalent gebundene GSH an die Eisenionen, wodurch sie Funktionen in der Biosynthese, dem Transfer und Transport von Fe/S-Clustern erfüllen können.<sup>184,187,188</sup> Im Gegensatz zu Klasse I Grx ist in den Klasse II Grx neben einem Glycin- und Phenylalanin-Rest der zweite Cystein-Rest im aktiven Zentrum gegen einen Serin-Rest getauscht, was zu einem CGFS-Motiv führt.<sup>174,178,189</sup> Durch den Prolin-Rest im CPYC-Motiv der Klasse I Grx wird eine Fe/S-Clusterbindung verhindert.<sup>174</sup> Wenige Klasse I Grx können [2Fe-2S]-Cluster binden, wenn der Prolin-Rest im aktiven Zentrum ersetzt ist.<sup>174,189-191</sup> Die Tyrosinhydroxylgruppe des CPYC-Motives der Klasse I Grx ragt aus der Proteinoberfläche und trägt nach Hypothesen zur Glutathionaktivierung bei. Dieser Rest fehlt in Klasse II Grx.<sup>174,192</sup> Helix 3 ist Teil der Glutathion-Gerüststelle und in beiden Grx-Klassen unterschiedlich.<sup>174,179,192,193</sup> In Klasse II Grx befindet sich zwischen Helix 3 und Strang 3 ein konserviertes WP-Motiv, welches in Klasse I Grx normalerweise durch ein oder zwei basische Reste ersetzt wird.<sup>178,179,189</sup> Ein weiteres Merkmal der Klasse II Grx ist die verlängerte Schleife zwischen dem Lysin- und dem Cystein-Rest im aktiven Zentrum.<sup>179,193,194</sup>



**Abbildung 6** (A) Schematische Darstellung eines enzymatisch aktiven Klasse I Glutaredoxins. Die charakteristischen Proteinregionen sind: i. der Prolin-Rest im CPYC-Motiv ii. Helix 3 iii. der basische Rest zwischen Helix 3 und Strang 3 iv. die Loop-Struktur. (B) Schematische Darstellung eines enzymatisch inaktiven Klasse II Glutaredoxins oder auch *Glutaredoxin-like protein*. Die charakteristischen Proteinregionen sind: i. Fe/S-Clusterbindung durch nicht Vorhandensein des Prolin-Restes ii. Helix 3 iii. WP-Motiv zwischen Helix 3 und Strang 3 iv. verlängertes Loop-Motiv. Quelle: Modifiziert nach Liedgens *et al* 2020<sup>174</sup> modifiziert

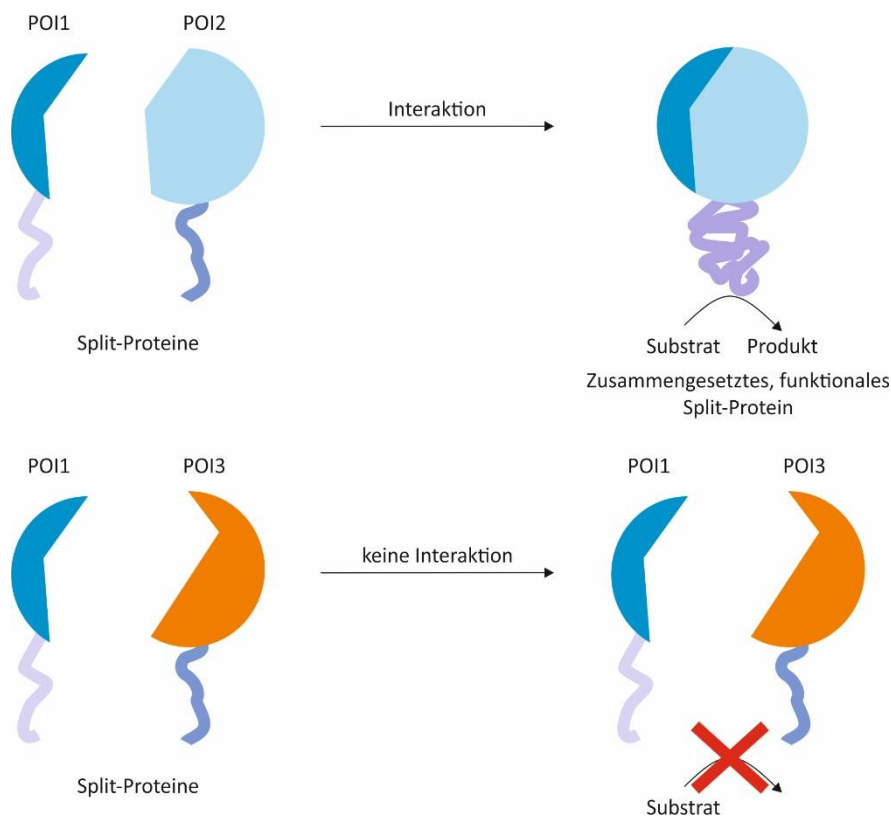
Glutaredoxine spielen eine Rolle für den Eisenmetabolismus, -transport und die -regulation. Das humane Grx5 ist eines der zentralen Proteine des mitochondrialen Fe/S-Cluster-Metabolismus, -transports und der -regulation.<sup>195</sup> Knockout von *GRX5* beeinflusst die Fe/S-Cluster-Assemblierung auf Proteine und führt zu einer Eisenüberladung der Mitochondrien.<sup>196</sup> In *Saccharomyces cerevisiae* führt die Depletion von Grx5 zu einer eisenabhängigen Erhöhung des rRNA-Abbaus aufgrund der Eisenüberladung.<sup>197</sup> In *Schizosaccharomyces pombe* führt der Verlust von Grx5 zudem zu einer Abnahme der mitochondrialen DNA.<sup>198,199</sup> *Saccharomyces cerevisiae* besitzt zwei weitere Klasse II Monothiol-Glutaredoxine mit CGFS-Motiv: Grx3 und Grx4. Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle im intrazellulären Eisentransport und -sensing.<sup>182,198,200</sup> Sie sind cytosolisch und nuklear lokalisiert und fungieren als Modulatoren des Transkriptionsfaktors Aft1, welcher die Eisenaufnahme in Hefe reguliert.<sup>182,183,201</sup>  $\Delta glp3\Delta glp4$ -Zelllinien haben einen Defekt im Zellzyklus, intrazelluläre Eisenakkumulationen und eine veränderte Sensitivität gegenüber  $H_2O_2$ .<sup>182,201</sup>

*Plasmodium* besitzt ein funktionelles Glutathionsystem aus Glutathionreduktase (GR), einem 2-Cys Grx und einer GST.<sup>202</sup> Die Disulfidoxidoreduktasen Thioredoxin (Trx), Grx und Plasmoredoxin (Plrx) tragen zum Erhalt des Redoxstatus bei.<sup>59,203,204</sup> Das Klasse I Grx aus *Plasmodium falciparum* besitzt ein CPYC-Motiv. Neben diesem klassischen Grx wurden im Parasiten drei *Glutaredoxin-like proteins* (PfGlp1, PfGlp2, PfGlp3) identifiziert.<sup>174,178</sup> Glp1 trägt wie Hefe Grx3, Grx4 und Grx5 ein konserviertes CGFS-Motiv, eine mitochondriale Targetingsequenz und hat geringe Ähnlichkeit zu dem Klasse I Grx in *Plasmodium falciparum*, jedoch hohe Ähnlichkeit mit *Saccharomyces cerevisiae* Grx5. Im HEDS-Assay hat das verkürzte (Start: Asn<sup>44</sup>) rekombinante Glp1 keine Aktivität.<sup>178,205</sup> Die Proteine Glp2 und Glp3 haben ein CKFS- bzw. CKYS-Motiv. Beide Proteine tragen zusätzliche Cystein-Reste. Glp2 besitzt C-terminal lokalisiert ein weiteres Cystein und in Glp3 befindet sich zwei weitere Cystein-Reste in einem

repetitiven NDKCIK-Motiv, welchem eine geladene Sequenz folgt. Im Vergleich dazu trägt Glp1 nur den Cys<sup>99</sup>-Rest im aktiven Zentrum.<sup>178</sup> GFP-Fusionskonstrukte der Glps wurden auf ihre Lokalisation untersucht. Hierbei war Glp1-GFP und Glp2-GFP cytosolisch und Glp3-GFP mitochondrial lokalisiert.<sup>206</sup> Die Funktion der drei Glps ist noch unbekannt. Frisch aufgereinigtes Glp1 liegt zu nur 10 % im dimeren Zustand vor. Nach Inkubation an Luft oder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann der Anteil an Dimer erhöht werden. Unter nativen Bedingungen führt die Zugabe von GSH oder DTT zur Stabilisierung von monomerem Glp1. Demnach ist das Dimer unter denaturierenden Bedingungen als kovalentes Cys<sup>99</sup>-Cys<sup>99</sup>-Disulfid verbunden. Wenn im aktiven Zentrum ein zweites Cystein eingefügt wird (Glp1<sup>S102C</sup>), liegt das Protein hingegen nur als intramolekulares Disulfid vor. Ebenso führt GSSG zur Monomerisierung von Glp1. In rekombinantem  $\Delta N$ -term-Glp2 ist es beiden verfügbaren Cysteinresten möglich mit Glutathion zu reagieren.<sup>178</sup>

## 2.5. Protein-Fragment-Komplementationsassay (PCA)

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) steht eine breite Sammlung an Methoden zur Verfügung. Es kann die Förster-Resonanzenergietransfermikroskopie genutzt werden, die auf dem Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor basiert. Hierbei wird die Interaktion durch eine erhöhte Fluoreszenzemission gemessen.<sup>207</sup> Als optische Messmethode können durch Biolayer-Interferometrie-Wechselwirkungen zwischen Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und kleinen Molekülen detektiert werden. Hierbei wird eine Wellenlängenverschiebung gemessen, welche durch Bindung des Interaktionsmoleküls an einem am Sensor immobilisierten, biomolekularen Köder entsteht.<sup>208</sup>

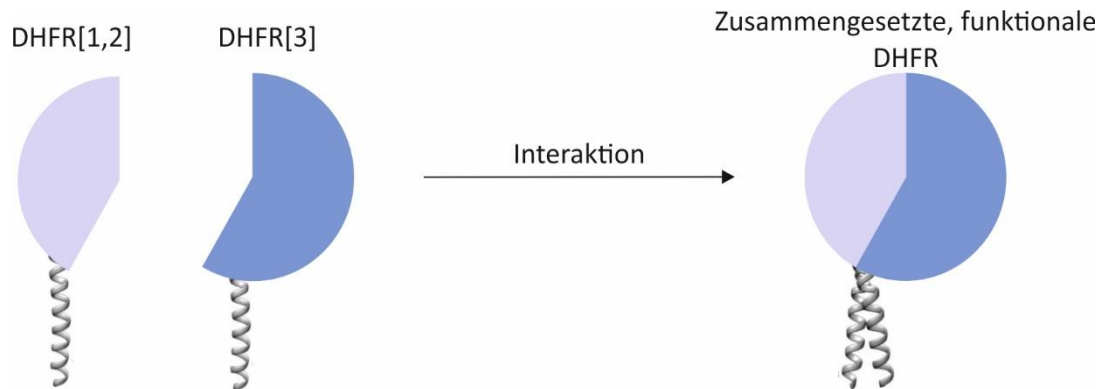


**Schema 4** Beispielhafte Darstellung des Protein-Fragment-Komplementationsassays (PCA). Oben: Bei Interaktion der *proteins of interest* (POI, blau) kommt es zur Zusammensetzung des Split-Proteins (lila), es kann seine ursprüngliche Funktion durchführen und Substrat zu Produkt umsetzen. Unten: Findet keine Interaktion zwischen den beiden POIs (blau und orange) statt, kommt es zu keiner Zusammensetzung und Faltung des Split-Proteins und nachfolgend zu keinem Umsatz des Substrates.<sup>209</sup> modifiziert

Der PCA kann neben reinen PPI-Studien<sup>210,211</sup> auch für Informationen über die Proteinfaltung<sup>212</sup> und die Rolle von spezifischen Tertiärstrukturelementen für die Enzymkatalyse<sup>213</sup> genutzt werden. PCA kann außerdem genutzt werden, um das große Spektrum an bereits vorhandenen Proteinsequenzdaten zu verbinden und ein Interaktionsnetzwerk aufzubauen. Dieser Assay beruht auf der Bildung eines bimolekularen Komplexes zweier nicht aktiver Reporterproteinfragmente, welche durch Interaktion des fusionierten *protein of interest* (POI) in räumliche Nähe gebracht werden (Schema 4).<sup>209,211,214</sup> Dies führt zu nicht-kovalenten Interaktionen und spezifischer Proteinzusammensetzung und -faltung zur nativen Proteinstruktur, woraus eine Wiederherstellung der Reporterproteinaktivität resultiert.<sup>211,214</sup> Als Reporterproteinfragmente können verschiedene Arten von Proteinen genutzt werden: die Dihydrofolatreduktase (DHFR)<sup>215</sup>,  $\beta$ -Lactamase<sup>216</sup>, das *green fluorescent protein* (GFP)<sup>217</sup>, Luciferase<sup>214</sup> und viele mehr.<sup>211</sup> Die Verwendung der DHFR ermöglicht es das Überleben als Nachweis von Proteininteraktionen zu nutzen. Hierfür wird zum Beispiel Methotrexat als endogener DHFR-Inhibitor genutzt.<sup>210,211,214</sup> Zusätzlich können fluoreszierende<sup>218</sup> oder lumineszierende Proteine<sup>219</sup> genutzt werden um die Interaktion spektroskopisch nachzuweisen.<sup>211,214</sup>



(ACP<sub>GFP</sub>) oder an mCherry oder das von Gen PF3D7\_0402000 kodierte POI fusioniert an mCherry, welches im Cytoskelett lokalisiert ist. Die erfolgreiche Transfektion der Plasmide wurde über die Fluoreszenz und die Interaktion der POI durch Selektion mit WR99210 ermittelt. Als Negativkontrollen wurden Plasmide ohne POI-Gen oder ohne Split-DHFR-Fragment-Gen genutzt.<sup>224</sup>



**Schema 6** Schematische Darstellung des Split-DHFR Systems mit Leucinzippern als *protein of interest* (POI) genutzt von Levray *et al.* Die DHFR-Fragmente [1,2] und [3] sind in lila dargestellt. Bei Interaktion der Leucinzipper (grau) setzt sich das Split-DHFR-Protein zusammen und kann seine Funktion, die Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat, durchführen.<sup>224</sup> modifiziert

### 2.5.2. Mitochondrialer Proteinimport in Opisthokonten und *Plasmodium*

Nur  $\leq 1\%$  der mitochondrialen Proteine wird in der mitochondrialen DNA kodiert und in der Matrix synthetisiert.<sup>225,226</sup> Der Großteil der im Mitochondrium benötigten Proteine wird auf den nuklearen Genen kodiert, als Vorläuferprotein im Cytosol synthetisiert und muss in die Mitochondrien importiert werden.<sup>225,227</sup> Die Doppelmembran des Organells resultiert in vier Hauptkompartimenten: die Matrix, die innere mitochondriale Membran (IM), der Intermembranraum (IMS) und die äußere Membran (OM).<sup>227-230</sup> Mitochondriale Vorläuferproteine, welche im Nukleus kodiert sind, besitzen i.d.R. eine subkompartiment-spezifische Targetingsequenz, welche durch Rezeptoren auf der mitochondrialen Oberfläche erkannt werden.<sup>225-228</sup>

Das Model des mitochondrialen Proteinimports (MPI) beruht hauptsächlich auf Experimenten in den Opisthokonten *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa*.<sup>230-233</sup> Einige Importmechanismen haben sich im Laufe der Evolution in der eukaryotischen Abstammungslinie vermutlich verändert.<sup>188,230,234,235</sup>

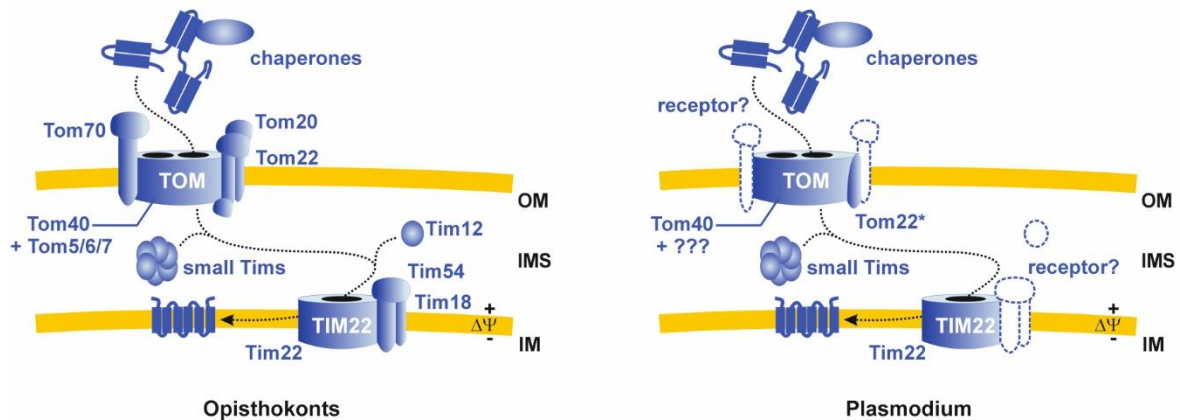
#### 2.5.2.1. Proteinimport in die Matrix des Mitochondriums

Matrixproteine werden in *Plasmodium* mit einer positiv geladenen *N*-terminalen Präsequenz im Cytosol synthetisiert. Dieses Protein wird über den *translocase of the outer mitochondrial membrane* (TOM)-Komplex aufgenommen. In Opisthokonten bindet die Präsequenz an die Rezeptoren Tom20 und Tom22 des TOM-Komplexes und wird anschließend durch die Pore, bestehend aus der zentralen Tom40-Untereinheit, transportiert. Im IMS bindet die Präsequenz an den *translocase of the inner*

*mitochondrial membrane* (TIM) 23-Komplex und die positiv geladene Sequenz wird vom Rezeptor Tim50 auf die porenbildende und negativ geladene Untereinheit Tim17 übertragen. Diese bildet mit der Untereinheit Tim23 das Zentrum des TIM23-Komplexes. Diese Translokation wird durch den elektrochemischen Gradienten an der IM und den ATP-abhängigen *presequence translocase-associated protein* (PAM)-Komplex vorangetrieben. In der Matrix wird das Präprotein mit Hilfe des PAM-Komplexes und mitochondrialer Chaperone festgehalten, gefaltet und die Präsequenz wird durch eine Peptidase entfernt.<sup>225-229,234-236</sup> In *Plasmodium* sind Kandidaten für Tom40, Tim50, Tom17, Tim23, PAM-Komponenten, die Peptidase und einige konservierte Chaperone bekannt, was darauf hindeutet, dass der Tim23-abhängige Importmechanismus im Malaria-Parasiten konserviert ist.<sup>188,230,235</sup> Es ist jedoch bekannt, dass die *N*-terminale Präsequenz in *Plasmodium* verändert und oft kürzer ist.<sup>188,237</sup> Zudem scheint der Präsequenzrezeptor des TOM-Komplexes, Tom20, zu fehlen und Tom22 fehlt die cytosolische Rezeptordomäne.<sup>188,230,235</sup>

#### 2.5.2.2. Proteineinbau in die innere mitochondriale Membran (IM)

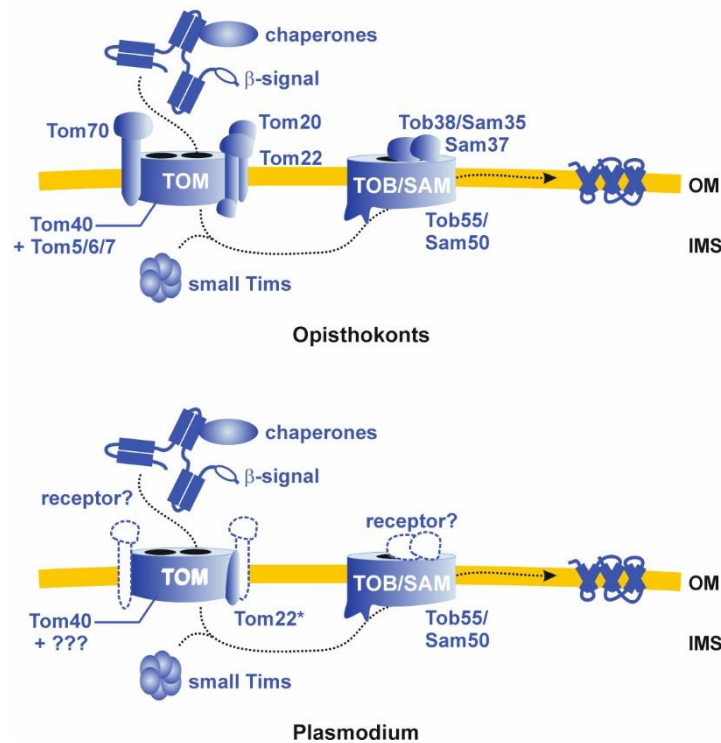
Opisthokonten können auf drei verschiedenen Wegen Proteine in die IM importiert. Welcher Weg genutzt wird ist von der Anzahl der Transmembransegmente und der Topologie abhängig. Der *oxidase assembly insertase* (OXA)-Mechanismus ist hoch konserviert und beruht auf einer Insertion des Proteins ausgehend von der Matrix.<sup>228,229,234-236</sup> Über diesen Weg werden sowohl nuklear- als auch mitochondrial-kodierte Proteine inseriert. In Apikomplexa wurde die Insertase Oxa1 und das Ribosom-interagierende Protein Mdm38 identifiziert. Der *inner membrane-associated ribosome receptor* Mba1 scheint nicht vorhanden zu sein.<sup>188,230,235</sup> Ein weiterer Importweg nutzt den TIM23-Komplex zum Einbau von Proteinen mit einem Transmembransegment. Wichtig ist für diesen Importweg, dass es eine zweigeteilte Präsequenz gibt. Der erste Teil der Sequenz ähnelt den Präsequenzen von löslichen Matrixproteinen, der zweite Teil besteht aus einer hydrophoben Sequenz, welche die Translokation in der TIM23-Pore unterbricht und zur Freigabe des Proteins in die IM führt.<sup>228,229,234-236</sup> Der Insertionsweg über den TIM23-Komplex scheint in *Plasmodium* konserviert zu sein.<sup>188,230,235</sup>



**Abbildung 7** Mitochondrialer Proteinimport von Proteinen mit sechs Transmembransegmenten in die innere mitochondriale Membran (IM) über den *translocase of the inner membrane* (TIM) 22-Komplex in Opisthokonten (links) und *Plasmodium* (rechts). Komponenten, für die in *Plasmodium* keine Homologe bekannt sind, werden durch gestrichelte Linien dargestellt. (OM: *outer mitochondrial membrane*; IMS: *intermembrane space of the mitochondrion*; TOM: *translocase of the outer mitochondrial membrane*). Quelle: Deponte *et al* 2013<sup>235</sup>

Der TIM22-Insertionsweg wird hauptsächlich genutzt, um Carrier mit sechs Transmembransegmenten in die IM einzubauen (Abbildung 7). Diese Substrate haben statt einer Präsequenz eine interne Signalsequenz. In Opisthokonten werden die Substrate chaperonengebunden von Tom70 des TOM-Komplexes an der OM erkannt. Nach Entfernen der cytosolischen Chaperone wird das Substrat durch den TOM-Komplex in den IMS transportiert. Hier wird es von den *small Tim*-Proteinen, welche Chaperonkomplexe bilden, zum TIM22-Komplex transportiert und durch den Rezeptor Tim54 erkannt.<sup>225,228,229,234-236,238-240</sup> Das zentrale Element dieses Komplexes, Tim22, bildet eine Pore durch die IM. Der TIM22-Insertionsweg ist in *Plasmodium* stark unterschiedlich. Es sind keine Homologe der Rezeptoren Tom70 und Tim54 und des Helferproteins Tim12 bekannt.<sup>188,230,235</sup>

## 2.5.2.3. Proteineinbau in äußere mitochondriale Membran (OM)



**Abbildung 8** Mitochondrialer Proteinimport von  $\beta$ -Fass Proteinen in die äußere mitochondriale Membran (OM) über den TOB/SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) in Opisthokonten (oben) und *Plasmodium* (unten). Komponenten für die in *Plasmodium* keine Homologe bekannt sind, werden durch gestrichelte Linien dargestellt. (IMS: *intermembrane space of the mitochondrion*; TOM: *translocase of the outer mitochondrial membrane*). Quelle: Deponte *et al* 2013<sup>235</sup>

Der Einbau von  $\beta$ -Fass Proteinen in die äußere mitochondriale Membran findet ausgehend vom IMS statt (Abbildung 8). Die Proteine haben ein spezialisiertes internes  $\beta$ -Signal nahe dem C-Terminus.  $\beta$ -Fass-Proteine werden zuerst über den TOM-Komplex in den IMS importiert, wo die hydrophoben Proteine einen Komplex mit den *small Tim*-Proteinen formen. Anschließend werden sie über den TOB/SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) registriert und in die OM inseriert.<sup>225,228,229,234-236,241-245</sup> In Apikomplexa sind Homologe der Rezeptoren des TOM- und TOB/SAM-Komplexes, Tom70/Tom20 bzw. Tob38/Sam35, nicht bekannt.<sup>188,230,235</sup> Es ist noch unklar wie die Substrate in *Plasmodium* erkannt werden.

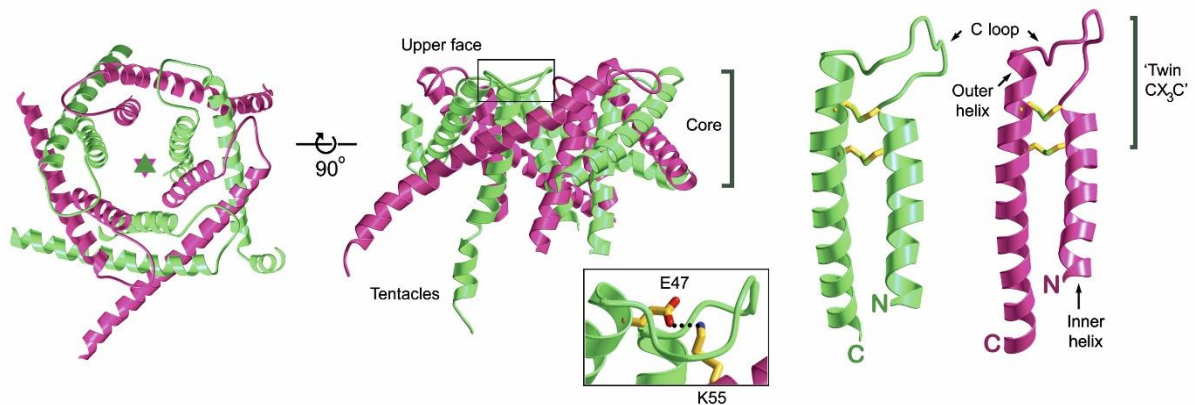
## 2.5.2.4. Proteinimport in den Intermembranraum des Mitochondriums (IMS)

Proteine des IMS können über verschiedene Wege importiert werden. Alle Wege starten mit der Aufnahme des Proteins über den TOM-Komplex. Anschließend können sie über den TIM23-Komplex in die IM inseriert und durch Proteasen prozessiert werden. Ein weiterer Weg beinhaltet das *trapping* durch Cofaktorbindung oder oxidative Faltung.<sup>228,229,234-236</sup> Die oxidative Proteinfaltung benötigt einen Elektronentransfer des Substrates mit oxidierbaren Cysteinresten. In Opisthokonten ist für diese Erkennung und Oxidation das Protein *mitochondrial intermembrane space assembly 40* (Mia40) zuständig. Durch die Bildung von stabilen Disulfidbrücken wird die korrekte Faltung des Proteins

vorangetrieben und es wird im IMS gehalten. Das resultierende reduzierte Mia40 überträgt seine Elektronen auf das Flavoenzym Erv1, welches als Redoxswitch fungiert und anschließend die Elektronen auf Cytochrom *c* und den Komplex IV der Elektronentransportkette überträgt.<sup>228,229,235,246,247</sup> In *Plasmodium* sind Homologe von Erv1, Cytochrom *c* und des Komplexes IV bekannt, jedoch fehlt das Homolog von Mia40, welches für die Substraterkennung und die oxidative Faltung zuständig ist.<sup>188,230,235,246</sup>

### 2.5.3. *small Tims* im Intermembranraum des Mitochondriums

Die *small Tims* sind eine Proteinfamilie homologer ca. 10 kDa Polypeptide, die Vorläufer-Membranproteine durch den IMS zum Tim22- oder SAM-Komplex transportieren.<sup>239,248-250</sup> Zu der *small Tim*-Familie gehören Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 und Tim13. Es sind lösliche Proteine im IMS in Opisthokonten die heterologe Komplexe aus Tim9/Tim10 bzw. Tim8/Tim13 bilden.<sup>239,249,251,252</sup> Tim9 und Tim10 sind essentiell in Hefe,<sup>239,250,251</sup> besitzen ein „twin CX<sub>3</sub>C“-Motiv, welches essentiell für ihre Funktion ist<sup>239,244,249,251,253,254</sup> und formen einen 70 kDa großen Komplex aus je drei Kopien pro Protein.<sup>239,252,255,256</sup>



**Abbildung 9** Ribbon Diagramm der orthogonalen Ansicht (links) auf die  $\alpha$ -Propeller Faltung und Seitenansicht (mitte) des Tim9/10 Komplexes. Individuelle Untereinheiten von Tim9 und Tim10 (rechts). Die charakteristischen Cystein-Reste sind angedeutet. (Tim9: lila, Tim10: grün). Quelle: Webb *et al* 2006<sup>239</sup>

Der Tim9/10 Komplex besitzt eine  $\alpha$ -Propeller Struktur bestehend aus fast ausschließlich  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur (Abbildung 9). Jede individuelle Untereinheit faltet in eine Helix-Loop-Helix-Struktur, welche durch die zentralen Disulfidbrücken des twin CX<sub>3</sub>C-Motivs zusammengehalten werden. Der Komplex kann in eine innere und äußere Seite aufgeteilt werden, jede besteht aus 6 Helices. Die kürzere N-terminale Helix zeigt in das Innere des Komplexes und die polaren Aminosäurereste zeigen in das Innere der Pore. Die äußeren 6 Helices formen durch eine leichte Verdrehung einen sechs-blättrigen  $\alpha$ -Propeller.<sup>239</sup>

Bisher konnten über die *small Tim*-Homologen in *Plasmodium falciparum* nur *in silico* Vorhersagen getroffen werden. Es wurden Homologe von Tim8, Tim9, Tim10 und Tim13 gefunden (Tabelle 1).<sup>188,235</sup>

**Tabelle 1** Bezeichnung der homologen *small Tim*-Proteinen Tim8, Tim9, Tim10 und Tim13 in *Plasmodium falciparum*.<sup>188,235</sup>

Tim9	PF13_0358
Tim10	PFL0430w
Tim8	PF14_0208
Tim13	PFL2065c

### 3. Zielsetzung

In dieser Promotionsarbeit sollte untersucht werden, ob die Blutstadien des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* während physiologischen oder substanzinduzierten Redoxveränderungen in unterschiedlichen Kompartimenten ein adaptives Verhalten aufweisen. Außerdem sollte untersucht werden, ob verschiedene Antimalariamittel (Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau) über H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. die hierdurch entstehende Akkumulation von beschädigten Molekülen wirken.

Zur Untersuchung dieser Fragen sollte der Redoxstatus der Blutstadien des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* in den Kompartimenten Cytosol, Verdauungsvakuole, mitochondriale Matrix und Intermembranraum des Mitochondriums aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Hierfür sollten Plasmide transfiziert werden, welche heterologe Redoxenzyme, z.B. die Katalase aus *Toxoplasma gondii* oder die D-Aminosäureoxidase aus *Rhodotorula gracilis*, kodieren. Zudem sollten die kompartiment-spezifischen Redoxänderungen mittels roGFP2-Fluoreszenzsensoren untersucht werden.

Des Weiteren sollten die drei *Glutaredoxin-like proteins* auf ihre Essentialität untersucht werden. Hierfür sollten Doppelknockouts der entsprechenden Gene in *Plasmodium falciparum* erstellt werden. Bei erfolgreichem Knockout sollte mit diesen Stämmen die Funktion der Glps im Eisenstoffwechsel analysiert werden. Zu diesem Zweck sollten IC<sub>50</sub>-Analysen bei hohen Eisenmengen und mit einem Eisenchelator gemessen werden. Anschließend sollten ebenfalls Eisen- oder Eisen-Schwefelcluster-Protein-abhängige Antimalariamittel untersucht werden.

Im dritten Projekt sollte die bereits in der Masterarbeit begonnene Etablierung des Protein-Fragmenten-Komplementationsassays mit dem Split-DHFR-System als Ein-Plasmid-System in *Plasmodium falciparum* etabliert werden. Dieses sollte genutzt werden, um die Protein-Protein-Interaktionen der *small Tim*-Proteine Tim8 und Tim13 sowie Tim9 und Tim10 zu untersuchen.



## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Technische Geräte

**Tabelle 2** Liste des technische Geräte.

Gerät	Hersteller
<b>Zellkultur Geräte</b>	
Biologische Sicherheitswerkbank ( <i>Escherichia coli</i> ) MCS-Advantage	ThermoScientific
Biologische Sicherheitswerkbank ( <i>Plasmodium falciparum</i> ) SAFE 2020	ThermoScientific
Elektroporationskammer Nucleofector™ 2b	LONZA
Inkubator ( <i>Escherichia coli</i> ) INCU-Line	VWR
Inkubator ( <i>Escherichia coli</i> ) MaxQ 4450	ThermoScientific
Inkubator ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	Memmert
Mikroskop Kamera AXIOCAM 105 color	ZEISS
Mikroskop LAB.A1 AXIO	ZEISS
Schüttler innova®44 Inkubator Shaker Series	Eppendorf
Wasserbad (Aqualine ALS)	Lauda
<b>Verwendete Zellkultur</b>	
Chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> XL1 blue	Stratagene
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 WT	
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 $\Delta$ glp1	AG Deponte
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 $\Delta$ glp2	AG Deponte
<i>Plasmodium falciparum</i> NF54 $\Delta$ glp3	Herrn Jude M Przyborski
<b>Molekularbiologie Geräte</b>	
DNA-Elektrophoreseapparatur	Biostep
Hitzeblock ETG MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Mikrowelle	Severin
NanoDrop Oce <sup>c</sup>	Thermo Scientific
Netzgerät Mini 300 V	Major Science
Rotlichtlampe	Petra Electric
ThermoMixer C	Eppendorf
Zelldichtemessgerät Ultrospec 10	Beckmann
Zentrifuge J-6B, Rotor JA10	Beckmann
<b>Proteinbiochemie</b>	
Gel- und Blot-Dokumentiersystem ECL CHEMOSTAR	Intas
Mini Trans-Blot Elektrophorese Zelle für Westernblot	BioRad
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand and Clamps	BioRad
Mini-PROTEAN Tetra vertikale Elektrophoreseszelle	BioRad
Netzgerät PowerPac Basic	BioRad
Rocking Platform Duomay 1030	Heidolph
UV-Tisch zur Agarose-Geldokumentation	Fröbel
<b>Generelle Geräte</b>	
Autoclave (VX-95)	Systec
CLARIOstar BMG	LABTECH
Eppendorfpipetten	Gilson
Feinwaage ABT 120-5DNM	Kern
Magnetic cell separation (MACS)	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	Heidolph
Mikroplattenleser CLARIOstar	BMG Labtech

Mikrozentrifuge SU1550	Sunlab
Neubauer Zählkammer improved	Marienfeld
pH-Meter Basic Meter PB-11	Sartorius
Pipette Accu-Jet	Brand
Reinstwasseranlage	Stakpure
UV-Vis Photometer V-650 Spectrophotometer	Jasco
Waage	Sartorius
Zentrifuge ( <i>Escherichia coli</i> ) Mikro 200	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge ( <i>Escherichia coli</i> ) Mikro 220 R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge ( <i>Plasmodium falciparum</i> ) Mikro 220 R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge ( <i>Plasmodium falciparum</i> ) Rotina 380R	Hettich Zentrifugen

#### 4.1.2. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3** Liste der Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
μ-Slide 8 Well Glass Bottom	ibidi
Bottle-Top-Filter Steritop Durappre mit PVDF Menbran 0.22 μM	Merck Millipore
Cryovials 2 mL	Greiner
Einmalhandschuhe ROTIPROTECT Nitrole light	Carl Roth
Einmal-Spritzen	VWR o. Braun
Elektroporationsküvetten	Cell projects
Immersionsöl	Carl Roth
Objektträger Superfrost Kanten geschliffen, 45°, weiß	Menzel
Parafilm	Sigma-Aldrich
Petrischale <i>Escherichia coli</i>	Waldeck
Petrischale mit Nocken, 145/20 mm	Greiner
Petrischale mit Nocken, schwere Ausführung	Greiner
Pipettenspitzen	Steinbrenner Laborsysteme
Pipettenspitzen gelb und blau	Starlab
Polystyrol-Küvetten	Sarstedt
Präzisionsküvetten Quarzglas SUPRASIL Schichtdicke 10 mm	Hellma
Promega WizardKit® Gel und PCR Clean-up System	Promega
Reaktionsgefäße (1.5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße 0.5, 1.5 und 2.0 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL	Griener Bio-One
Schwarze 96-Well Mikrotiterplatten	Falcon o. ThermoFisher
Serologische Pipetten	SARSTEDT
Sterile Filter 0.22 μM Syring Filter	Starlab
TC-Platten 6 Well Standard F	SARSTEDT
Transfermembran ROTI PVDF 0.45	Carl Roth
Whatman Paper 3 mm CHR	GE Healthcare
Zellstofftücher, einlagig, fusselfrei	Kimteck

## 4.1.3. Chemikalien

**Tabelle 4** Liste der Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
1 kb DNA Ladder 500 µg/mL	New England BioLabs Inc.
1,4-Dithiothreitol (DTT) ≥ 99 % p.a.	Roth
5-5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) 99 % (DTNB)	Aldrich
Acrylamid 4K-Solution 30 % Mit 37.5:1	PanReac AppliChem
Agarose	SERVA
AlbuMax™ II Lipid Rich Bovine Serum Albumin	Gibco Thermofisher
Albumin bovine Fraction V Fatty Acid free lyophil	Serva
AlexaFluor™ 488 goat anti-rat IgG (H+L)	invitrogen
Ammonium Eisen(II)citrat ~ 18 % Fe	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	PanReac AppliChem
Anti-HA-Biotin, High Affinity (3F10)	Roche
Artesunat	Sigma Aldrich
Bathophenanthrolindisulfonat 98 %	Sigma Aldrich
Blasticidin 10 mg/mL	invivoGen
Bromphenolblau	Waldeck
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O) 99.0 %	MERCK
Chloroquin diphosphat salt (98.5 – 101.0 % (EP))	Sigma
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10 – 250 kDa)	New England BioLabs Inc.
Concanavalin A aus <i>Canavalia ensiformis</i> (Jackbohne)	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G250	AppliChem
CutSmart® Buffer (10x)	New England BioLabs Inc.
D-Alanin ≥ 98 %	Roth
DAPI ≥ 98 %	Roth
Diamid	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O) 99 %	Sigma Aldrich
DNase I bovine pancreas, grade II	Roche
dNTPs 10 mM	VWR
D-Sorbitol 97 %	ACROS Organics
Essigsäure 100 %	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 99.0 – 101.0 %	MERCK
Ethylenglycol-bis(aminoethylether) <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem
Fosmidomycin Natriumsalz-Hydrat ≥ 95 %	Sigma Aldrich
Gel Loading Dye, Orange (6x)	New England BioLabs Inc.
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England BioLabs Inc.
Gel Loading Dye, Purple (6x), no SDS	New England BioLabs Inc.
GelRed® Nucleic Acid Strain 10000x in H <sub>2</sub> O	EMD Millipore Corp.
Gentamycin 50 mg/mL	C C pro
GFP-AB (Mouse)	Prof. Dr. A. Reichert
Giemsa-Stammlösung für die Mikroskopie	Carl Roth
Glutathione Reductase from baker's yeast 100 – 300 u/mg	Sigma
Glycerin reinst wasserfrei 99.0 %	CHEMSolute
Glycerol	AppliChem
Glycin 99 % for analysis	Thermo Scientific
Goat Anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate	BioRad
Goat Anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate	BioRad
HA-Tag Rabbit mAB (C29F4)	Cell Signaling Technology
HEPES 100.2 %	Calbiochem

---

Hoechst 33342 20 mM	Thermo Scientific
Hypoxanthin 10 mM	C-C pro
Imidazol buffer substance	Merck
Isoliertes Erythrozyten-Konzentrat, A <sup>+</sup>	DRK Mannheim
Isopropanol 99.96 %	Fisher Chemicals
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) research grade	Serva
Kaliumacetat (KAc) 99 – 100 %	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid (KCl) 99.5 %	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 99 %	ACROS Organics
Kohlenstoffdioxid, CO <sub>2</sub>	AirLiquide
LB-Agar Luria-Miller	Carl Roth
LB-Medium Luria Miller	Carl Roth
L-Glutathion oxidiert $\geq$ 98 % HPLC (GSSG)	Merck
L-Glutathion reduziert $\geq$ 98.0 % (GSH)	Merck
Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4phthalazinedione free acid)	Sigma
Lysozyme from chicken egg white min 15000 u/mg	Serva
Menadion (2-Methyl-1,4-naphthoquinone 98 %)	Alfa Aesar
Methanol 99.9 %	Fisher Chemicals
Methylene blue	Merck
MitoTracker <sup>®</sup> Orange CMTMRos	Invitrogen
MitoTracker <sup>®</sup> Red CMXRos	Invitrogen
<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
NADPH	Gerbu
Natriumacetat (NaAc)	Sigma Aldrich
Natriumchlorid ( $\geq$ 99.5 % p.a.)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH) 98 %	Sigma Aldrich
Natriumlaurylsulfat (SDS)	SERVA
NEBuffer 3.1 (10x)	New England BioLabs Inc.
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Paraformaldehyd	Fisher Scientific
Paraquat (Methyl viologen dichloride hydrate 98 %)	Aldrich
p-Coumarin acid $\geq$ 98.0 % HPLC	Sigma
Poly(ethylenglykol) <sub>24</sub> -methylether-maleimid (mmPEG)	Iris Biotech
Ponceau S	Serva
Proteaseinhibitor cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack	Roche
Proteinase K, recombinant PCR grade	Roche
RNAse A $\geq$ 85 %	Sigma Aldrich
RPMI-Medium 1640 (1x)	Gibco Thermofisher
Salzsäure (HCl) 37 %	Bernkraft
Saponin	Sigma Aldrich
Stickstoff, N <sub>2</sub> 99.999 %	AirLiquide
SYBR <sup>™</sup> Green I Nucleic Acid Gel Stain 10000x in DMSO	LONZA
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (2x)	New England BioLabs Inc.
TRIS 99.3 %	Carl Roth
Triton X-100 98 – 100 %	MERCK
WR99210	Jacobus Pharmaceutical
$\beta$ -Mercaptoethanol $\geq$ 99 % p.a.	Roth

---

**Tabelle 5** Liste der Enzyme. Alle Enzyme vom Hersteller New England BioLabs Inc.

Enzym	Konzentration
Antarctic Phosphatase	5 000 units/mL
<i>Bam</i> HI-HF	20 000 units/mL
<i>Bgl</i> II	10 000 units/mL
<i>Dpn</i> I	20 000 units/mL
<i>Eco</i> RI-HF	20 000 units/mL
<i>Hind</i> III-HF	20 000 units/mL
Phusion DNA Polymerase	2 000 units/mL
<i>Sac</i> I-HF	20 000 units/mL
<i>Spe</i> I-HF	20 000 units/mL
T4 DNA Ligase	400 000 units/mL
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 000 units/mL
<i>Xho</i> I	20 000 units/mL

**Tabelle 6** Liste der genutzten Sequenzierprimer. Alle Primer des Herstellers Metabion international.

Primer	Sequenz (5' → 3')
Split-mDHFR-MCS1 s	CCTACATACATATACAAAACCTAC
Split-mDHFR-MCS2 s	GCCGTTGCTCTTTCAATGAGGAG
pHBIRH/seq/s	CCTACATACATATACAAAACCTAC
pHBIRH/MCS1/seq/s	GCCGTTGCTCTTTCAATGAGG
pHBIRH/MCS1/seq/as	ACACCCACACGTAACATATCC
pHBIRH/neu1seq/as	TTTTGTAATTTCTGTGTTTATG
pHBIRH/neu2seq/as	ATTCTATATTTATAAGGAAGATTAC
<i>Tg</i> Katalase/seq/s	GAACACCAGTATTTGCAAGATT
<i>Tg</i> Katalase/seq2/s	CACATTTACATGATCCAAATATG
<i>Tg</i> Katalase/seq/as	GACTTCCATAACCATTTCATGTG
<i>Rg</i> DAAO/seq/s	CATTACCAAGTTCAGAATGTCC
<i>Rg</i> DAAO/seq/as	GTTCTAAACTTGTTACTGTTCTTC
<i>Tg</i> Katalase/seq3/s	CATGGTGATTATCCATTAATTC
<i>Tg</i> Katalase/seq3/as	GAATTAATGGATAATCACCATG
IMSTS/seq/as	CATATATATAATCATTATCTAATAC
roGFP2/seq/as	GTATACATTGTGACAGTTGTAG
roGFP2/seq2/as	CTAACAATACCATATGGTC
bsd/seq/s	CGCATCTTCACTGGTGTCAAT
bsd/seq/as	CACATATCGCTTTGATCCCAGG
yDHODH/seq/s	GAACCACGTTACATTTCTGTGTC
yDHODH/seq/as	GATAATTTCTTTTGACGGTTTAATAC
hDHFR/seq/s	GGAGGAGAAAGGCATTAAGTAC
Chac1/seq/s	GGCAAGGAGATACATTTTCATAGA
Chac1/seq/as	CCTAATACAGCTTCTCTAACAT
DHODH/seq2/s	GGTGTTCATTGCATGACTACAC
pHBIRH/bsd/seq/s	GATCGCGACGATACAAGTCAG
pHBIRH/bsd/seq/as	GCGACGGCCGCATCTTCAC

**Tabelle 7** Liste der genutzten Klonierungsprimer. Alle Primer des Herstellers Metabion international.

Primer	Sequenz (5' → 3')
Cytosol+3xHA/s	GATCACTAGTATGGGATCCTATCCTTATGATGTTT
TgKatalase/as	GATCGAGCTCTTACATTTTTGCTGG
RgDAAO/as	GATCGAGCTCTTATAAACCTGATTCTC
TgKatalase_H64N/s	GAATACCAGAAAGAGTTGTAAATGCAAAAGGTGGAGGAGC
TgKatalase_H64N/as	GCTCCTCCACCTTTTGCATTTACAACCTCTTTCTGGTATTC
RgDAAO_R285A/s	GACATAATGTAGGATTAGCACCAGCTAGAAGAGGTGG
RgDAAO_R285A/as	CCACCTCTTCTAGCTGGTGCTAATCCTACATTATGTC
Cytosol+roGFP2/s	GATCACTAGTATGGGATCCGCAAGCGAATTCTC
SpeI+MitoTS/s	GATCACTAGT <b>ATG</b> AAGTACATTAAGAG
SpeI+DVTS/s	GATCACTAGT <b>ATG</b> GCATTAACAGTAAA
SpeI+IMSTS/s	GATCACTAGT <b>ATG</b> ATTAGTAAATTTAAAACC
SpeI+IMSTSnew/s	GATC <b>ACTAGT</b> ATGAAAAGAAGTTTTAGATC
ScLeucinZ/MCS1/s	GATCGGATCC <b>ATG</b> TCCGAATATCAGCCAAG
ScLeucinZ/MCS1/as	GATCCTCGAGGCGTTCGCCAACTAATTTC
ScLeucinZ/MCS2/s	GATCACTAGT <b>ATG</b> TCCGAATATCAGCCAAG
ScLeucinZ/MCS2/as	GATCGAATTTCGCGTTCGCCAACTAATTTC
ScLeucinZ/162/s	CAAGACTGAAGAGGACCCAATTATCAAACAGG
ScLeucinZ/162/as	CCTGTTTGATAATTGGGTCTCTTCAGTCTTG
EcoRV-Crt5'/s	GATC <b>GATATC</b> TTTAATAATATATGAAAAAATT
BamHI-Crt5'/as	GATC <b>GGATCC</b> TTATATGTAAGAAATTAA
BamHI-bsd/s	GATC <b>GGATCC</b> ATGCCTTTGTCTCAA
HindIII-bsd/as	GATC <b>AAGCTT</b> AGCCCTCCACACA
HindIII-PfDHFR-TS/s	GATC <b>AAGCTT</b> GGATATGGCAGCTTAA
EcoRI-PfDHFR-TS/as	GATC <b>GAAATTC</b> TGATATCGAAATTGAAG
SalI-Skip-2A/s	GATC <b>GTCGAC</b> GGAGAAGGAAGGAAGTTT
XhoI-yDHODH/as	GATC <b>CCTCGAGA</b> ATGCTGTTCAACTTC
EcoRV-Crt5'2/s	GATC <b>GATATC</b> GGAGAATATTTAATAATATATG
EcoRV-Crt5'3/s	GATC <b>GATATC</b> CAATATTTGTATAACACATG
BamHI-Crt5'2/as	GATGGTACCAG <b>CTCGAG</b> TTATATG
DHODH/mut/T4lins/s	GTATCAACTCCATGGGTTTACCAAACGAAGGTATCG
DHODH/mut/T4lins/as	CGATACCTTCGTTTGGTAAACCCATGGAGTTGATAC

#### 4.1.4. Verwendete Stammlösungen

**Tabelle 8** Materialien für Westernblotanalyse und Immunofluoreszenz.

αHA-Tag (Rabbit)	1:1000
αHA-Biotin, High Affinity (3F10)	25 ng/mL (Stock 50 µg/mL 1:2000)
MitoTracker® Red CMXRos	50 nM
MitoTracker® Orange CMTM Ros	100 nM
Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	4 µg/mL (Stock 2 mg/mL 1:500)
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:5000
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:5000
αGFP (Mouse)	Prof. Dr. A. Reichert*, 1:500
DAPI	300 nM (Stock 300 µM 1:1000)

\* Buchmann Institut für Molecular Life Sciences, Goethe Universität Frankfurt

**Tabelle 9** Stammlösungen und Verdünnungen von Antibiotika und Selektionsmitteln.

WR99210	20 $\mu$ M (RPMI 0.1 % DMSO, 1:5000 – 1:10000), – 20 °C
Blasticidin	10 mg/mL (1:500 – 1:10000), 4 °C
Ampicillin in 50 % EtOH	100 mg/mL (1:1000), – 20 °C

**Tabelle 10** Stammlösungen für IC<sub>50</sub>-Messungen. Alle Lösungen wurden mit RPMI-Medium hergestellt und wurden bei – 20 °C gelagert.

Atovaquon	500 nM (0.0025 % DMSO)
Artesunat	1 $\mu$ M (0.06 % DMSO)
Chloroquin	3 $\mu$ M
Paraquat	40 mM
Menadion	930 $\mu$ M (1 % DMSO)
Methylenblau	3 $\mu$ M
WR99210	50 nM (0.00025 % DMSO)

#### 4.1.5. Verwendete Programme

Bioinformatics Reverse Complement, ChemDraw Ultra 12.0, CorelDRAW Technical Suite 2020, JustBio Aligner, JustBio Translator, MitoProt II, NCBI National Center for Biotechnology Information, SigmaPlot 13.0, Fiji (ImageJ-win64).

#### 4.2. Sterilisation

Alle für die Zellkultur verwendeten Flüssigmedien wurden bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Hitze instabile Lösungen (PBS, AlbuMax™ II, Antibiotika, IC<sub>50</sub>-Stammlösungen) wurden mittels Filter (0.22  $\mu$ M) sterilisiert. Glasgeräte, Pipettenspitzen, andere Gebrauchsgegenstände, Flüssig- und Festabfall wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

#### 4.3. Molekularbiologische Methoden in *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte wurden in Synthesauftrag zu GenScript gegeben (siehe 8.2).

##### 4.3.1. Restriktionsverdau von DNA

Für einen Restriktionsverdau von DNA wurde das Standardprotokoll von New England BioLabs Inc. verwendet.

Hierbei wurden 1  $\mu$ g (4 – 30  $\mu$ L) DNA in H<sub>2</sub>O mit Reaktionspuffer (5  $\mu$ L, CutSmart® 10x) und den Restriktionsenzymen 1/2 (1  $\mu$ L) gemischt. Das Volumen des Reaktionsgemisches wurde mit H<sub>2</sub>O (millipore) auf 50  $\mu$ L aufgefüllt und inkubiert (37 °C, 1 h oder über Nacht).<sup>www.neb-online.de</sup>

DNA in H <sub>2</sub> O	1 µg
Buffer 10x	5 µL
Restriktionsenzym 1	1 µL
Restriktionsenzym 2	1 µL
H <sub>2</sub> O (millipore)	auf 50 µL auffüllen

Die Aufreinigung erfolgt mit dem Promega WizardKit®.

#### 4.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese wurde 1 – 2 % Agarose in TAE-Puffer (1x, 1:50 Verdünnung des TAE-Puffers (50x) in H<sub>2</sub>O (millipore)) gemischt und unter Zuhilfenahme der Mikrowelle gelöst. Die Lösung (30, 50, 100 mL) wurde nach Abkühlen auf RT und Versetzen mit GelRed® Nucleic Acid Stain (1:10000) in einen Agarose-Gelschlitten gefüllt und bis zur Verfestigung gewartet. Die DNA-Proben (5 – 20 µL, in H<sub>2</sub>O (millipore)) wurden mittels LoadingDye (1 – 10 µL, 5x, 1:5) aufgetragen. Anschließend wurde die Gelelektrophorese in einer Elektrophoresekammer durchgeführt (90 – 120 V, 30 – 90 min). Das Ergebnis wurde mittels UV-Lampe (302 nm oder 312 nm) und Lichtbild dokumentiert.

TAE-Puffer (50x):

2 M	Tris
1 M	Essigsäure
50 mM	EDTA
	pH = 8.9

1:50 mit H<sub>2</sub>O (millipore) verdünnt.

#### 4.3.3. Ligation von Plasmid-DNA

Zur Ligation wurden Vektor-DNA (4 µL in H<sub>2</sub>O (millipore)), Insert-DNA (4 µL in H<sub>2</sub>O (millipore)), T4 DNA Ligase Buffer 10x (2 µL), T4 DNA Ligase (1 µL) und H<sub>2</sub>O (millipore, 9 µL) in einem Reaktionsgefäß inkubiert (RT für 1 h oder 16 °C über Nacht). [www.neb-online.de](http://www.neb-online.de)

Vektor-DNA in H <sub>2</sub> O	4 µL
Insert-DNA in H <sub>2</sub> O	4 µL
T4 DNA Ligase Buffer 10x	2 µL
H <sub>2</sub> O (millipore)	auf 20 µL auffüllen
T4 DNA Ligase	1 µL

Verhältnis Vektor/Insert-DNA-Konzentration ca. 1:3

#### 4.3.4. Amplifikation von DNA-Konstrukten mittels *Polymerase chain reaction* (PCR)

Um DNA-Konstrukte zur Klonierung zu amplifizieren, wurden Primer mit *sticky ends* entworfen. Diese wurden im PCR-Cycler unter folgenden Bedingungen genutzt.

H <sub>2</sub> O (millipore)	36 µL
5x Phusion HF Buffer	10 µL
10 mM dNTPs	1 µL
100 µM Primer for	0.5 µL
100 µM Primer rev	0.5 µL
Template DNA	1 µL (~60 ng)
Phusion DNA Polymerase	1 µL (2 u)

Für PCR-Konstrukte welche nicht weiter zum Klonieren genutzt wurden, wurde die *Taq* DNA Polymerase (5 u) genutzt.

Bei PCR-Ansätzen zur Mutagenese wurde anschließend *DpnI* (1 µL, 20 u) zugegeben und inkubiert (37 °C, 1 h).

PCR Programm:

Temperatur (°C)	Zeit	
95	30 s	
95	30 s	x 25 – 30
45 – 75	30 s	
72	1 kb/30 s	
72	5 min	
4	~	

#### 4.3.5. Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Chemisch kompetente *Escherichia coli* XL1 blue Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen (10 – 50 µL) unter sterilen Bedingungen mit DNA-Lösung (1 – 5 µL) gemischt und auf Eis inkubiert (30 min). Nach einem Hitzeschock (42 °C, 90 s) und anschließender Inkubation auf Eis (5 min) wurde LB-Medium (10 Volumenäquivalente, steril) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 37 °C (30 – 60 min) inkubiert, auf Agarplatten (100 µg/mL Ampicillin (Stammlösung 100 mg/mL in 50 % EtOH, 1:1000)) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Agarplatten wurden bis zu zwei Monate bei 4 °C gelagert.

#### 4.3.6. Minipräparation von Plasmid-DNA

Puffer 1 (gelagert bei 4 °C):

50 mM	Tris
10 mM	EDTA
	pH = 8.0 bei RT
0.1 mg/mL	RNAse A

Puffer 2 (gelagert bei RT):

0.2 M	NaOH
1 % (w/v)	SDS

Puffer 3 (gelagert bei 4 °C):

1.8 M	KAc
11.5 % (v/v)	Essigsäure (100 %)

Zur Präparation von DNA wurde eine Übernachtskultur (3 – 5 mL) angesetzt. Hierfür wurde steriles LB-Medium unter sterilen Bedingungen in einem Reaktionsgefäß mit Antibiotikum versetzt (100 µg/mL Ampicillin (Stammlösung 100 mg/mL in 50 % EtOH (v/v), 1:1000)). Anschließend wurde ein Klon von einer Agarplatte in das Reaktionsgefäß überführt und über Nacht inkubiert (220 rpm, 37 °C).

Am Folgetag wurden die Zellen zentrifugiert (4 °C, 13000 x g, 30 s) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in kaltem Puffer 1 (100 µL) resuspendiert und mit Puffer 2 (150 µL) versetzt. Die Mischung wurde bei RT inkubiert, bis keine Trübung mehr sichtbar war. Anschließend wurde kalter Puffer 3 (150 µL) zugegeben und zentrifugiert (4 °C, 13000 x g, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol (600 µL) versetzt und zentrifugiert (4 °C, 13000 g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet in kaltem EtOH (70 % (v/v), 600 µL) resuspendiert und zentrifugiert (4 °C, 13000 x g, 5 min). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet unter Rotlicht getrocknet und in H<sub>2</sub>O (millipore, 30 µL) aufgenommen. Die Probe wurde bei – 20 °C gelagert.

#### 4.3.7. Midipräparation von Plasmid-DNA

Für eine Midipräparation von Plasmid-DNA wurde eine abgewandelte Version der in 4.3.6 beschriebenen Methode verwendet.

Es wurde eine Übernachtskultur mit einem Volumen von 100 mL vorbereitet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C, 5000 x g für 30 min durchgeführt. Das Volumen der verwendeten Lösungen wurde um das 40-fache erhöht. Das DNA-Pellet wurde in 1 mL H<sub>2</sub>O (millipore) aufgenommen.

#### 4.4. Zellbiologische Verfahren und genetische Manipulation von *Plasmodium falciparum*

Die *Plasmodium falciparum* Parasiten wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert und behandelt. Alle verwendeten Lösungen wurden sterilisiert und bei 4 °C oder – 20 °C gelagert. Das verwendete Material wurde vor der Nutzung mit 70 % Ethanol desinfiziert.

#### 4.4.1. Einfrieren von *Plasmodium falciparum*

Einfrierlösung:

20 % (v/v)	Glycerol
0.65 % (w/v)	NaCl
3 % (w/v)	D-Sorbitol
	in H <sub>2</sub> O (millipore)

Die Parasitenkultur (ca. 3 % Parasitämie) wurde zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 g), 5 min) und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde im gleichen Volumen Einfrierlösung vorsichtig aufgenommen, in ein Cryo-Vial überführt und im Flüssigstickstofftank gelagert.

#### 4.4.2. Auftauen von *Plasmodium falciparum*

Eine iRBC-Kultur wurde aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Kultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, tropfenweise mit 12 % NaCl-Lösung ((w/v), 0.2 Volumenäquivalente) versetzt und 2 min inkubiert. Anschließend wurde eine 1.6 % NaCl-Lösung ((w/v), 10 Volumenäquivalente) portionsweise hinzugegeben und zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in einer Lösung aus 0.9 % NaCl und 0.2 % Glucose ((w/v), 10 Volumenäquivalente) resuspendiert und zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min). Anschließend wurde mit vorgewärmtem, komplettem RPMI-Medium (10 mL, siehe 4.4.3) gewaschen, der Überstand verworfen, die iRBC mit frischen uRBC (250 – 500 µL) in komplettem RPMI-Medium (14 mL) in einer Petrischale resuspendiert und wie unter 4.4.3 kontinuierlich kultiviert.

#### 4.4.3. Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

*Plasmodium falciparum* wurden in RPMI-Medium 1640 1x (500 mL) unter Zugabe von 5 % AlbuMax™ II (50 mL), 1.35 µg/mL Gentamycin (30 µL, 50 mg/mL) und 0.2 mM Hypoxanthin (11 mL, 10 mM) kultiviert. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor Nutzung auf 37 °C vorgewärmt. Die Kulturen wurden bei 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C inkubiert. Standard-Kulturen bestehen aus einem Gesamtvolumen von 14 mL, mit einem Hämatokriten von 3.5 % (500 µL RBC). Versuchsabhängig wurden große Petrischalen mit 40 mL Medium und 1.5 mL RBCs verwendet. Das Medium wurde 6-Mal pro Woche gewechselt, die Parasitämie regelmäßig mittels Giemsa-Ausstrich überprüft und auf eine Parasitämie von 0.5 – 1 % eingestellt.<sup>257</sup>

#### 4.4.4. Giemsa-Ausstriche

Auf einem Glasobjektträger wurden ca. 10 µL Suspension einer Kultur ausgestrichen, luftgetrocknet, in MeOH (100 %, > 10 s) fixiert und nochmal luftgetrocknet. Anschließend wurden Objektträger in einer 10 % Giemsa-Lösung ((v/v), in H<sub>2</sub>O (millipore), > 30 min) inkubiert, mit Wasser abgewaschen und getrocknet. Die gefärbten RBC wurden unter einem Lichtmikroskop bei 100 x Vergrößerung

angeschaut. Zur Bestimmung der Parasitämie der Kultur wurde die Anzahl an RBC gezählt und die Parasitämie als Prozentsatz der iRBC relativ zur Gesamtzahl der RBC ausgedrückt.

#### 4.4.5. D-Sorbitol-Synchronisation von *Plasmodium falciparum*

Eine Plasmodienkultur wurde zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit einer 5 % D-Sorbitol-Lösung ((w/v), in H<sub>2</sub>O (millipore), 5 mL) versetzt, bei RT inkubiert (5 min) und zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit RPMI (komplett, 10 mL) gewaschen und anschließend mit frischem RPMI-Medium (komplett, 14 mL) weiter kultiviert.<sup>258</sup>

#### 4.4.6. Sterilisierung von Plasmid-DNA für *Plasmodium falciparum* Transfektion

Plasmid-DNA (230 µL, z.B. aus 4.3.7) wurde mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH = 5, 20 µL) angesäuert und kaltes EtOH (100 %, (v/v), 500 µL) zugegeben. Die Mischung wurde durch Vortexen gemischt und bei – 20 °C für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (4 °C, 18 000 x g, 30 min) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das DNA-Pellet in kaltem EtOH (70 %, (v/v), 500 µL) suspendiert. Anschließend wurde zentrifugiert (4 °C, 18 000 x g, 15 min), der Überstand verworfen und die DNA unter sterilen Bedingungen luftgetrocknet. Die DNA wurde in H<sub>2</sub>O oder inkomplettem Cytomix (< 50 µL) resuspendiert. Die in Wasser aufgenommene Probe wurde bei – 20 °C gelagert. In inkomplettem Cytomix aufgenommene DNA wurde anschließend direkt zur Transfektion genutzt.

#### 4.4.7. Transfektion von *Plasmodium falciparum*

Cytomix (inkomplett):

120 mM	KCl
0.15 mM	CaCl <sub>2</sub>
2 mM	EGTA
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
25 mM	HEPES
pH = 7.6	

Das Medium wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert.

Synchrone Schizonten iRBCs (100 µL) mit einer Parasitämie von mindestens 1 % wurden in RPMI-Medium (komplett, 8 mL) vorbereitet. uRBCs (2 mL) wurden mit Cytomix (inkomplett, 2x 6 mL) gewaschen (Zentrifugation 20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min). Sterile DNA (siehe 4.4.6) wurde mit Cytomix (inkomplett, 400 µL) und gewaschenen uRBCs (400 µL) gemischt. Die Suspension wurde auf zwei vorgekühlte Elektroporationsküvetten aufgeteilt und auf Eis (5 min) inkubiert. Jede Küvette wurde mit Programm U-033 oder X-001 (Lonza Nucleofector™2b) behandelt und anschließend auf Eis

(5 min) inkubiert. Die Zellen einer Transfektion wurden mittels RPMI-Medium (komplett, 4 mL pro Küvette) aus der Küvette in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit RPMI-Medium (10 mL) gewaschen. Das Zellpellet wurde zu der vorbereiteten iRBC-Kultur gegeben und 24 h im Inkubator gelagert. Die Kultur wurde anschließend mit RPMI-Medium (10 mL) gewaschen und RPMI-Medium (komplett, 14 mL) und frische uRBCs (250 – 500 µL) wurde zugegeben. Zusätzlich wurde das Selektionsmittel (z.B. 2 µg/mL Blasticidin (Stammlösung 10 µg/mL) oder 2 nM WR99210 (Stammlösung 20 µM) zugegeben. Die Kultur wurde wie in 4.4.3 kontinuierlich kultiviert. Gemäß Lonza Company 259,260

#### 4.5. Phänotypisierung

##### 4.5.1. Westernblotanalyse von *Plasmodium falciparum* Kulturen

Für die Herstellung von Westernblotlysate von *Plasmodium falciparum* Kulturen wurden Kulturen synchronisiert und in 40 mL Petrischalen kultiviert.

##### 4.5.1.1. Aufkonzentrieren von *Plasmodium falciparum* Parasiten im Schizontenstadium

PBS:

1.84 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
137 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
pH 7.4 @ 24 °C	

5x Lämmli:

50 mM pH = 6.8	Tris/HCl
10 % (w/v)	SDS
25 % (w/v)	Glycerol
0.1 % (w/v)	Bromphenolblau

Zum Aufkonzentrieren von Parasitenkulturen wurde *magnetic cell separation* (MACS) genutzt. Vorab wurde eine MACS CS Säule mit RPMI-Medium (10 mL) außerhalb des Magneten equilibriert. Dieser Schritt wurde mit der im Magneten montierten Säule wiederholt und die Säule 5 min mit RPMI-Medium inkubiert.

Vom Überstand einer synchronen Schizontenkulturen (40 mL Kulturen, Parasitämie 5 – 10 %) wurden 20 mL verworfen. Die iRBCs wurden im restlichen Medium resuspendiert und auf die im Magneten montierten Säule gegeben. Die Säule wurde mit RPMI-Medium (20 mL) gewaschen und zur Elution aus dem Magneten entfernt. Die Elution wurde mit RPMI-Medium (10 mL) durchgeführt.

Das Eluat wurde zentrifugiert (RT, 1970 rpm (755 x g), 5 min) und der Überstand verworfen. Für Westernblotproben wurde das Pellet in PBS (mit Proteaseinhibitor, 80 µL) aufgenommen und mit Lämmli (5x, mit 500 mM DTT, 20 µL) versetzt. Die Probe wurde aufgekocht (95 °C, 5 min) und bei – 80 °C gelagert.

Die Zellzahl wurde mittels Neubauerkammer und die Parasitämie mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt.

Die Säule wurde durch Spülen mit RPMI-Medium (50 mL) und H<sub>2</sub>O (millipore, entgast, steril, 50 mL) gewaschen, in H<sub>2</sub>O (millipore, entgast, steril) gelagert und mehrmals wiederverwendet.

#### 4.5.1.2. Saponinlyse von *Plasmodium falciparum*

Die Parasitenkultur wurde zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min) oder das Eluat aus 4.5.1.1 wurde verwendet. Das Zellpellet wurde mit PBS (10 mL) gewaschen und anschließend in PBS (5 – 10 mL) aufgenommen. Es wurde Saponin (Stammlösung 3 % (w/v), 1:100 Verdünnung) zugegeben und auf Eis inkubiert (mindestens 10 min). Anschließend wurde zentrifugiert (4 °C, 1800 x g, 10 min), der Überstand entfernt und mit kaltem PBS (2x 5 mL, 1x 1 mL) gewaschen. Das Pellet wurde in PBS (für Westernblotproben mit Proteaseinhibitor, 40 µL – 80 µL) aufgenommen. Die Probe wurde entweder im Flüssigstickstofftank eingefroren oder mit Lämmli (5x, 500 mM DTT, 1:5) versetzt, aufgekocht (95 °C, 5 min) und bei – 80 °C gelagert.

#### 4.5.2. SDS-Gele zur Proteinanalyse

SDS Trenngel 10 %:

H <sub>2</sub> O (millipore)	380 µL/mL	
Acrylamid-Mix (30 %)	340 µL/mL	10 %
Tris (1.5 mM (w/v), pH = 8.8)	260 µL/mL	0.4 mM
SDS (10 % (w/v))	20 µL/mL	2 %
APS (10 % (w/v))	20 µL/mL	2 %
TEMED	0.4 µL/mL	0.4 %

SDS Sammelgel:

H <sub>2</sub> O (millipore)	136 µL/mL	
Acrylamid-Mix (30 %)	34 µL/mL	1 %
Tris (1.0 mM (w/v), pH = 6.8)	26 µL/mL	0.02 mM
SDS (10 % (w/v))	2 µL/mL	0.2 %
APS (10 % (w/v))	2 µL/mL	0.2 %
TEMED	0.2 µL/mL	0.2 %

SDS-PAGE Laufpuffer:

25 mM	Tris/HCl
250 mM (w/v)	Glycin
0.1 % (w/v)	SDS

Die in 4.5.1 hergestellten Proben für die Westernblotanalysen wurden durch drei Einfrier-Auftauzyklen lysiert. Anschließend wurden die Proben aufgeköcht (95 °C, 5 min) und ca.  $10^8$  Parasiten auf das SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde bei 25 mA (pro Gel) für ca. 1 h laufen gelassen.

#### 4.5.3. Westernblotanalyse von *Plasmodium falciparum* Zelllysaten

Blotting-Puffer:

24.76 mM	Tris
0.193 M	Glycerin
20 % (v/v)	MeOH

TBS:

19.81 mM	Tris
150 mM	NaCl

pH = 7.4

TBST/T:

19.81 mM	Tris
150 mM	NaCl
2 % (v/v)	Triton-X 100
0.5 % (v/v)	Tween

pH = 7.4

ECL1:

100 mM	Tris pH = 8.5
2.5 mM	Luminol
0.4 mM	p-Coumarin

ECL2:

100 mM	Tris pH = 8.5
5.9 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Eine SDS-Gelelektrophorese wurde wie in 4.5.2 durchgeführt. Das Gel wurde mit H<sub>2</sub>O (millipore) gewaschen. Es wurden mit MeOH aktivierte PVDF-Membranen verwendet. Es wurde mit kaltem Blotting-Puffer geblottet (10 °C, 100 V pro Gel, 1.5 h oder 15 V, über Nacht pro Gel). Anschließend wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O (millipore) gewaschen und der Übertrag mittels Ponceau-Färbung überprüft. Die Membran wurde in TBS (1 h) und Blocking-Lösung (5 % Milchpulver in TBS, 1 h) equilibriert. Es wurde mit Primärantikörper (in Blocking-Lösung siehe Tabelle 8, 1 h bei RT oder bei 10 °C über Nacht) inkubiert. Anschließend wurde mit TBST/T (10 min, 2x) und TBS (10 min) gewaschen, mit Sekundärantikörper (in Blocking-Lösung, siehe Tabelle 8, 1 h bei RT) inkubiert und mit TBS (10 min) und TBST/T (10 min, 2x) gewaschen.

Zur Detektion wurden die ECL Lösungen (1:1) und der INTAS ECL Chemostar Imager genutzt.

#### 4.5.4. Immunfluoreszenzanalyse von fixierten *Plasmodium falciparum*

8-Well-Platten wurden mit Concanavalin A (5 mg/mL, 80 µL) beschichtet und inkubiert (37 °C, 20 min). Anschließend wurde mit PBS (steril, 200 µL 2x) gewaschen. Zellen einer resuspendierten Parasitenkultur (~150 µL/well) wurden zentrifugiert (RT, 800 x g, 30 s) und mit vorgewärmtem RPMI (200 µL 2x) gewaschen. Die Zellen wurden in RPMI-Medium aufgenommen (150 µL), in die mit Concanavalin A beschichteten Wells gegeben und inkubiert (37 °C, 10 min). Die Wells wurden mit RPMI (200 µL 5 – 7x) gewaschen, bis sich eine Monolayer gebildet hat. RPMI-Medium (komplett, 200 µL) mit MitoTrackerRed (50 nM) oder MitoTrackerOrange (100 nM) wurden zugegeben und inkubiert (37 °C, 20 min – 2 h). Es wurde mit RPMI (komplett, 200 µL 5x) gewaschen. Die Wells wurden mit PBS (steril, 200 µL, 3x) gewaschen, mit vorgewärmter Paraformaldehyd-Lösung (4 % in PBS (w/v), 37 °C, 20 min) inkubiert und mit PBS (200 µL) gewaschen. Anschließend wurde mit Triton X-100 (0.1 % in PBS (v/v), RT, dunkel, 15 min) inkubiert und mit PBS (200 µL, 3x) gewaschen. Es wurde mit BSA (3 % in PBS (w/v), RT, dunkel, 200 µL, 30 min – 1 h) und anschließend mit Primärantikörper (Anti-HA-Biotin High Affinity (3F10) in 3 % BSA/PBS (w/v), RT, dunkel, schwenken, 100 – 200 µL, 2 h) inkubiert. Es wurde mit Tween-20 (0.5 % in PBS (v/v), RT, dunkel, schwenken, 200 µL, 5 – 10 min 3x) gewaschen und mit Sekundärantikörper und DAPI (Alexa 488 goat anti rat IgG (H+L) und 300 nM DAPI siehe Tabelle 8 in 3 % BSA/PBS (w/v), RT, dunkel, schwenken, 100 – 200 µL, 30 min – 1 h) inkubiert. Die Wells wurden mit Tween-20 (0.5 % in PBS (v/v), RT, dunkel, schwenken, 200 µL, 5 – 10 min 2x) und PBS (RT, dunkel, schwenken, 200 µL, 5 – 10 min) gewaschen. Anschließend wurde mit PFA (4 % in PBS (w/v), RT, dunkel, 110 µL, 10 – 15 min) inkubiert, mit PBS (200 µL) gewaschen und die Proben wurden in PBS (200 µL) bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Zur Immunfluoreszenzmessung wurde das Konfokalmikroskop Axio Observer, LSM 880 Mikroskop von Zeiss verwendet.

#### 4.5.5. Wachstumsanalyse von *Plasmodium falciparum*

Zur Wachstumsanalyse von *Plasmodium falciparum* Kulturen wurden asynchrone Kulturen auf eine Parasitämie von 0.1 % eingestellt und kontinuierlich kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt und täglich ggf. 5 mM D-Alanin (5 µL/mL Stock 1 M in RPMI) bzw. Blastocidin (4 oder 15 µg/mL) zugegeben. Die Parasitämie wurde alle 24 h von > 2000 RBCs und einer Abweichung von maximal 0.1 % mittels Giemsa-Ausstrichen (4.4.4) ermittelt.

#### 4.5.6. IC<sub>50</sub>-Messungen mit *Plasmodium falciparum* Kulturen

Eine 0.5 %ige Parasitenkultur wurde zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min) und der Überstand verworfen. 300 µL wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde RPMI-Medium (AlbuMax-

frei (2.7 µg/mL Gentamycin (50 mg/mL), 0.2 mM Hypoxanthin (10 mM)), 9.7 mL) und AlbuMax™ II-Lösung (10 % (w/v) in RPMI-Medium, 1 mL) zugegeben. Zusätzlich wurde eine Mischung mit uRBC (300 µL) hergestellt. Eine Stammlösung der zu testenden Substanz wurde in RPMI-Medium (AlbuMax-frei) vorbereitet. In sterilen 96-Well-Platten wurde RPMI-Medium (AlbuMax-frei, 50 µL) vorgelegt. In den äußeren Wells wurde die uRBC-Lösung (50 µL) zugegeben. In Well B2 – G2 wurde die Testsubstanz-Lösung (z.B. 25 µL) zugegeben und mittels Übergabe des Mediums in die folgenden Wells verdünnt (bis z.B. B10). Aus Well 10 wurde das zugegebene Volumen verworfen, sodass in Well 11 keine Substanzlösung enthalten ist. Den vorbereiteten Parasitenkulturen wurde ggf. Blasticidin und D-Ala (110 µL einer 1 M D-Ala Stammlösung (in RPMI), Endkonzentration nach Verdünnung in Wells 5 mM) zugegeben. Hierbei wurde die doppelte Konzentration der gewünschten Endkonzentration verwendet. Anschließend wurde die Parasitenlösung (50 µL, entspricht 1:1 Verdünnung) zugegeben, 72 h unter Kultivierungsbedingungen inkubiert und bei – 80 °C für mindestens 1 h eingefroren.

Zur Analyse von Split-DHFR Kulturen wurden 96-Well-Platten mit einer Konzentrationsreihe WR99210 (Stock 50 nM, 1:3 Verdünnung) wie oben beschrieben hergestellt. Anschließend wurde mit WR inkubiert (1 h, Standardkultivierungsbedingungen) und mit RPMI-Medium (100 µL, 3x) gewaschen. Die Platten wurden 72 h ohne Medienwechsel unter Kultivierungsbedingungen inkubiert und anschließend bei – 80 °C gelagert.

#### 4.5.6.1. SYBR™Green I-Assay

SYBR™Green I Lyse-Puffer:

5 mM	2 Na EDTA 2 H <sub>2</sub> O
0.08 % (v/v)	Triton X-100
0.008 % (w/v)	Saponin
20 mM	Tris Puffer Lösung
pH = 7.5	

Die 96-Well-Platten wurden 1 h aufgetaut. SYBR™Green I Lyse-Puffer (11 mL pro 96-Well Platte) wurde SYBR™Green I Nucleic Acid Gel Stain (10000 x, 1.2 µL pro 96-Well Platte) hinzugefügt. Mittels CLARIOstar wurde der Puffer (100 µL) in jedes Well gegeben und gemischt. Die Platten wurden 1 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mittels CLARIOstar-Photometer (Ex: 485 nm, Em: 535 nM) gemessen.

#### 4.5.7. Glutathionbestimmung des Erythrozyten mit *Plasmodium falciparum* Stämmen

Zur Analyse des Glutathiongehaltes im Erythrozyten wurden 2 x 1 mL iRBC einer synchronen 5 % Schizontenkultur über eine MACS CS Säule aufkonzentriert (4.5.1.1). Die Erythrozytenmembran der erhaltenen, vereinigten Pellets wurde mittels Saponinlyse (250 mL PBS, 25 µL 0.5 % Saponin, 10 min auf Eis) aufgeschlossen (4.5.1.2) und zentrifugiert (4 °C, 1800 x g, 10 min). Es wurden 10 µL der Probe zur Hämbestimmung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der restliche Überstand wurde mit

46 mM Sulfosalicylsäure gefällt, zentrifugiert (4 °C, 13000 x g, 30 min) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei – 20 °C gelagert. <sup>261 modifiziert</sup>

DTNB-Puffer:

100 mM	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
1 mM	EDTA
0.2 mM	β-NADPH

pH = 7.4

Die bereits vorbereitete, gefällte Probe wurde aufgetaut und eine Verdünnungsreihe von GSH (2.5 mM bis ~0.06 mM, 1:10) in PBS wurde vorbereitet. Der DTNB-Puffer wurde frisch mit 0.18 mM DTNB und 0.5 µM GR versetzt. Die Probe (40 µL) und jede Konzentration der GSH-Reihe (40 µL) wurde mit vollständigem Assaypuffer (360 µL) gemischt und 1 h inkubiert. Als Blank wurde PBS (40 µL) mit Assaypuffer (360 µL) angesetzt und ebenfalls inkubiert. Die Absorption bei 405 nm wurde gemessen und der Gesamtglutathiongehalt der Probe aus der graphischen Auswertung der GSH-Konzentrationsreihe ermittelt.

Zur Normalisierung des Glutathiongehaltes wurde die Probe zur Hämbestimmung aufgetaut, mit 390 µL PBS versetzt und die Absorption bei 450 und 545 nm gemessen.

#### 4.5.8. Selektion und Isolierung von genomischer DNA

Parasiten mit erfolgreicher Selektion für ein SLI-Plasmid (4.4.7) wurden weiter zur Selektion der Integration genutzt. Bei einer Parasitämie von 3 – 5 % wurde die Kultur zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min) und in eine neue Kulturschale überführt. Anschließend wurde 10 – 14 Tage mit 900 nM DSM1 inkubiert und unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach 10 – 14 Tagen wurde zentrifugiert (20 °C, 1243 rpm (300 x g), 5 min) und die Kultur wurde in einer neuen Kulturschale 2 – 4 Wochen ohne DSM1 kultiviert. In dieser Zeit sollte es zum Wachstum der Parasiten kommen.

Bei erfolgreicher Selektion wurden DNA-Proben zur Durchführung einer analytischen PCR mit genomischer DNA genommen. Hierfür wurden iRBCs (100 µL) mit einer Parasitämie von 1 – 3 % mit 500 µM EDTA (in H<sub>2</sub>O (millipore), 1.9 mL) durch Vortexen gemischt und auf Eis inkubiert (10 min). Anschließend wurde zentrifugiert (RT, 12000 x g, 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet in TE-Puffer (40 µL) aufgenommen. Es wurde Proteinase K (22 mg/mL in TE Puffer, 10 µL) zugegeben, inkubiert (56 °C, 400 rpm, 1 h) und inaktiviert (80 °C, 10 min). Nach Zentrifugation (12000 x g, 5 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Probe bei – 20 °C gelagert.

TE-Puffer (bei 4 °C gelagert):

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
pH = 7.6	

Diese Proben wurden zur Analyse der genomischen DNA mittels PCR genutzt. Bei Erhalt einer Mischkultur wurde der Kultur erneut das Selektionsmittel der Plasmidselektion (WR oder Blastocidin) zugegeben und nach 7 Tagen wurde erneut DNA isoliert.

#### 4.5.9. WR-Selektion und Wachstumsanalyse von *Plasmodium falciparum* Kulturen

Eine Kultur mit einer Parasitämie von 0.5 % wurde in 6-Well-Platten oder in Petrischalen aufgeteilt. Es wurden unterschiedlichen Blastocidin Konzentrationen (2 – 10 µg/mL) und WR (4 nM) zugegeben. Als Negativkontrollen wurden eine Kultur ohne WR99210 und eine 3D7 WT Kultur mit WR99210 mitgeführt. Die Platten wurden kontinuierlich kultiviert und die Parasitämie mittels Giemsa-Ausstrich bestimmt.



## 5. Ergebnisse

### 5.1. STRESSistance

#### 5.1.1. Klonierung der *Toxoplasma gondii* Katalase und *Rhodotorula gracilis* D-Aminosäureoxidase Konstrukte

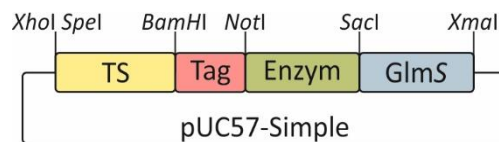
Zur Untersuchung der Oxidativen-Stress-Hypothese in *Plasmodium falciparum* wurden zwei Redoxenzyme gewählt, welche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzieren bzw. detoxifizieren. Es wurde eine Katalase aus *Toxoplasma gondii* und die D-Aminosäureoxidase aus *Rhodotorula gracilis* gewählt. Wichtige Kriterien für die Wahl der Enzyme waren das pH-Optimum, Robustheit, Reaktionsart, bisherige Studienlage und die Möglichkeit es markieren zu können.

Die Katalase von *Toxoplasma gondii* (TGME49\_232250) hat hohe Ähnlichkeit zur humanen tetrameren Katalase. Die H64N-Mutante (siehe Abbildung 4 A H128) wurde PCR-amplifiziert und als inaktive Negativkontrolle genutzt.<sup>133,135,143</sup> Die D-Aminosäureoxidase aus *Rhodotorula gracilis* (ATCC 26217) generiert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach der Zugabe von D-Aminosäuren.<sup>155</sup> Die DAAO aus *Rhodotorula gracilis/toruloides* hat ein C-Terminales SKL-Motiv welches für den Transport in Peroxisomen verantwortlich ist,<sup>154</sup> weshalb der Lysin-Rest in einen Glycin-Rest geändert wurde. Im Vergleich zu anderen DAAOs ist die der Hefe *Rhodotorula gracilis* stabil und aktiv bei einer Temperatur von 37 °C,<sup>150</sup> hat jedoch bei pH = 6 nur eine Aktivität von unter 25 %.<sup>150</sup> In heterologen, menschlichen Zellen und *in vitro* ist D-Alanin ein gutes Substrat für die RgDAAO.<sup>155</sup> Ebenso kann RgDAAO N-Terminal markiert werden, was für HyPer-RgDAAO-Konstrukte bereits getestet wurde.<sup>262</sup> Es wurde neben dem aktiven Enzym die inaktive Mutante RgDAAO<sup>R285A</sup> (siehe Abbildung 5 A R285) als Negativkontrolle genutzt.<sup>171</sup>

Als Targetingsequenz für die Verdauungsvakuole wurden die 70 N-terminalen Reste von Plasmeptin IV (PF3D7\_1407800/PF14\_0075) verwendet. Plasmeptin IV hat einen Typ II Membrananker. Die Targetingsequenz von Plasmeptin IV wurde bereits für Transportstudien von GFP genutzt.<sup>263</sup> Zum Targeting der mitochondrialen Matrix wurden die 68 N-terminalen Aminosäurereste des *Plasmodium falciparum* heat shock protein 60 (PfHsp60) (PF3D7\_1015600) genutzt. Als Sequenz für den Intermembranraum des Mitochondriums wurden die Sequenzen von zwei unterschiedlichen Proteinen getestet. Es wurden die N-terminalen 162 Aminosäuren der *Plasmodium falciparum* Dihydroorotatdehydrogenase (PF3D7\_0603300 type 2) oder die 57 N-terminalen Aminosäuren der *Plasmodium falciparum* NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase (PF3D7\_1367500) genutzt. Zum Erzielen einer cytosolischen Lokalisation wurde mittels PCR ein ATG statt der Targetingsequenz amplifiziert. Die Sequenzen wurden von GenScript für die Codonhäufigkeit von *Plasmodium falciparum* optimiert und mit passenden Schnittstellen für die Herstellung eines modularen Klonierungsplans versehen. Zusätzlich zu den Targetingsequenzen wurde N-Terminal zum jeweiligen Enzym ein 3xHA- oder

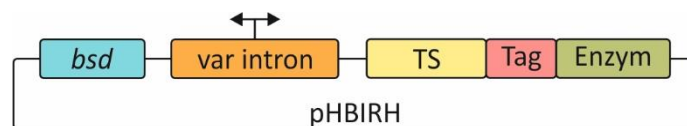
roGFP2-Tag eingefügt. An die Sequenz des roGFP2 wurde ein 30 Aminosäuren langer Glycin/Serin-Linker angefügt.<sup>264</sup> Zusätzlich wurde an das 3' Ende der DNA-Sequenz des Enzyms die Sequenz des GlmS-Systems angefügt, mit welcher die Menge an translatierter RNA kontrolliert werden kann. Außerdem wurde eine GlmS<sup>M9</sup>-Mutante als Negativkontrolle genutzt.<sup>265,266</sup>

Zwischen die Sequenzen der Module: Targetingsequenz, Tag, Enzym und GlmS wurden passende Restriktionsschnittstellen zur Klonierung eingefügt: vor die Gensequenz der Targetingsequenz eine *XhoI*- und *SpeI*-Schnittstelle, zwischen Targetingsequenz und Tag eine *BamHI*-Schnittstelle und zwischen der Gensequenz des Tags und Enzyms eine *NotI*-Schnittstelle mit einem zusätzlichen Codon für Adenin, um im Leseraster zu bleiben. Nach der Gensequenz des Enzymes wurden die Basen TAA als Stopcodon und eine *SacI*-Schnittstelle angefügt. Nach der GlmS-Sequenz wurde die *XmaI*-Schnittstelle geplant (Abbildung 10).



**Abbildung 10** Schematische Darstellung des genutzten pUC57-Simple-Plasmids mit Genabschnitten kodierend für die Targetingsequenz (TS), den Tag (3xHA oder roGFP2) und heterologe Redoxenzyme. Die genutzten Restriktionsschnittstellen sind angedeutet.

Die für *Plasmodium falciparum* Codon-optimierten Sequenzen wurden von der Firma GenScript in den kommerziellen pUC57-Simple-Vektor kloniert. In diesem wurden die erforderlichen Kombinationen aus den Genabschnitten kodierend für die Targetingsequenz, den Tag und das Enzym kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte für eine Proteinlokalisierung in der mitochondrialen Matrix, dem Intermembranraum des Mitochondriums und der Verdauungsvakuole mittels Restriktionsverdau mit *SpeI* und *SacI* und anschließender Ligation in den pHBIRH-Vektor erzeugt (Abbildung 11). Für eine Lokalisation in das Cytosol wurde das Konstrukt mittels PCR amplifiziert und das Startcodon ATG ohne anhängende Targetingsequenz angefügt.



**Abbildung 11** Schematische Darstellung des genutzten pHBIRH-Plasmids mit Blasticidin-Desaminase-Gen (*bsd*), dem bidirektionalen Promotor (*var intron*) und den Genabschnitten kodierend für die Targetingsequenz (TS), den Tag (3xHA oder roGFP2) und das heterologe Redoxenzym.<sup>267</sup>

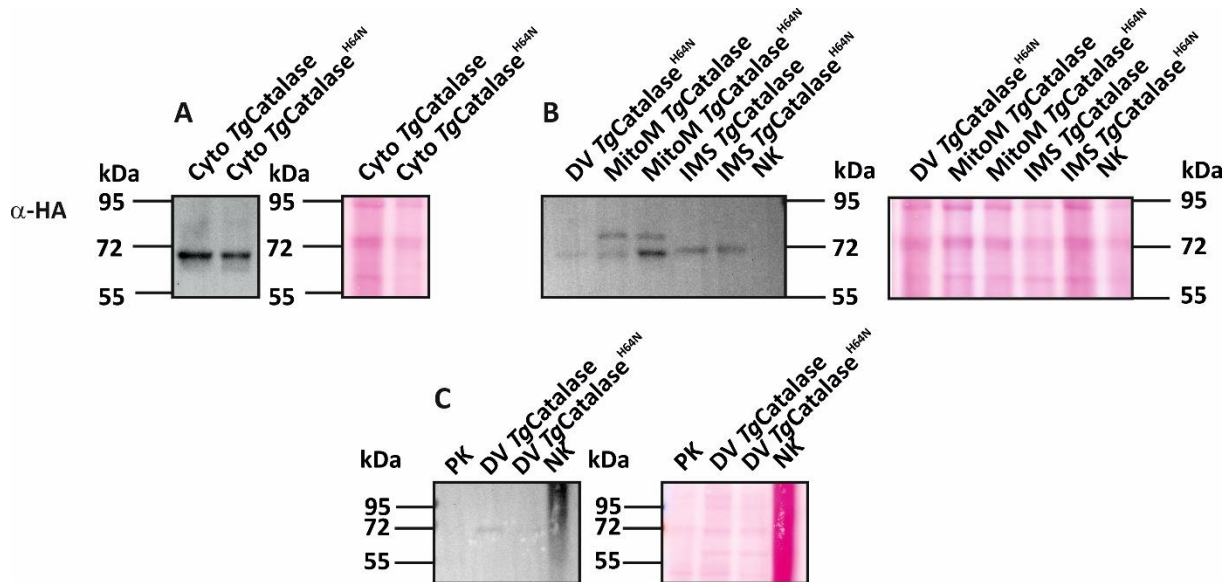
Es wurden Plasmide für eine Proteinlokalisierung im Cytosol, in der Verdauungsvakuole, der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranraum der Mitochondrien (entweder mit 3xHA-Tag oder der Sequenz für roGFP2) für *Toxoplasma gondii* Katalase<sup>WT</sup> oder der H64N-Mutante kloniert. Die Targetingsequenz der DHODH wurde nur für Plasmide mit Genabschnitten für den 3xHA-Tag und Katalase<sup>WT</sup> genutzt.

Ebenfalls wurden alle beschriebenen Plasmide mit der Sequenz der DAAO bzw. DAAO<sup>R285A</sup> kloniert. Hier wurden die Plasmide mit Genabschnitten für die Targetingsequenz der NADH-Cytochrom *b*<sub>5</sub>-Reduktase von Eileen Bischoff kloniert.<sup>268</sup>

Alle hergestellten Plasmide wurden erfolgreich korrekt sequenziert (Anhang 8.1.1) und in *Plasmodium falciparum* 3D7 WT transfiziert.

### 5.1.2. Produktion der heterologen Redoxenzyme in *Plasmodium falciparum*

Die Expression des Plasmids kodierend für die heterologe Katalase und die inaktive Punktmutante in den *Plasmodium falciparum* 3D7 Parasiten und die Produktion des Enzyms wurde über Westernblotanalyse überprüft. Hierfür wurden die Stämme mit 3xHA-Tag genutzt. Die erfolgreiche Produktion der heterologen Katalase wurde für alle vier Lokalisationen nachgewiesen.

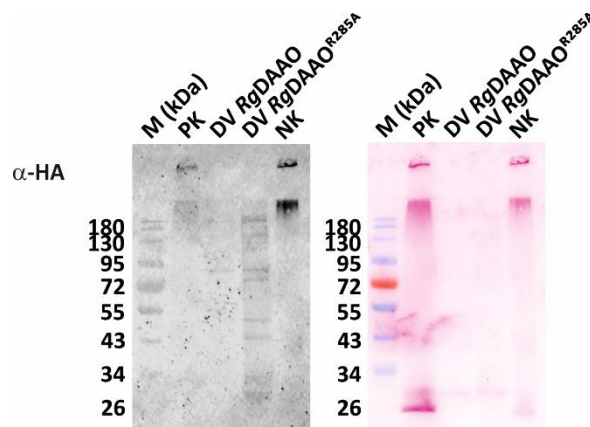


**Abbildung 12** Westernblot der Stämme mit Plasmid kodierend für die heterologe Katalase oder die inaktive Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> im Cytosol (A), der mitochondrialen Matrix (B), dem Intermembranraum des Mitochondriums (B) oder der Verdauungsvakuole (B, C) unter 4 µg/mL Blasticidin. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm mit dem pHBRH-Expressionsvektor mit Luciferasegen genutzt. Erwartete Größen: prozessiert: 60 kDa; unprozessiert: MitoM 68 kDa, IMS 67 kDa, DV 69 kDa.

In allen Stämmen konnte eine Bande bei ca. 70 kDa beobachtet werden (Abbildung 12). Für das prozessierte Protein war eine Bande bei 60 kDa zu erwarten. Aufgrund der hohen Bandenintensität bei 70 kDa wurde von einem veränderten Laufverhalten des Proteins ausgegangen und das prozessierte Protein wurde der Bande bei 70 kDa zugeordnet. Für die Stämme mit der heterologen Katalase im Cytosol konnte eine äquivalente Produktion im Katalase<sup>WT</sup>- und dem Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm beobachtet werden (Abbildung 12 A). Bei den Stämmen mit der Targetingsequenz für die mitochondriale Matrix (Abbildung 12 B) wurde neben der prozessierten Größe eine weitere Bande oberhalb von 72 kDa beobachtet. Diese wurde dem unprozessierten Protein mit einer Größe von 68 kDa und einem veränderten Laufverhalten zugeordnet. In diesem Katalase-Stamm wurde eine annähernd äquivalente Produktion von prozessiertem und unprozessiertem Produkt beobachtet. Im Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm mit mitochondrialer Matrix-Targetingsequenz wurde ca. die doppelte Menge an prozessiertem Protein verglichen mit dem unprozessiertem Protein ermittelt. Die Stämme mit der heterologen Katalase mit Targetingsequenz der NADH-Cytochrom *b*<sub>5</sub>-Reduktase für den Intermembranraum des Mitochondriums (Abbildung 12 B) hatten im Westernblot eine äquivalente Bandenintensität bei ca. 70 kDa. In der Ponceau-Färbung war eine intensivere Färbung in der Katalase<sup>H64N</sup>-Probe zu erkennen.

Die Stämme mit der Targetingsequenz der Dihydroorotatdehydrogenase für den Intermembranraum des Mitochondriums wurden verworfen, da hier die Produktion der heterologen Proteine nicht nachgewiesen werden konnte. Mit den Stämmen, welche das heterologe Protein mit der Targetingsequenz für die Verdauungsvakuole (Abbildung 12 B, C) tragen, wurde nur ein schwaches Signal bei ca. 70 kDa erhalten, welches nicht in jeder Probenaufarbeitung sichtbar war.

Die Produktion der heterologen DAAO mit den verschiedenen Targetingsequenzen wurde für cytosolische Lokalisation, mitochondriale Matrix und Intermembranraum des Mitochondriums von Eileen Bischoff durchgeführt und sind in ihrer Arbeit dargestellt.<sup>268</sup>



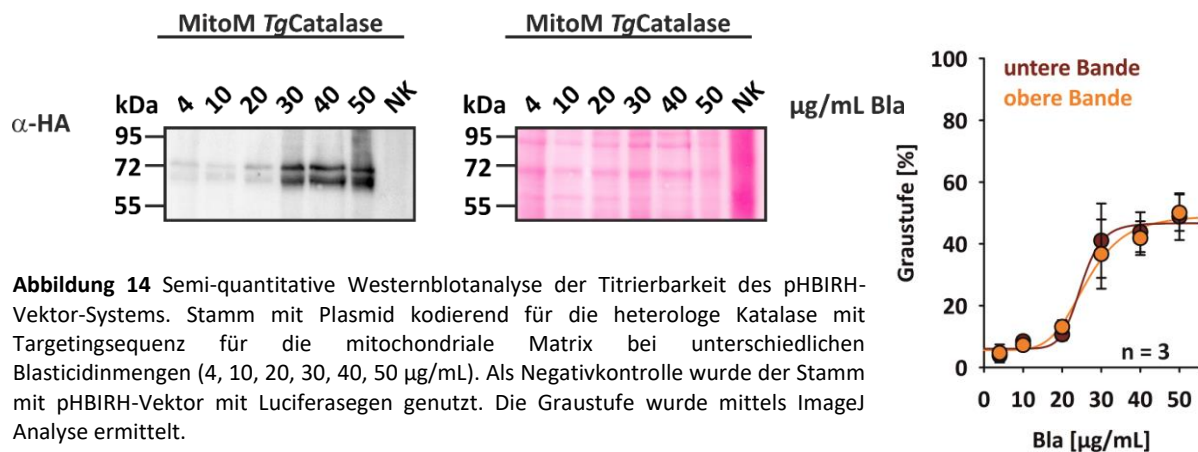
**Abbildung 13** Westernblot der Stämme mit Plasmid kodierend für die heterologe DAAO oder die inaktive Punktmutante DAAO<sup>R285A</sup> in der Verdauungsvakuole. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm mit dem pHBRH-Expressionsvektor mit Luciferasegen genutzt (4 µg/mL Blasticidin). Erwartete Größen: prozessiert: 44 kDa; unprozessiert: DV 52 kDa, PK: 68/60 kDa (PK: MitoM *TgCatalase*).

In dem Stamm der heterologen DAAO mit Targetingsequenz für die Verdauungsvakuole wurde keine passende Bande bei 44 kDa für das prozessierte Protein oder bei 52 kDa für das unprozessierte Protein beobachtet (Abbildung 13). Im Stamm der Punktmutante DAAO<sup>R285A</sup> mit Targetingsequenz für die Verdauungsvakuole wurden mehrere Banden detektiert, welche nicht in der Negativkontrolle beobachtet wurden. Unter diesen konnte auch die Bande für das prozessierte und unprozessierte Protein bei 44 bzw. 52 kDa vermutet werden. Diese Westernblotanalyse zeigte jedoch kein eindeutiges Ergebnis, da auch die Positivkontrolle (MitoM *TgCatalase*) bei 68 bzw. 60 kDa nicht beobachtet wurde. Die Produktion der heterologen DAAO in der Verdauungsvakuole wurde nicht erfolgreich detektiert.

Um die Produktion der roGFP2-Katalase-Konstrukte in 3D7 Parasiten zu überprüfen, wurde der primäre Antikörper aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. A. Reichert genutzt. Hiermit wurde kein Ergebnis erlangt, weshalb die Westernblotergebnisse dieser Versuche nicht weiter abgebildet sind.

Zur Produktion der heterologen Proteine in *Plasmodium falciparum* wurde der spezialisierte pHBRH-Expressionsvektor genutzt. Dieser hat die spezielle Eigenschaft, dass die Menge an produziertem Plasmid durch Änderung der Menge der Selektionssubstanz, geändert werden kann. Diese Eigenschaft

wurde über semi-quantitative Westernblotanalyse überprüft (Abbildung 14). Hierfür wurde der Stamm mit der heterologen Katalase mit Targetingsequenz für die mitochondriale Matrix mit unterschiedlichen Mengen an Blastocidin selektioniert. Es wurden Stämme mit 4, 10, 20, 30, 40 und 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blastocidin genutzt und äquivalente Mengen der Proben für die Westernblotanalyse verwendet. Die Graustufe und deren Prozent wurden mittels ImageJ ermittelt und auf die entsprechende Bande der Ponceaufärbung normalisiert.



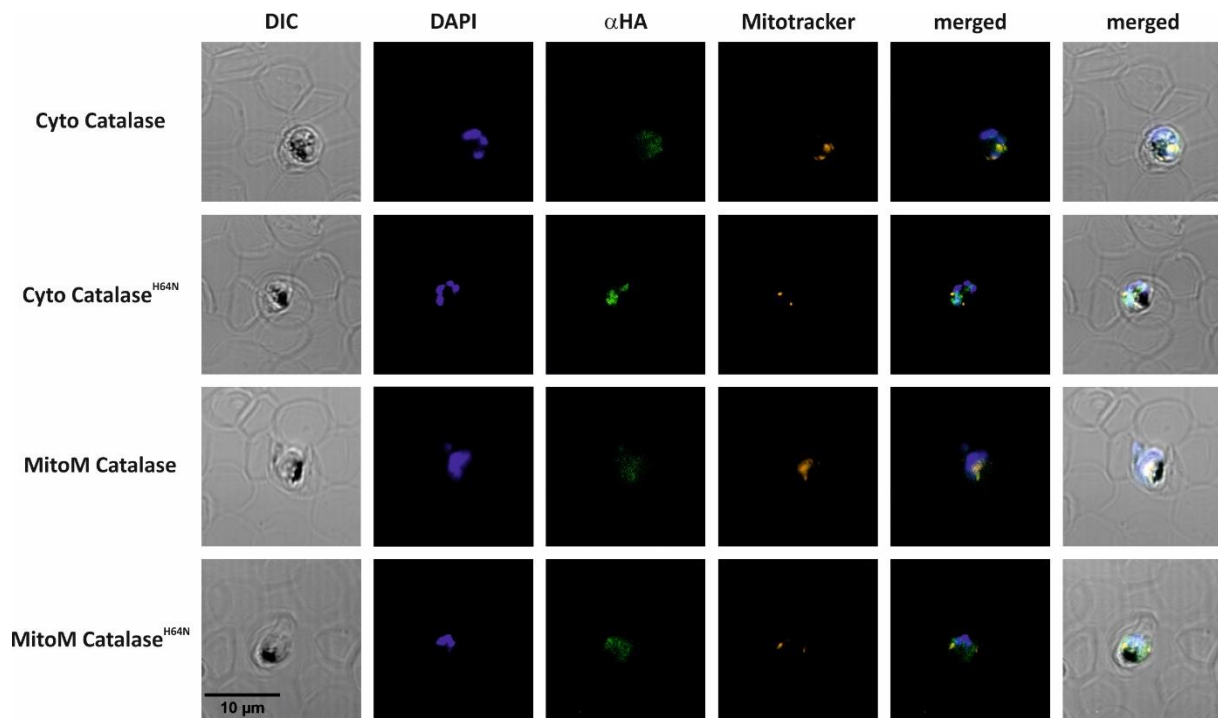
**Abbildung 14** Semi-quantitative Westernblotanalyse der Titrierbarkeit des pHBIRH-Vektor-Systems. Stamm mit Plasmid kodierend für die heterologe Katalase mit Targetingsequenz für die mitochondriale Matrix bei unterschiedlichen Blastocidinmengen (4, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Als Negativkontrolle wurde der Stamm mit pHBIRH-Vektor mit Luciferasegen genutzt. Die Graustufe wurde mittels ImageJ Analyse ermittelt.

Es konnte ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen der Blastocidinmenge, welche für die Selektion genutzt wurde, und der Menge an produziertem Protein ermittelt werden. Diese Eigenschaft wurde für die prozessierte und unprozessierte Bande ermittelt und es wurde keine Akkumulation des unprozessierten Proteins beobachtet.

Es wurde die titrierbare Produktion der heterologen Katalase und Katalase<sup>H64N</sup> im Cytosol, der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranraum des Mitochondriums in *Plasmodium falciparum* erfolgreich etabliert.

### 5.1.3. Lokalisation von heterologer *Toxoplasma gondii* Katalase und *Rhodotorula gracilis* D-Aminosäureoxidase in *Plasmodium falciparum*

Die Lokalisation der heterologen Redoxenzyme Katalase und DAAO mit unterschiedlichen Targetingsequenzen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 15).



**Abbildung 15** Immunfluoreszenzmikroskopie der Stämme mit Katalase oder inaktiven Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> im Cytosol oder der mitochondrialen Matrix. Die Stämme wurden mit 4 µg/mL Blasticidin selektioniert, mit Paraformaldehyd fixiert und mit MitoTracker orange CMTM Ros, αHA Antikörper, DAPI und Alexafluor 488 Sekundärantikörper behandelt.

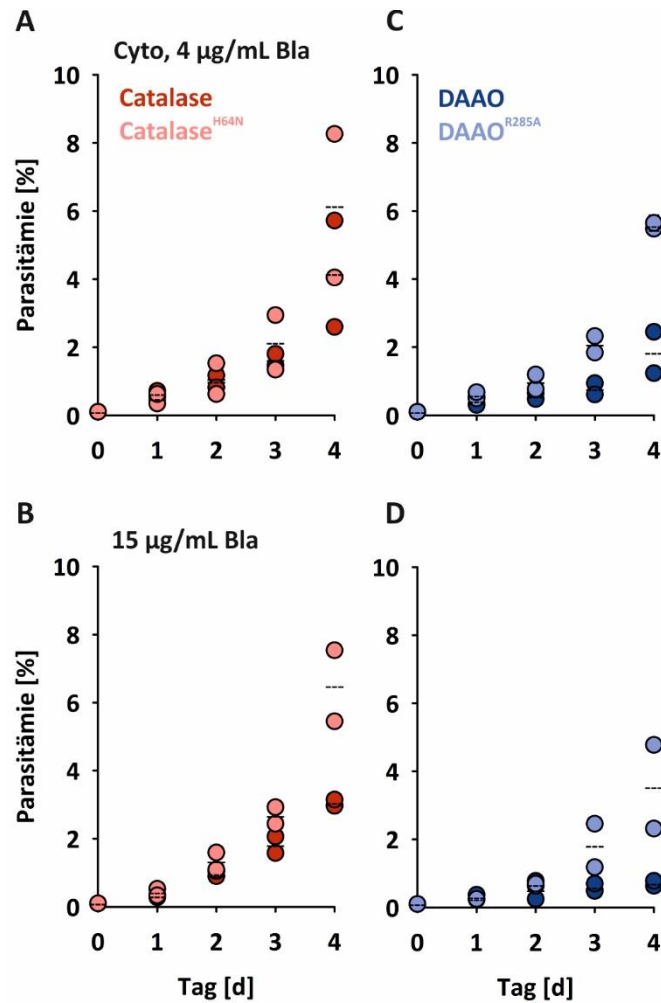
Die mittels Antikörperfärbung erhaltenen Signale konnten keine eindeutige Lokalisation der heterologen Katalase im Cytosol bzw. der mitochondrialen Matrix nachweisen. Durch sehr starke Intensität des MitoTracker-Signals kann von einem Durchscheinen in das αHA-Signal ausgegangen werden. Durch die hier abgebildeten Ergebnisse konnte bisher keine Aussage über die Lokalisation getroffen werden.

Die Lokalisation der heterologen DAAO im Cytosol und der mitochondrialen Matrix wurde von Eileen Bischoff erfolgreich in allen Stadien nachgewiesen.<sup>268</sup>

#### 5.1.4. Wachstumsanalyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit heterologen Redoxenzymen

Zur Untersuchung der Relevanz von  $H_2O_2$  für den Organismus *Plasmodium falciparum* wurden 3D7 Stämme mit heterologen Redoxenzymen in verschiedenen Kompartimenten auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. Hierfür wurden Stämme mit der Katalase von *Toxoplasma gondii* zur Verminderung der  $H_2O_2$ -Mengen und Stämme mit der DAAO von *Rotodurula gracilis* mit erhöhten  $H_2O_2$ -Mengen auf ihr Wachstumsverhalten analysiert. Den beiden Redoxenzyme wurden im Cytosol der Verdauungsvakuole, der mitochondrialen Matrix oder dem Intermembranraum des Mitochondriums lokalisiert und sind mit einem 3xHA-Tag versehen.

Die Arbeitsgruppe von Dr. Tobias Dansen des *University Medical Center Utrecht* hat die *Oxygen consumption rate* der hier genutzten DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> gemessen und konnte zeigen, dass die DAAO, nicht aber die DAAO<sup>R285A</sup>-Mutante, aktiv und durch D-Alanin-Zugabe induzierbar ist.



**Abbildung 16** Wachstumskurven der Stämme mit heterologer Katalase (A/B rot) oder heterologer D-Aminosäureoxidase (C/D blau) oder den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> (A/B hellrot) und DAAO<sup>R285A</sup> (C/D hellblau) im Cytosol. Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blasticidin durchgeführt. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von ≤ 0.1 %. Die Datenpunkte bilden eigenständige Versuche ab. Der Mittelwert der Replikate wird durch das gestrichelte Symbol dargestellt. (n = 2; n = biologische Replikate).

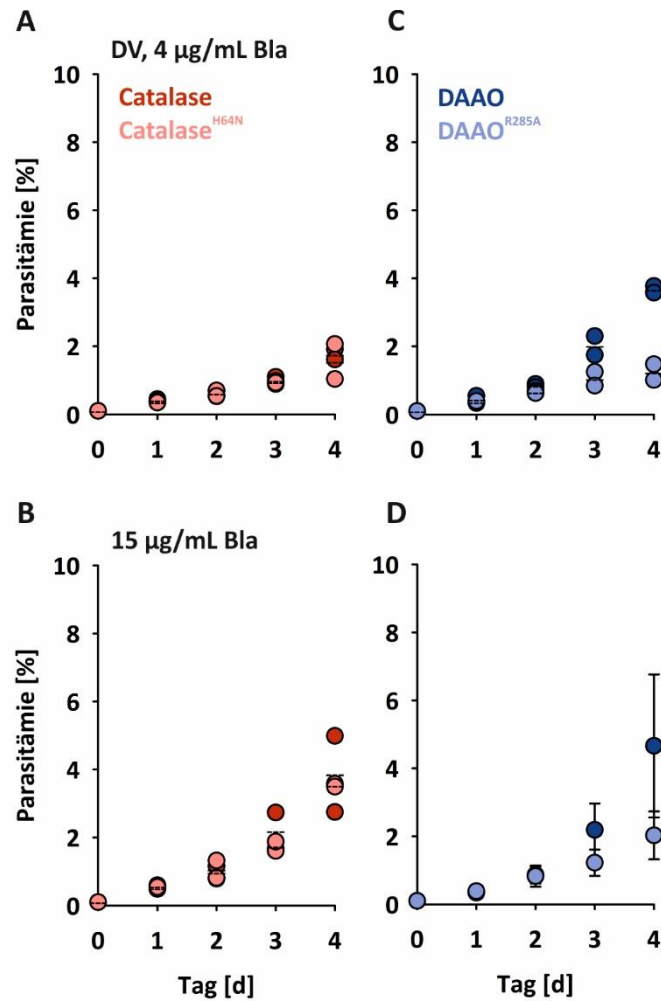
Bei verminderten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Cytosol wurde bei 4 µg/mL Blasticidin eine 1.16-fach erhöhte Verdopplungszeit des Katalase-Stammes von 0.85 d verglichen mit 0.73 d für die Negativkontrolle der Stamm mit inaktiver Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> beobachtet (Abbildung 16 A). Ebenso wurde bei 15 µg/mL Blasticidin eine Veränderung der Verdopplungszeit von 0.81 d verglichen mit 0.68 d der Kontrollkultur Katalase<sup>H64N</sup> ermittelt (Abbildung 16 B). Hierbei handelt es sich um eine 1.18-fache Verdopplungszeit des Katalase-Stammes. Der Anstieg der Verdopplungszeit bedeutet ein verringertes Wachstum bei verminderten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Cytosol des Parasiten. Bei erhöhter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Cytosol durch die DAAO wurde sowohl bei 4 µg/mL Blasticidin als auch bei erhöhter Menge an DAAO bei 15 µg/mL Blasticidin eine Abnahme des Wachstums im Stamm mit der aktiven DAAO beobachtet (Abbildung 16 C bzw. D). Hier betragen die Verdopplungszeiten bei 4 µg/mL Blasticidin für den DAAO-Stamm unter Inkubation mit D-Alanin 1.10 d und für den DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm 0.74 d. Ebenfalls bei

15 µg/mL Blasticidin hatte der DAAO-Stamm eine erhöhte Verdopplungszeit von 1.31 d verglichen mit 0.79 d des DAAO<sup>R285A</sup>-Stammes. Es handelte sich um eine Erhöhung der Verdopplungszeit um das 1.48- bzw. 1.67-fache. Das Wachstumsverhalten der Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> und DAAO<sup>R285A</sup> wurde durch die veränderte Blasticidinmenge nicht beeinflusst.

**Tabelle 11** Verdopplungszeiten der Stämme mit heterologer Katalase oder heterologer DAAO und den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> und DAAO<sup>R285A</sup> im Cytosol bei 4 und 15 µg/mL Blasticidin. Die Verdopplungszeiten wurden aus den in **Abbildung 16** dargestellten Wachstumskurven bestimmt. Das Ergebnis der biologischen Replikate wurde gemittelt. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten WT/Mut wurde angegeben.

		4 µg/mL Blasticidin		15 µg/mL Blasticidin	
		Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut	Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut
Cyto	Katalase	0.85	1.16	0.81	1.18
	Katalase <sup>H64N</sup>	0.73		0.68	
	DAAO	1.10	1.48	1.31	1.67
	DAAO <sup>R285A</sup>	0.74		0.79	

Dies bedeutet, dass sowohl verminderten als auch erhöhte Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Cytosol einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Parasiten hatten. Jedoch war der Effekt von erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen durch heterologe DAAO schon bei 4 µg/mL Blasticidin erkennbar (Tabelle 11).



**Abbildung 17** Wachstumskurven der Stämme mit heterologer Katalase (A/B rot) oder heterologer D-Aminosäureoxidase (C/D blau) oder den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> (A/B hellrot) und DAAO<sup>R285A</sup> (C/D hellblau) in der Verdauungsvakuole. Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blastocidin durchgeführt. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von ≤ 0.1 %. Die Datenpunkte bilden eigenständige Versuche ab. Der Mittelwert der Replikate wird durch das gestrichelte Symbol dargestellt. (A/B/C: n = 2; D: n = 3; n = biologische Replikate).

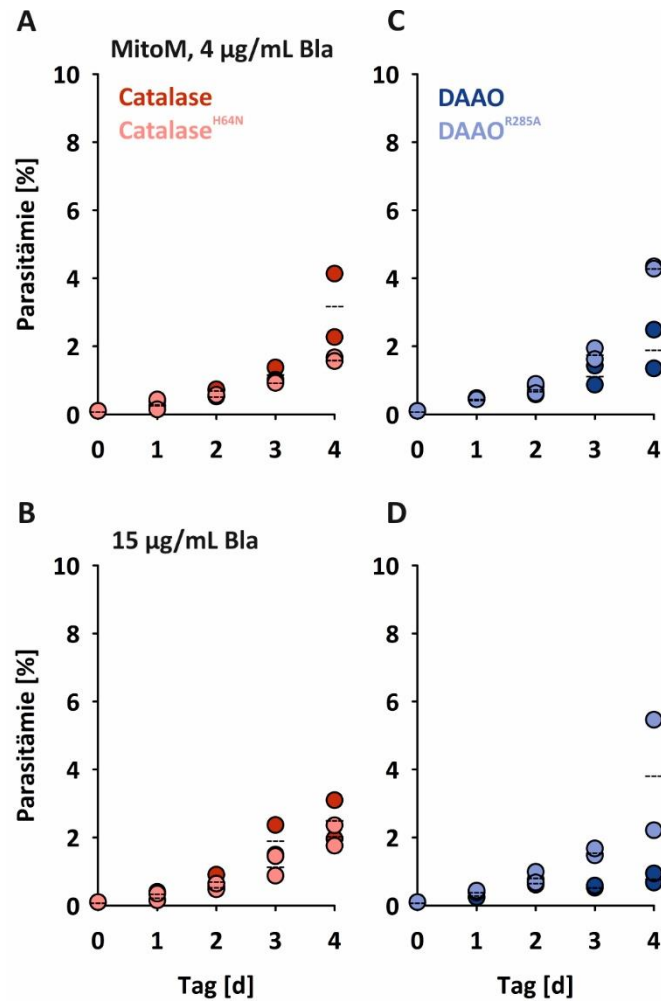
Bei verringerter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge in der Verdauungsvakuole wurde bei 4 µg/mL Blastocidin in der Kultur mit aktiver Katalase eine Verdopplungszeit von 1.05 d ermittelt (Abbildung 17 A). Die Verdopplungszeit der dazugehörigen Negativkontrolle Katalase<sup>H64N</sup> betrug 0.98 d. Dies entspricht einer 1.07-fachen Änderung, demnach keinem verändertes Wachstumsverhalten. Bei 15 µg/mL Blastocidin betrug die Verdopplungszeit des Katalase-Stammes 0.76 d und des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes 0.84 d (Abbildung 17 B). Ebenso wurde hier kein verändertes Wachstum bei verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen ermittelt (0.90-fach). Unter beiden Bedingungen wurden ähnliche Verdopplungszeiten bestimmt. Bei durch DAAO erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen wurde bei 4 µg/mL Blastocidin eine um das 0.78-fache verringerte Verdopplungszeit bei D-Alanin-Inkubation beobachtet (Abbildung 17 C). Die Verdopplungszeit betrug 0.79 d. Für die Negativkontrolle DAAO<sup>R285A</sup> wurde eine Verdopplungszeit von 1.02 d bestimmt. Der Stamm mit erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der Verdauungsvakuole hatte demnach im Vergleich zur

Kontrolle ein erhöhtes Wachstum nach 4 Tagen. Bei erhöhten DAAO-Mengen in der Verdauungsvakuole bei 15 µg/mL Blastocidin wurde derselbe Trend beobachtet (Abbildung 17 D). Hier betragen die Verdopplungszeiten für den DAAO-Stamm  $0.76 \pm 0.10$  d und für den DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm  $1.00 \pm 0.12$  d, was einer 0.76-fachen Verdopplungszeit entspricht. Die erhöhte Blastocidinmenge, welche für die Selektion genutzt wurde, hatte hier keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme, welche die DAAO in der Verdauungsvakuole tragen.

**Tabelle 12** Verdopplungszeiten der Stämme mit heterologer Katalase oder heterologer DAAO und den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> und DAAO<sup>R285A</sup> in der Verdauungsvakuole bei 4 und 15 µg/mL Blastocidin. Die Verdopplungszeiten wurden aus den in **Abbildung 17** dargestellten Wachstumskurven bestimmt. Das Ergebnis der biologischen Replikate wurde gemittelt. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten WT/Mut wurde angegeben.

		4 µg/mL Blastocidin		15 µg/mL Blastocidin	
		Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut	Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut
DV	Katalase	1.05	1.07	0.76	0.90
	Katalase <sup>H64N</sup>	0.98		0.84	
	DAAO	0.79	0.78	$0.76 \pm 0.10$	0.76
	DAAO <sup>R285A</sup>	1.02		$1.00 \pm 0.12$	

Bei verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der Verdauungsvakuole wurden keine Wachstumsunterschiede zwischen dem Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm beobachtet. Erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge in der Verdauungsvakuole haben einen positiven Effekt auf das Wachstum des Parasiten. Hier verringert sich die Verdopplungszeit sowohl bei 4 µg/mL als auch bei 15 µg/mL Blastocidin (Tabelle 12).



**Abbildung 18** Wachstumskurven der Stämme mit heterologer Katalase (A/B rot) oder heterologer D-Aminosäureoxidase (C/D blau) oder den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> (A/B hellrot) und DAAO<sup>R285A</sup> (C/D hellblau) in der mitochondrialen Matrix. Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blasticidin durchgeführt. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1$  %. Die Datenpunkte bilden eigenständige Versuche ab. Der Mittelwert der Replikate wird durch das gestrichelte Symbol dargestellt. (n = 2; n = biologische Replikate).

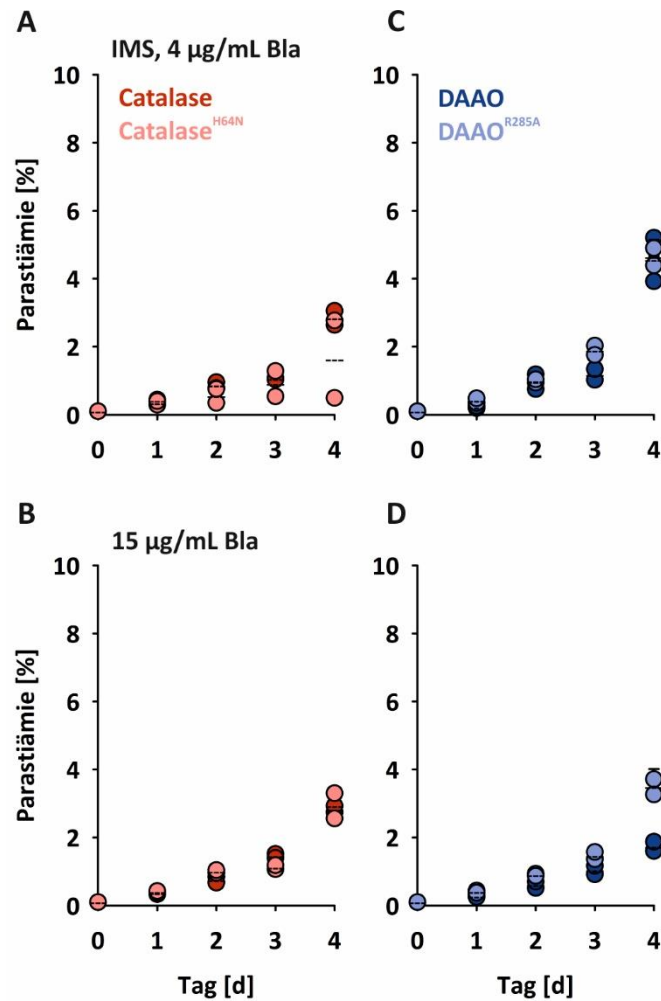
In der mitochondrialen Matrix wurde bei durch heterologe Katalase verringerte  $H_2O_2$ -Mengen eine im Vergleich zur Negativkontrolle 0.84-fache Verdopplungszeit beobachtet. Diese betrug für den Katalase-Stamm 0.85 d und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm 1.01 d bei 4 µg/mL Blasticidin (Abbildung 18 A). Gleiches wurde für die Stämme bei 15 µg/mL Blasticidin beobachtet (Katalase: 0.81 d; Katalase<sup>H64N</sup>: 0.91 d; 0.89-fach; Abbildung 18 B). Bei erhöhten  $H_2O_2$ -Mengen wurde der gegenteilige Effekt beobachtet. Bei 4 µg/mL Blasticidin betragen die Verdopplungszeit des DAAO-Stammes 1.06 d, der des DAAO<sup>R285A</sup>-Stammes 0.78 d (Abbildung 18 C). Der Stamm mit erhöhten  $H_2O_2$ -Mengen in der mitochondrialen Matrix hatte eine um das 1.36-fache erhöhte Verdopplungszeit verglichen mit der Negativkontrolle. Dieser Effekt wurde mit erhöhter Blasticidinmenge von 15 µg/mL weiter gesteigert (Abbildung 18 D). Hier betragen die Verdopplungszeiten 1.46 d für den DAAO-Stamm und 0.83 d für

den DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm, was einer 1.76-fachen Verdopplungszeit entspricht. Das Wachstumsverhalten der Negativkontrolle DAAO<sup>R285A</sup> wurde durch die veränderte Blastocidinmenge nicht beeinflusst.

**Tabelle 13** Verdopplungszeiten der Stämme mit heterologer Katalase oder heterologer DAAO und den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> und DAAO<sup>R285A</sup> in der mitochondrialen Matrix bei 4 und 15 µg/mL Blastocidin. Die Verdopplungszeiten wurden aus den in **Abbildung 18** dargestellten Wachstumskurven bestimmt. Das Ergebnis der biologischen Replikate wurde gemittelt. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten WT/Mut wurde angegeben.

		4 µg/mL Blastocidin		15 µg/mL Blastocidin	
		Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut	Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut
MitoM	Katalase	0.85	0.84	0.81	0.89
	Katalase <sup>H64N</sup>	1.01		0.91	
	DAAO	1.06	1.36	1.46	1.76
	DAAO <sup>R285A</sup>	0.78		0.83	

Verringerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der mitochondrialen Matrix erzeugen eine leicht erniedrigte Verdopplungszeit sowohl bei 4 µg/mL als auch bei 15 µg/mL Blastocidin. Dies entspricht einem gesteigerten Wachstum im Katalase-Stamm verglichen mit dem Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm. Hingegen haben erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der mitochondrialen Matrix einen negativen Einfluss auf das Wachstum des Parasiten (Tabelle 13).



**Abbildung 19** Wachstumskurven der Stämme mit heterologer Katalase (A/B rot) oder heterologer D-Aminosäureoxidase (C/D blau) oder den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> (A/B hellrot) und DAAO<sup>R285A</sup> (C/D hellblau) im Intermembranraum des Mitochondriums. Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blasticidin durchgeführt. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von ≤ 0.1 %. Die Datenpunkte bilden eigenständige Versuche ab. Der Mittelwert der Replikate wird durch das gestrichelte Symbol dargestellt. (n = 2; n = biologische Replikate).

Die Stämme mit den heterologen Redoxenzymen im Intermembranraum des Mitochondriums wurden ebenfalls auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. Der Stamm mit verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen bei 4 µg/mL Blasticidin zeigte in den zwei durchgeführten Versuchen kein eindeutiges Ergebnis (Abbildung 19 A). Die Verdopplungszeit des Katalase-Stammes betrug im Mittel 0.91 d, jedoch unterschieden sich die Verdopplungszeiten der Einzelmessungen des Kontrollstammes Katalase<sup>H64N</sup> zwischen 1.81 d und 0.89 d. Das Mittel von 1.35 d spiegelt demnach vermutlich nicht das korrekte Ergebnis wider. Wenn nur der Versuch mit der Verdopplungszeit 0.89 d betrachtet wird, konnte kein verändertes Wachstumsverhalten zwischen dem Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm beobachtet werden (1.02-fach). Verglichen mit den Verdopplungszeiten der Katalase-Stämme mit zum Beispiel cytosolischer Lokalisation oder Lokalisation in der Verdauungsvakuole und der mitochondrialen Matrix unterscheidet sich das Wachstum des hier dargestellten Stammes mit Katalase im Intermembranraum

des Mitochondriums nicht. Ebenso wurde bei gesteigerter Blastocidinmenge von 15 µg/mL keine Abweichung in der Verdopplungszeit zwischen dem Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes beobachtet (Abbildung 19 B). Der Katalase-Stamm besaß eine 0.96-fache Verdopplungszeit. Die Verdopplungszeiten betragen für den Katalase-Stamm 0.86 d und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm 0.89 d. Bei erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Intermembranraum des Mitochondriums wurde bei 4 µg/mL Blastocidin ebenfalls keine veränderte Verdopplungszeit beobachtet (DAAO: 0.86 d; DAAO<sup>R285A</sup>: 0.89 d; 0.99-fach; Abbildung 19 C). Bei 15 µg/mL Blastocidin wurde ein Anstieg der Verdopplungszeit um das 1.19-fache beobachtet (Abbildung 19 D). Die Verdopplungszeiten betragen für den DAAO-Stamm 0.99 d und für den DAAO<sup>R285A</sup>- Stamm 0.83 d.

**Tabelle 14** Verdopplungszeiten der Stämme mit heterologer Katalase oder heterologer DAAO und den Negativkontrollen Katalase<sup>H64N</sup> und DAAO<sup>R285A</sup> in der mitochondrialen Matrix bei 4 und 15 µg/mL Blastocidin. Die Verdopplungszeiten wurden aus den in **Abbildung 19** dargestellten Wachstumskurven bestimmt. Das Ergebnis der biologischen Replikate wurde gemittelt. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten WT/Mut wurde angegeben.

		4 µg/mL Blastocidin		15 µg/mL Blastocidin	
		Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut	Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut
IMS	Katalase	0.91	0.67	0.86	0.96
	Katalase <sup>H64N</sup>	(1.35)	(1.02)	0.89	
	DAAO	0.75	0.99	0.99	1.19
	DAAO <sup>R285A</sup>	0.75		0.83	

Bei veränderten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Intermembranraum des Mitochondriums wurde nur bei erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen (15 µg/mL Blastocidin) ein Einfluss auf das Wachstum beobachtet. Hier wurde ein verringertes Wachstum des DAAO-Stammes verglichen mit der Kontrolle beobachtet (Tabelle 14).

### 5.1.5. IC<sub>50</sub>-Analysen von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit heterologen Redoxenzymen

Zur Analyse der *Plasmodium falciparum* 3D7 Stämme mit heterologer *Toxoplasma gondii* Katalase und *Rotodurula gracilis* D-Aminosäureoxidase wurden IC<sub>50</sub>-Messungen mit verschiedenen Antimalariamitteln durchgeführt. Hierbei wurde getestet, ob diese über H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirken. Ebenfalls wurde die Kompartimentspezifität untersucht. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde mit der jeweiligen Negativkontrolle, den Stämmen mit identischer Lokalisation der inaktiven Punktmutante, verglichen.

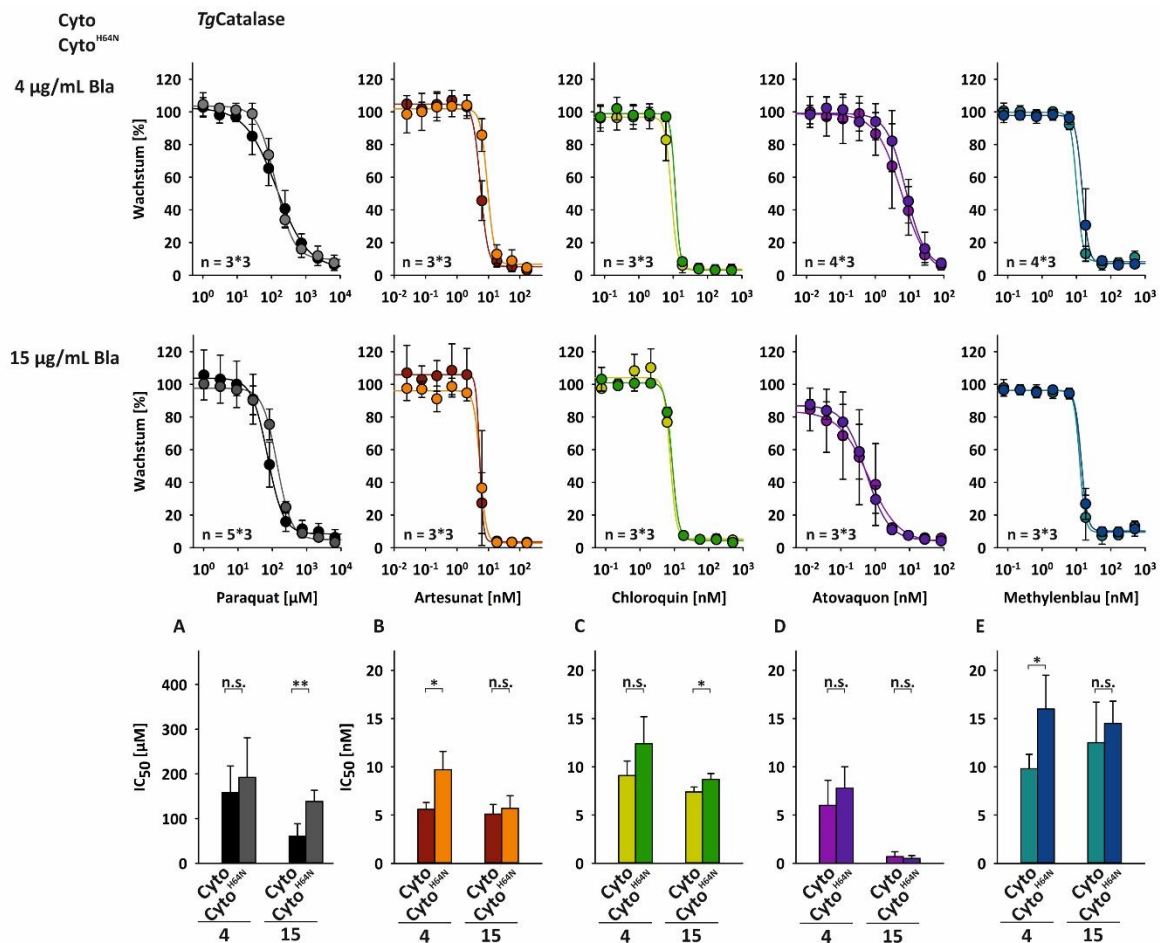
Zuerst wurde das erstellte System mit bekannten redoxaktiven Substanzen getestet, welche über eine Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, wirken. Paraquat kann zum Paraquatradikal reduziert werden, welches anschließend O<sub>2</sub> zum O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reduziert, welches zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren kann.<sup>269</sup> Als zusätzliche Positivkontrolle wurde Menadion getestet. Hier konnte kein Effekt beobachtet werden, weshalb die Daten im Anhang abgebildet sind (Abbildung 41, Tabelle 27).

Zudem wurde das Antimalariamittel Artesunat untersucht. Artesunat ist ein Artemisinin-Derivat, welches durch die Eisen-vermittelte Öffnung der Endoperoxidbrücke aktiviert wird. Das entstehende Radikal kann Proteine und Lipide schädigen.<sup>75</sup> Zusätzlich wurde Chloroquin untersucht, welches die Detoxifizierung von redox-aktivem Häm zu Hämozoin inhibiert. Hierbei kommt es zur Akkumulation des reaktiven Häm-Fe<sup>2+</sup>, welches mit O<sub>2</sub> reagieren und O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und OH<sup>•</sup> erzeugen kann.<sup>59</sup> Das Antimalariamittel Atovaquon inhibiert den Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex des Elektronentransports der Atmungskette.<sup>118</sup> Zudem wurde die Substanz Methylenblau untersucht. Diese Substanz wurde als potentiell Antimalariamittel getestet und hatte eine effektive Wirkweise.<sup>270</sup> Methylenblau beeinflusst den Glutathionmetabolismus *in vitro* durch die Inhibition der Glutathionreduktase und Glutathion wird scheinbar direkt ohne vorherige Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert.<sup>270,271</sup> Zudem hat Methylenblau eine Rolle als Redoxzyklussubstrat bei der Wechselwirkung mit der Hämgruppe von Hämozoin.<sup>272</sup>

Zur Untersuchung des Einflusses von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden die Plasmodien-Stämme, mit Plasmid kodierend für die heterologe Katalase oder DAAO im Cytosol, der Verdauungsvakuole, der mitochondrialen Matrix oder dem Intermembranraum des Mitochondriums mit 3xHA-Tag genutzt. Bei den Messungen der Stämme mit heterologer Katalase wurden die IC<sub>50</sub>-Werte der Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stämme im gleichen Kompartiment verglichen. Bei den Messungen mit heterologer DAAO wurde neben den DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> IC<sub>50</sub>-Werten ebenfalls Werte der jeweiligen Stämme ohne Zugabe von D-Alanin bestimmt.

Alle Messungen wurden mit 4 µg/mL und 15 µg/mL Blastocidin zur Selektion durchgeführt. Es wurden IC<sub>50</sub>-Werte für Paraquat, Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau bestimmt.

### 5.1.5.1. IC<sub>50</sub>-Analysen von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit cytosolischen heterologen Redoxenzymen



**Abbildung 20** IC<sub>50</sub>-Messungen der Stämme mit heterologer cytosolischer Katalase oder Mutante Katalase<sup>H64N</sup> mit den Substanzen Paraquat (A grau), Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methyleneblau (E blau). Alle Messungen wurden bei 4 und 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y \* z; y = biologisches Replik; z = technisches Replik; Statistik (t-Test): \*: P ≤ 0.05, \*\*: P ≤ 0.01, \*\*\*: P ≤ 0.001).

Für den Stamm mit heterologer cytosolischer Katalase wurde für Paraquat (Abbildung 20 A) bei 4 µg/mL Blasticidin ein IC<sub>50</sub>-Wert von 158 ± 60 µM und 192 ± 89 µM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm ermittelt. Bei 15 µg/mL Blasticidin betrug der Wert für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm 138 ± 25 µM und für den Katalase-Stamm 61 ± 28 µM. Es war zu beobachten, dass der IC<sub>50</sub>-Wert des Stammes mit aktiver Katalase niedriger war als der des Stammes mit inaktiver Katalase<sup>H64N</sup>, was bedeutet, dass der Stamm mit aktiver Katalase bei 15 µg/mL Blasticidin sensitiver gegenüber Paraquat ist. Der Unterschied zwischen diesen beiden IC<sub>50</sub>-Werten bei 15 µg/mL Blasticidin war statistisch signifikant (P = 0.002).

Für Artesunat (Abbildung 20 B) wurde bei 4 µg/mL Blasticidin ein signifikanter Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase- und des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes ermittelt (P = 0.025). Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen 5.6 ± 0.7 nM und 9.7 ± 1.9 nM für Katalase und Katalase<sup>H64N</sup>. Bei 15 µg/mL Blasticidin konnte

kein signifikanter Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes beobachtet werden (Katalase: 5.1 ± 1.0 nM; Katalase<sup>H64N</sup>: 5.7 ± 1.3 nM).

Für Chloroquin (Abbildung 20 C) betrug der IC<sub>50</sub>-Wert für den Katalase-Stamm 9.1 ± 1.5 nM und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm 12.4 ± 2.8 nM bei 4 µg/mL Blastocidin und 7.4 ± 0.5 nM und 8.7 ± 0.6 nM bei 15 µg/mL Blastocidin. Bei der höheren Blastocidinmenge wurde ein signifikanter Unterschied beobachtet (P = 0.045).

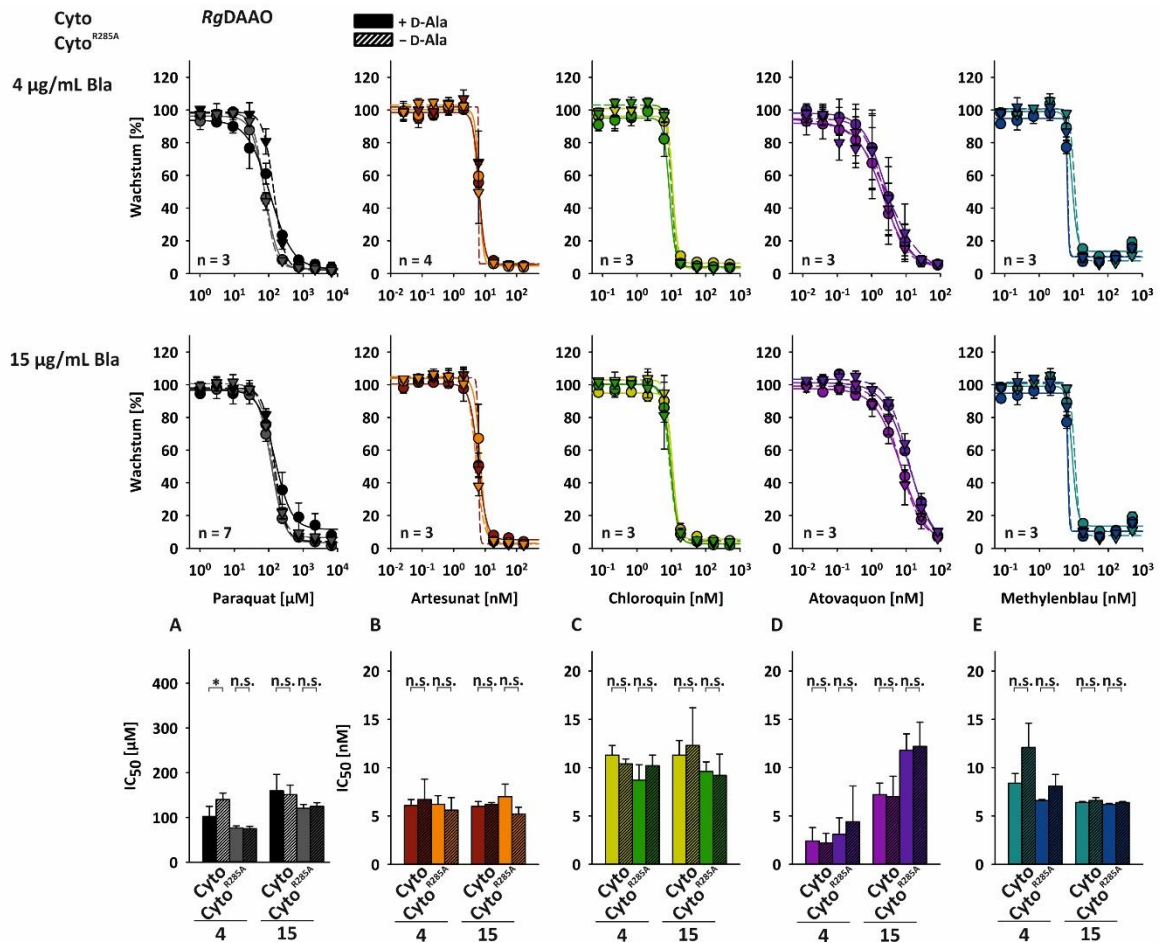
Für Atovaquon (Abbildung 20 D) betragen die Werte bei 4 µg/mL Blastocidin 6.0 ± 2.6 nM und 7.8 ± 2.2 nM. Es wurde ein Unterschied von einer Größenordnung zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten für Atovaquon bei 4 µg/mL und 15 µg/mL Blastocidin (Katalase: 0.7 ± 0.5 nM; Katalase<sup>H64N</sup>: 0.5 ± 0.3 nM) beobachtet.

Für Methylenblau (Abbildung 20 E) wurde mit 4 µg/mL Blastocidin ein signifikanter Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase-Stammes und des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes beobachtet (Katalase: 9.8 ± 1.5 nM; Katalase<sup>H64N</sup>: 16.0 ± 3.5 nM; P = 0.017). Bei 15 µg/mL Blastocidin wurde für Methylenblau ein IC<sub>50</sub>-Wert von 12.5 ± 4.2 nM für den Katalase- und 14.5 ± 1.2 nM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm ermittelt.

**Tabelle 15** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer Katalase oder inaktiven Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> im Cytosol.

Cyto	4 µg/mL Blastocidin		15 µg/mL Blastocidin	
	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>
Paraquat [µM]	158 ± 60	192 ± 89	61 ± 28	138 ± 25
Artesunat [nM]	5.6 ± 0.7	9.7 ± 1.9	5.1 ± 1.0	5.7 ± 1.3
Chloroquin [nM]	9.1 ± 1.5	12.4 ± 2.8	7.4 ± 0.5	8.7 ± 0.6
Atovaquon [nM]	6.0 ± 2.6	7.8 ± 2.2	0.7 ± 0.5	0.5 ± 0.3
Methylenblau [nM]	9.8 ± 1.5	16.0 ± 3.5	12.5 ± 4.2	14.5 ± 2.3

Alle Unterschiede zeigen, dass der Stamm mit verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Cytosol tendenziell leicht sensitiver gegenüber der jeweiligen Substanz war als die Negativkontrolle. Signifikante Unterschiede wurden hier mit Paraquat, Artesunat, Chloroquin und Methylenblau erzielt. Eine Anomalie wurde bei Atovaquon zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten bei 4 und 15 µg/mL Blastocidin beobachtet. Hier wurde ein großer Unterschied zwischen den Messungen, jedoch nicht zwischen der aktiven und inaktiven DAAO ermittelt. Generell wurden nur geringe, bzw. keine Effekte beobachtet (Tabelle 15).



**Abbildung 21**  $IC_{50}$ -Messungen der Stämme mit heterologer cytosolischer DAAO oder Mutante DAAO<sup>R285A</sup> mit den Substanzen Paraquat (A grau)<sup>268</sup>, Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methyleneblau (E blau). Alle Messungen wurden mit (ausgefüllte Balken) und ohne (gestreifte Balken) 5 mM D-Alanin und bei entweder 4 oder 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y; y = biologisches Replikat; technisches Replikat (z): mit D-Ala: z = 4; ohne D-Ala: z = 2; Statistik (One Way ANOVA Holm-Sidak Methode): \*: P ≤ 0.05, \*\*: P ≤ 0.01, \*\*\*: P ≤ 0.001).

Ebenfalls wurden  $IC_{50}$ -Messungen mit den Stämmen mit heterologer DAAO im Cytosol ermittelt. Hier wurden neben der inaktiven Punktmutante DAAO<sup>R285A</sup> als Negativkontrolle Messungen mit (DAAO<sup>+</sup>) und ohne (DAAO<sup>-</sup>) 5 mM D-Alanin durchgeführt.

Die Ermittlung des  $IC_{50}$ -Wertes für Paraquat mit heterologer cytosolischer DAAO wurde von Eileen Bischoff durchgeführt.<sup>268</sup> Die Daten wurden hier neu ausgewertet und zur Vollständigkeit nochmals beschrieben.

Mit Paraquat (Abbildung 21 A) wurde bei 4 µg/mL Blasticidin ein signifikanter Unterschied zwischen DAAO<sup>+</sup> und DAAO<sup>-</sup> beobachtet (P = 0.038). Hier waren die  $IC_{50}$ -Werte  $103 \pm 22$  µM für den DAAO<sup>+</sup>-Stamm und  $140 \pm 14$  µM für den DAAO<sup>-</sup>-Stamm. Die  $IC_{50}$ -Werte mit dem Stamm der inaktiven Mutante DAAO<sup>R285A</sup> waren bei gleicher Blasticidinmenge geringer und betragen  $77 \pm 5$  µM für den DAAO<sup>R285A+</sup>-Stamm mit D-Alanin und  $75 \pm 5$  µM für den DAAO<sup>R285A-</sup>-Stamm ohne D-Alanin. Es wurde bei höherer

Blasticidinmenge von 15 µg/mL kein signifikanter Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des DAAO<sup>+</sup>- und DAAO<sup>-</sup>-Stammes ermittelt (DAAO<sup>+</sup>: 160 ± 36 µM; DAAO<sup>-</sup>: 151 ± 21 µM). Die IC<sub>50</sub>-Werte der Negativkontrolle dem inaktiven DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm betragen 121 ± 9 µM mit und 125 ± 8 µM ohne D-Aminosäure.

Für Artesunat (Abbildung 21 B) betragen die IC<sub>50</sub>-Werte 6.1 ± 0.6 nM mit dem DAAO<sup>+</sup>-Stamm und 6.7 ± 2.1 nM mit DAAO<sup>-</sup> bei 4 µg/mL Blasticidin. Bei gleicher Blasticidinmenge betragen die IC<sub>50</sub>-Werte für den Stamm mit der inaktiven Punktmutante 6.2 ± 0.9 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 5.6 ± 1.3 nM für DAAO<sup>R285A-</sup>. Für diese Bedingungen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten mit und ohne D-Alanin ermittelt. Bei 15 µg/mL Blasticidin betragen die Werte 6.0 ± 0.5 nM für DAAO<sup>+</sup>, 6.2 ± 0.2 nM für DAAO<sup>-</sup>, 7.0 ± 1.3 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 5.2 ± 0.7 nM für DAAO<sup>R285A-</sup>.

Ebenfalls wurde kein signifikanter Unterschied der IC<sub>50</sub>-Werte für den Stamm mit heterologer aktiver DAAO im Cytosol für Chloroquin (Abbildung 21 C) ermittelt. Die Werte bei 4 µg/mL Blasticidin betragen 11.3 ± 1.0 nM für DAAO<sup>+</sup> und 10.4 ± 0.5 nM für DAAO<sup>-</sup>. Für den Stamm mit inaktiver Mutante wurden Werte von 8.7 ± 1.6 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 10.2 ± 1.1 nM für DAAO<sup>R285A-</sup> ermittelt. Bei 15 µg/mL Blasticidin wurden ebenfalls keine Unterschiede ermittelt (DAAO<sup>+</sup>: 11.3 ± 1.5 nM; DAAO<sup>-</sup>: 12.3 ± 3.9 nM; DAAO<sup>R285A+</sup>: 9.6 ± 1.0 nM; DAAO<sup>R285A-</sup>: 9.2 ± 2.2 nM).

Mit den heterologen DAAO-Stämmen war mit Atovaquon (Abbildung 21 D) der gegenteilige Effekt wie bei den Katalase-Stämmen zu erkennen. Hier war der generelle IC<sub>50</sub>-Wert der 4 µg/mL Blasticidin-Messungen verglichen mit den 15 µg/mL Blasticidin-Messungen geringer. Bei 4 µg/mL Blasticidin betragen sie: 2.4 ± 1.4 nM für DAAO<sup>+</sup>, 2.2 ± 1.0 nM für DAAO<sup>-</sup>, 3.1 ± 1.7 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 4.4 ± 3.7 nM für DAAO<sup>R285A-</sup>. Bei 15 µg/mL Blasticidin war ein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten mit dem Stamm mit aktiver heterologer DAAO und dem Stamm mit inaktiver Punktmutante zu erkennen. Der Stamm mit DAAO war mit und ohne Zugabe von D-Alanin sensitiver gegenüber Atovaquon als der DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm. Die IC<sub>50</sub>-Werte für den DAAO-Stamm betragen 7.2 ± 1.2 nM für DAAO<sup>+</sup> und 7.0 ± 2.1 nM für DAAO<sup>-</sup>. Für den Stamm mit inaktivem Enzym wurden 11.8 ± 1.7 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 12.2 ± 2.5 nM für DAAO<sup>R285A-</sup> ermittelt. Innerhalb des gleichen Stammes wurde kein Unterschied zwischen den Messungen mit und ohne D-Aminosäure beobachtet.

Für die Substanz Methylenblau (Abbildung 21 E) wurden bei 15 µg/mL Blasticidin IC<sub>50</sub>-Werte von 6.4 ± 0.1 nM für DAAO<sup>+</sup>, 6.6 ± 0.3 nM für DAAO<sup>-</sup>, 6.2 ± 0.1 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 6.4 ± 0.1 nM für DAAO<sup>R285A-</sup> bestimmt. Hier wurden keine Unterschiede zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet. Bei der geringeren Menge von 4 µg/mL Blasticidin wurde ein Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert von DAAO<sup>-</sup> und den anderen IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet. Der Stamm mit aktiver DAAO ohne D-Alanin war weniger sensitiv gegenüber Methylenblau. Der Wert für DAAO<sup>-</sup> betrug 12.1 ± 2.5 nM und war höher als die Werte für DAAO<sup>+</sup> 8.4 ± 1.0 nM, DAAO<sup>R285A+</sup> 6.6 ± 0.1 nM und DAAO<sup>R285A-</sup> 8.1 ± 1.2 nM. Der beobachtete

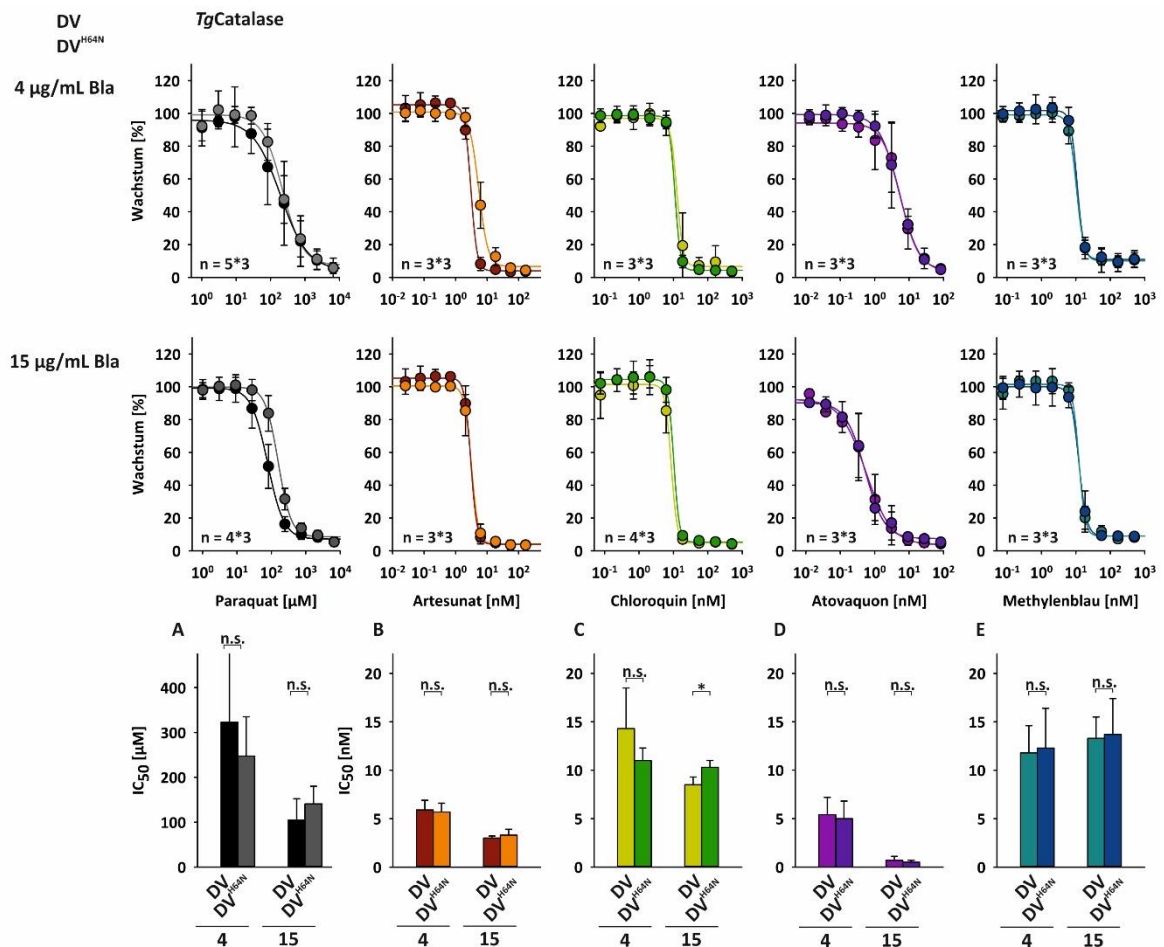
Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei 15 µg/mL Blastocidin wurde kein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet (DAAO<sup>+</sup>: 6.4 ± 0.1 nM; DAAO<sup>-</sup>: 6.6 ± 0.3 nM; DAAO<sup>R286A+</sup>: 6.2 ± 0.1 nM; DAAO<sup>R285A-</sup>: 6.4 ± 0.1 nM).

**Tabelle 16** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer D-Aminosäureoxidase (DAAO) oder inaktiver Punktmutante DAAO<sup>R285A</sup> im Cytosol.

Cyto	4 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM] <sup>268</sup>	103 ± 22	140 ± 14	77 ± 5	75 ± 5
Artesunat [nM]	6.1 ± 0.6	6.7 ± 2.1	6.2 ± 0.9	5.6 ± 1.3
Chloroquin [nM]	11.3 ± 1.0	10.4 ± 0.5	8.7 ± 1.6	10.2 ± 1.1
Atovaquon [nM]	2.4 ± 1.4	2.2 ± 1.0	3.1 ± 1.7	4.4 ± 3.7
Methylenblau [nM]	8.4 ± 1.0	12.1 ± 2.5	6.6 ± 0.1	8.1 ± 1.2
Cyto	15 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM] <sup>268</sup>	160 ± 36	151 ± 21	121 ± 9	125 ± 8
Artesunat [nM]	6.0 ± 0.5	6.2 ± 0.2	7.0 ± 1.3	5.2 ± 0.7
Chloroquin [nM]	11.3 ± 1.5	12.3 ± 3.9	9.6 ± 1.0	9.2 ± 2.2
Atovaquon [nM]	7.2 ± 1.2	7.0 ± 2.1	11.8 ± 1.7	12.2 ± 2.5
Methylenblau [nM]	6.4 ± 0.1	6.6 ± 0.3	6.2 ± 0.1	6.4 ± 0.1

Mit erhöhter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Cytosol wurden keine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den Substanzen Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau ermittelt. Für die Positivkontrolle Paraquat wurde bei 4 µg/mL Blastocidin ein geringer Effekt durch Zugabe von D-Alanin beobachtet, was auf eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Wirkweise hinweisen könnte (Tabelle 16).

### 5.1.5.2. IC<sub>50</sub>-Analysen von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit heterologen Redoxenzymen in der Verdauungsvakuole



**Abbildung 22** IC<sub>50</sub>-Messungen der Stämme mit heterologer Katalase oder Mutante Katalase<sup>H64N</sup> in der Verdauungsvakuole mit den Substanzen Paraquat (A grau), Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methylenblau (E blau). Alle Messungen wurden bei 4 und 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y \* z; y = biologisches Replikat; z = technisches Replikat; Statistik (t-Test): \*, P ≤ 0.05, \*\*, P ≤ 0.01, \*\*\*, P ≤ 0.001).

Für den Stamm mit heterologer Katalase in der Verdauungsvakuole von *Plasmodium falciparum* wurden die IC<sub>50</sub>-Werte für Paraquat, Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau untersucht. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm mit inaktiver Mutante Katalase<sup>H64N</sup> genutzt.

Mit Paraquat (Abbildung 22 A) wurde bei 4 µg/mL Blasticidin ein IC<sub>50</sub>-Wert von 323 ± 257 µM für den Katalase-Stamm und 247 ± 88 µM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm ermittelt. Hier war der Stamm mit aktiver Katalase weniger sensitiv gegenüber Paraquat als die Negativkontrolle Katalase<sup>H64N</sup>. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei 15 µg/mL Blasticidin war der Katalase-Stamm sensitiver. Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen 105 ± 47 µM für Katalase und 141 ± 40 µM für Katalase<sup>H64N</sup>.

Für die Messungen mit Artesunat (Abbildung 22 B) wurden keine Unterschiede zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase- und des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes mit Lokalisation in der Verdauungsvakuole ermittelt.

Die Werte betragen bei 4 µg/mL Blastocidin  $5.9 \pm 1.0$  nM für den Katalase- und  $5.7 \pm 0.9$  nM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm. Bei 15 µg/mL Blastocidin wurden  $3.0 \pm 0.2$  nM für den Katalase-Stamm und  $3.3 \pm 0.6$  nM für Katalase<sup>H64N</sup> bestimmt.

Für Chloroquin (Abbildung 22 C) wurde bei 4 µg/mL Blastocidin ein nicht signifikanter Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes beobachtet. Hier war, wie auch bei Paraquat, der Stamm mit aktiver Katalase weniger sensitiv gegenüber Chloroquin als der Stamm mit der inaktiven Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> (Katalase:  $14.3 \pm 4.2$  nM; Katalase<sup>H64N</sup>:  $11.0 \pm 1.3$  nM). Bei 15 µg/mL Blastocidin war jedoch der gegenteilige Effekt zu beobachten. Hier wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase-Stammes von  $8.5 \pm 0.8$  nM und des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes von  $10.3 \pm 0.7$  nM ermittelt ( $P = 0.043$ ). Der Stamm mit aktiver Katalase war sensitiver als die Negativkontrolle.

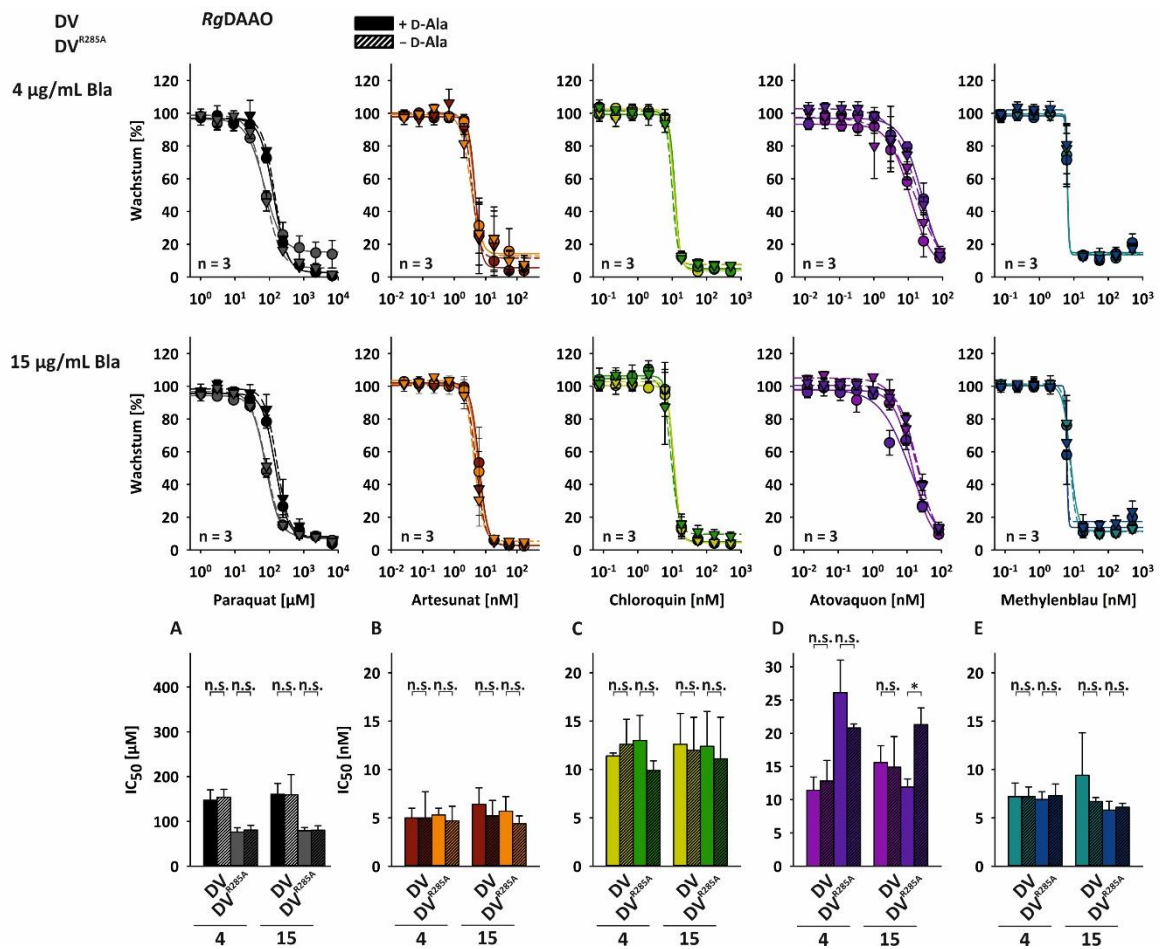
Die IC<sub>50</sub>-Werte von Atovaquon (Abbildung 22 D) unterschieden sich innerhalb einer Blastocidinmenge nur gering, jedoch war zwischen 4 und 15 µg/mL Blastocidin ebenfalls ein Unterschied von einer Größenordnung zu erkennen. Die Werte bei 4 µg/mL Blastocidin betragen  $5.4 \pm 1.8$  nM für den Katalase-Stamm und  $5.0 \pm 1.8$  nM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm. Bei 15 µg/mL Blastocidin wurde ebenfalls kein Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase- ( $0.7 \pm 0.4$  nM) und Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm ( $0.5 \pm 0.2$  nM) beobachtet.

Bei den IC<sub>50</sub>-Werten für Methylenblau (Abbildung 22 E) wurde kein Unterschied zwischen dem Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm ermittelt. Die Werte betragen  $11.8 \pm 2.8$  nM für den Katalase- und  $12.3 \pm 4.1$  nM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm bei 4 µg/mL Blastocidin und  $13.3 \pm 2.2$  nM für den Katalase-Stamm und  $13.7 \pm 3.7$  nM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm bei 15 µg/mL Blastocidin.

**Tabelle 17** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer Katalase oder inaktiver Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> in der Verdauungsvakuole.

DV	4 µg/mL Blastocidin		15 µg/mL Blastocidin	
	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>
Paraquat [µM]	$323 \pm 257$	$247 \pm 88$	$105 \pm 47$	$141 \pm 40$
Artesunat [nM]	$5.9 \pm 1.0$	$5.7 \pm 0.9$	$3.0 \pm 0.2$	$3.3 \pm 0.6$
Chloroquin [nM]	$14.3 \pm 4.2$	$11.0 \pm 1.3$	$8.5 \pm 0.8$	$10.3 \pm 0.7$
Atovaquon [nM]	$5.4 \pm 1.8$	$5.0 \pm 1.8$	$0.7 \pm 0.4$	$0.5 \pm 0.2$
Methylenblau [nM]	$11.8 \pm 2.8$	$12.3 \pm 4.1$	$13.3 \pm 2.2$	$13.7 \pm 3.7$

Bei verringerter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge in der Verdauungsvakuole wurde nur bei der Substanz Chloroquin ein signifikanter Unterschied in den IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet. Der Stamm mit aktiver Katalase war signifikant sensitiver als die Negativkontrolle (Tabelle 17).



**Abbildung 23** IC<sub>50</sub>-Messungen der Stämme mit heterologer DAAO oder Mutante DAAO<sup>R285A</sup> in der Verdauungsvakuole mit den Substanzen Paraquat (A grau), Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methyleneblau (E blau). Alle Messungen wurden mit (ausgefüllte Balken) und ohne (gestreifte Balken) 5 mM D-Alanin und bei entweder 4 oder 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y; y = biologisches Replikat; technisches Replikat (z): mit D-Ala: z = 4; ohne D-Ala: z = 2; Statistik (One Way ANOVA Holm-Sidak Methode): \*: P ≤ 0,05, \*\*: P ≤ 0,01, \*\*\*: P ≤ 0,001).

Die IC<sub>50</sub>-Werte von Paraquat und den Antimalariamitteln wurden auch mit dem Stamm mit heterologer DAAO in der Verdauungsvakuole ermittelt.

Für Paraquat (Abbildung 23 A) war bei 4 µg/mL Blasticidin ein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des DAAO- und DAAO<sup>R285A</sup>-Stammes mit und ohne D-Alanin zu erkennen. Die Werte für den Stamm mit aktiver DAAO betragen für DAAO<sup>+</sup> 147 ± 23 µM und für DAAO<sup>-</sup> 154 ± 18 µM. Hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten von DAAO<sup>+</sup> und DAAO<sup>-</sup> beobachtet. Generell war der Stamm mit inaktiver DAAO<sup>R285A</sup> mit und ohne Zugabe von D-Alanin sensitiver gegenüber Paraquat als der Stamm mit aktiver DAAO. Für DAAO<sup>R285A+</sup> wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 76 ± 18 µM und für DAAO<sup>R285A-</sup> von 81 ± 11 µM ermittelt. Bei höherer Blasticidinmenge von 15 µg/mL Blasticidin wurde derselbe Effekt beobachtet. Der Stamm mit aktiver DAAO war weniger sensitiv gegenüber Paraquat als der Stamm mit inaktiver DAAO<sup>R285A</sup>. Hier betragen die IC<sub>50</sub>-Werte 161 ± 24 µM für DAAO<sup>+</sup>,

159 ± 45 µM für DAAO<sup>-</sup>, 79 ± 7 µM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 80 ± 10 µM für DAAO<sup>R285A-</sup>. Innerhalb eines Stammes wurden keine Unterschiede zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert mit und ohne D-Alanin beobachtet.

Für Artesunat (Abbildung 23 B) wurde bei beiden Blastocidinmengen sowohl innerhalb eines Stammes als auch zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des Stammes mit DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> kein signifikanter Unterschied beobachtet (4 µg/mL Blastocidin: DAAO<sup>+</sup>: 5.0 ± 1.0 nM, DAAO<sup>-</sup>: 5.0 ± 2.7 nM, DAAO<sup>R285A+</sup>: 5.3 ± 0.7 nM, DAAO<sup>R285A-</sup>: 4.7 ± 1.5 nM; 15 µg/mL Blastocidin: DAAO<sup>+</sup>: 6.4 ± 1.7 nM, DAAO<sup>-</sup>: 5.2 ± 1.6 nM, DAAO<sup>R285A+</sup>: 5.7 ± 1.5 nM, DAAO<sup>R285A-</sup>: 4.4 ± 0.8 nM). Jedoch ist bei 15 µg/mL Blastocidin zu erkennen, dass sowohl der IC<sub>50</sub>-Wert des DAAO-Stammes als auch der des DAAO<sup>R285A</sup>-Stammes unter Zugabe von D-Alanin, verglichen mit den Messungen ohne Zugabe, etwas höher war, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Für Chloroquin (Abbildung 23 C) wurden IC<sub>50</sub>-Werte von 11.4 ± 0.3 nM für DAAO<sup>+</sup>, 12.6 ± 2.6 nM für DAAO<sup>-</sup>, 13.0 ± 2.6 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 9.9 ± 1.0 nM für DAAO<sup>R285A-</sup> bei 4 µg/mL Blastocidin ermittelt. Hier wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet. Bei 15 µg/mL Blastocidin wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied ermittelt (DAAO<sup>+</sup>: 12.6 ± 3.2 nM; DAAO<sup>-</sup>: 12.0 ± 3.4 nM; DAAO<sup>R285A+</sup>: 12.4 ± 3.6 nM; DAAO<sup>R285A-</sup>: 11.1 ± 4.3 nM).

Für das Antimalariamittel Atovaquon (Abbildung 23 D) wurde bei 4 µg/mL Blastocidin Unterschied in den IC<sub>50</sub>-Werten des DAAO<sup>-</sup> und DAAO<sup>R285A</sup>-Stammes beobachtet. Hier betragen die Werte 11.4 ± 2.0 nM für DAAO<sup>+</sup>, 12.8 ± 3.1 nM für DAAO<sup>-</sup>, 26.1 ± 4.9 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 20.8 ± 0.6 nM für DAAO<sup>R285A-</sup>. Der Stamm mit aktiver DAAO war bei 4 µg/mL Blastocidin sowohl mit als auch ohne D-Alanin-Zugabe sensitiver gegenüber Atovaquon. Innerhalb desselben Stammes wurden keine signifikanten Unterschiede in den IC<sub>50</sub>-Werten mit und ohne D-Alanin beobachtet. Bei 15 µg/mL Blastocidin wurde zwischen DAAO<sup>+</sup> mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 15.6 ± 2.5 nM und DAAO<sup>-</sup> mit 14.9 ± 4.6 nM kein Unterschied ermittelt. Zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des Stammes mit inaktiver Mutante DAAO<sup>R285A</sup> mit und ohne Zugabe von D-Aminosäure wurde jedoch ein signifikanter Unterschied beobachtet (P = 0.027). Der Stamm war ohne Zugabe von D-Alanin sensitiver gegenüber Atovaquon. Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen 11.9 ± 1.2 nM für DAAO<sup>R285A+</sup> und 21.3 ± 2.5 nM für DAAO<sup>R285A-</sup>.

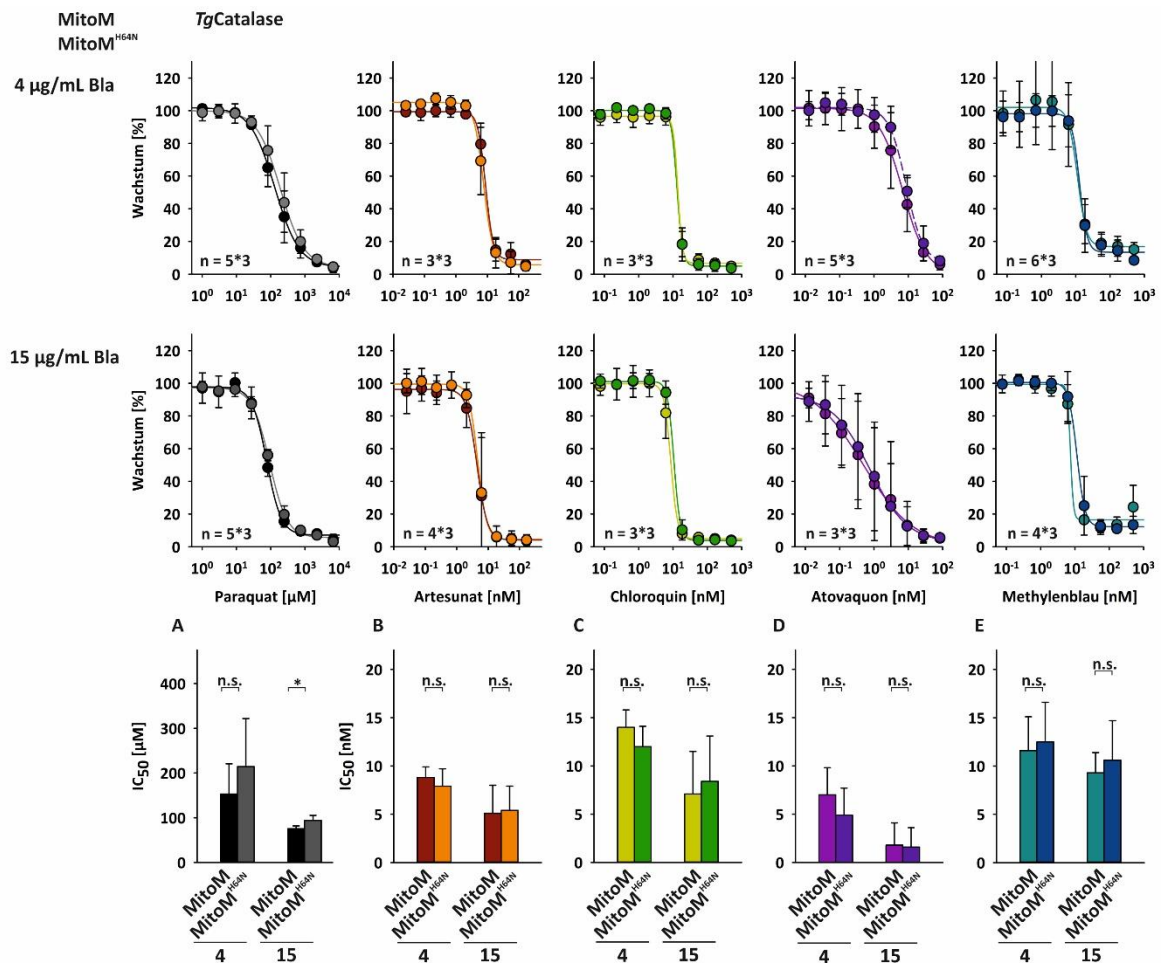
Für Methyleneblau (Abbildung 23 E) wurden sowohl bei 4 µg/mL Blastocidin als auch bei 15 µg/mL Blastocidin keine Unterschiede in den IC<sub>50</sub>-Werten ermittelt (4 µg/mL Blastocidin: DAAO<sup>+</sup>: 7.2 ± 1.4 nM, DAAO<sup>-</sup>: 7.2 ± 1.0 nM, DAAO<sup>R285A+</sup>: 6.9 ± 0.8 nM, DAAO<sup>R285A-</sup>: 7.3 ± 1.2 nM; 15 µg/mL Blastocidin: DAAO<sup>+</sup>: 9.4 ± 4.4 nM, DAAO<sup>-</sup>: 6.7 ± 0.4 nM, DAAO<sup>R285A+</sup>: 5.8 ± 0.9 nM, DAAO<sup>R285A-</sup>: 6.1 ± 0.4 nM).

**Tabelle 18** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer D-Aminosäureoxidase (DAAO) oder inaktiver Punktmutante DAAO<sup>R285A</sup> in der Verdauungsvakuole.

DV	4 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM]	147 ± 23	154 ± 18	76 ± 10	81 ± 11
Artesunat [nM]	5.0 ± 1.0	5.0 ± 2.7	5.3 ± 0.7	4.7 ± 1.5
Chloroquin [nM]	11.4 ± 0.3	12.6 ± 2.6	13.0 ± 2.6	9.9 ± 1.0
Atovaquon [nM]	11.4 ± 2.0	12.8 ± 3.1	26.1 ± 4.9	20.8 ± 0.6
Methylenblau [nM]	7.2 ± 1.14	7.2 ± 1.0	6.9 ± 0.8	7.3 ± 1.2
DV	15 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM]	161 ± 24	159 ± 45	79 ± 7	80 ± 10
Artesunat [nM]	6.4 ± 1.7	5.2 ± 1.6	5.7 ± 1.5	4.4 ± 0.8
Chloroquin [nM]	12.6 ± 3.2	12.0 ± 3.4	12.4 ± 3.6	11.1 ± 4.3
Atovaquon [nM]	15.6 ± 2.5	14.9 ± 4.6	11.9 ± 1.2	21.3 ± 2.5
Methylenblau [nM]	9.4 ± 4.4	6.7 ± 0.4	5.8 ± 0.9	6.1 ± 0.4

Erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der Verdauungsvakuole scheinen keinen Einfluss auf die Wirkweise der Antimalariamittel Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau zu haben. Ebenfalls mit der Positivkontrolle Paraquat wurden keine Sensitivitätsunterschiede mit und ohne D-Alanin-Inkubation beobachtet (Tabelle 18).

### 5.1.5.3. IC<sub>50</sub>-Analysen von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit heterologen Redoxenzymen in der mitochondrialen Matrix



**Abbildung 24** IC<sub>50</sub>-Messungen der Stämme mit heterologer Katalase oder Mutante Katalase<sup>H64N</sup> in der mitochondrialen Matrix mit den Substanzen Paraquat (A grau), Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methylenblau (E blau). Alle Messungen wurden bei 4 und 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y \* z; y = biologisches Replikat; z = technisches Replikat; Statistik (t-Test): \*: P ≤ 0.05, \*\*: P ≤ 0.01, \*\*\*: P ≤ 0.001).

Der Stamm mit heterologer Katalase in der mitochondrialen Matrix wurde mittels IC<sub>50</sub>-Messungen analysiert. Hierbei wurden Paraquat und die Antimalariamittel Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und die Substanz Methylenblau verwendet.

Für Paraquat (Abbildung 24 A) wurde bei 4 µg/mL Blasticidin ein IC<sub>50</sub>-Wert von 153 ± 68 µM für den Katalase-Stamm und 215 ± 107 µM für Katalase<sup>H64N</sup> bestimmt. Der Stamm mit aktiver Katalase war sensitiver als die Negativkontrolle. Dieser Unterschied war bei 4 µg/mL Blasticidin nicht signifikant. Bei 15 µg/mL Blasticidin wurden für den Katalase-Stamm ein IC<sub>50</sub>-Wert von 76 ± 6 µM und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm 94 ± 11 µM ermittelt. Hier war der Stamm mit der aktiven Katalase signifikant sensitiver (P = 0.012).

Für das Antimalariamittel Artesunat (Abbildung 24 B) wurden bei 4 µg/mL Blasticidin IC<sub>50</sub>-Werte von 8.8 ± 1.1 nM für den Katalase- und 7.9 ± 1.8 nM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm bestimmt. Bei 15 µg/mL Blasticidin wurde mit Artesunat ebenfalls kein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes beobachtet (Katalase: 5.1 ± 2.9 nM; Katalase<sup>H64N</sup>: 5.4 ± 2.5 nM).

Mit Chloroquin (Abbildung 24 C) wurden IC<sub>50</sub>-Werte von 14.0 ± 1.8 nM für den Katalase- und 12.0 ± 2.1 nM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm ermittelt. Hier wurde beobachtet, dass der Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm ein sensitiveres Verhalten aufwies, welches jedoch nicht signifikant war. Bei 15 µg/mL Blasticidin wurde ebenfalls kein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des Katalase- und des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes mit Chloroquin beobachtet. Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen für den Katalase-Stamm 9.4 ± 2.1 nM und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm 10.9 ± 1.9 nM.

Mit Atovaquon (Abbildung 24 D) wurde derselbe Trend beobachtet wie in den Stämmen mit heterologer Katalase im Cytosol und in der Verdauungsvakuole. Hier waren die IC<sub>50</sub>-Werte bei 15 µg/mL Blasticidin geringer als die bei 4 µg/mL Blasticidin. Sie betragen für den Katalase-Stamm 1.8 ± 2.3 nM und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm 1.6 ± 2.0 nM bei 15 µg/mL Blasticidin. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten bei gleichen Blasticidinmenge beobachtet. Jedoch war der IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes (4.9 ± 2.8 nM) bei 4 µg/mL Blasticidin tendenziell geringer als der IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase-Stammes (7.0 ± 2.8 nM). Demnach könnte der Stamm mit aktiver Katalase ggf. weniger sensitiv gegenüber Atovaquon als die Negativkontrolle gewesen sein.

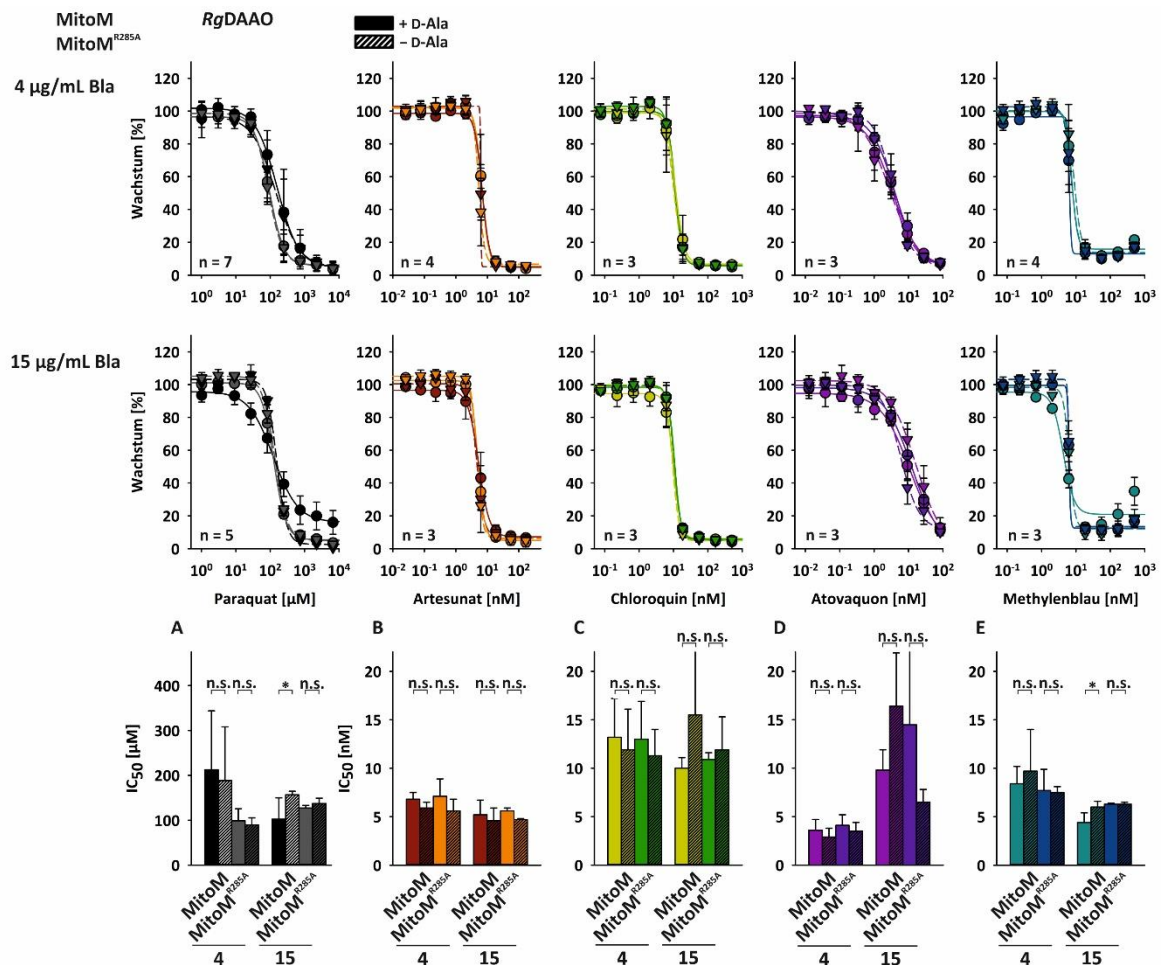
Für Methylenblau (Abbildung 24 E) wurde bei 4 µg/mL Blasticidin kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des Katalase- und Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes beobachtet (4 µg/mL Blasticidin: Katalase: 11.6 ± 3.5 nM, Katalase<sup>H64N</sup>: 12.5 ± 4.1 nM). Bei 15 µg/mL Blasticidin wurde ein Unterschied beobachtet. Hier betragen die IC<sub>50</sub>-Werte 9.3 ± 2.1 nM für den Katalase-Stamm und 10.6 ± 4.1 nM für den Katalase<sup>H64N</sup>. Der Stamm mit aktiver Katalase war ggf. sensitiver gegenüber Methylenblau als die Negativkontrolle. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

**Tabelle 19** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer Katalase oder inaktiver Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> in der mitochondrialen Matrix.

MitoM	4 µg/mL Blasticidin		15 µg/mL Blasticidin	
	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>
Paraquat [µM]	153 ± 68	215 ± 107	76 ± 6	94 ± 11
Artesunat [nM]	8.8 ± 1.1	7.9 ± 1.8	5.1 ± 2.9	5.4 ± 2.5
Chloroquin [nM]	14.0 ± 1.8	12.0 ± 2.1	9.4 ± 2.1	10.9 ± 1.9
Atovaquon [nM]	7.0 ± 2.8	4.9 ± 2.8	1.8 ± 2.3	1.6 ± 2.0
Methylenblau [nM]	11.6 ± 3.5	12.5 ± 4.1	9.3 ± 2.1	10.6 ± 4.1

Verringerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der mitochondrialen Matrix scheinen einen geringen Einfluss auf die Wirkweise der Substanz Paraquat zu haben. Unter dieser Bedingung wurde jedoch kein

Sensitivitätsunterschied mit den Antimalariamittel Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau beobachtet (Tabelle 19).



**Abbildung 25** IC<sub>50</sub>-Messungen der Stämme mit heterologer DAEO oder Mutante DAEO<sup>R285A</sup> in der mitochondrialen Matrix mit den Substanzen Paraquat (A grau)<sup>268</sup>, Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methylenblau (E blau). Alle Messungen wurden mit (ausgefüllte Balken) und ohne (gestreifte Balken) 5 mM D-Alanin und bei entweder 4 oder 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y; y = biologisches Replikat; technisches Replikat (z): mit D-Ala: z = 4; ohne D-Ala: z = 2; Statistik (One Way ANOVA Holm-Sidak Methode): \*: P ≤ 0.05, \*\*: P ≤ 0.01, \*\*\*: P ≤ 0.001).

Für die Stämme mit heterologer DAEO in der mitochondrialen Matrix wurden ebenfalls IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt.

Die Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte für Paraquat mit heterologer DAEO in der mitochondrialen Matrix wurde von Eileen Bischoff durchgeführt.<sup>268</sup> Die Daten wurden hier neu ausgewertet und zur Vollständigkeit nochmals beschrieben.

Für Paraquat (Abbildung 25 A) wurde bei 4 µg/mL Blasticidin für DAEO<sup>+</sup> ein IC<sub>50</sub>-Wert von 212 ± 131 µM und für DAEO<sup>-</sup> von 118 ± 120 µM bestimmt. Hier wurde ein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des DAEO- und des DAEO<sup>R285A</sup>-Stammes beobachtet. Die IC<sub>50</sub>-Werte des DAEO-Stammes mit und ohne

D-Alanin waren höher als die der Negativkontrollen. Die  $IC_{50}$ -Werte für die Negativkontrolle, den DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm, betragen  $99 \pm 27 \mu\text{M}$  für DAAO<sup>R285A+</sup> und  $90 \pm 16 \mu\text{M}$  für DAAO<sup>R285A-</sup>. Bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den  $IC_{50}$ -Werten von DAAO<sup>+</sup> ( $102 \pm 47 \mu\text{M}$ ) und DAAO<sup>-</sup> ( $157 \pm 8 \mu\text{M}$ ) beobachtet ( $P = 0.020$ ). Der  $IC_{50}$ -Wert für DAAO<sup>R285A+</sup> betrug  $127 \pm 6 \mu\text{M}$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $137 \pm 12 \mu\text{M}$ . Demnach war der Stamm mit aktiver DAAO unter Zugabe von D-Alanin sensitiver gegenüber Paraquat als die genutzten Negativkontrollen. Dieses Verhalten wurde ebenfalls in den  $IC_{50}$ -Kurven beobachtet. Der Kurvenverlauf bei DAAO<sup>+</sup> war flacher als bei allen anderen verwendeten Bedingungen.

Für Artesunat (Abbildung 25 B) betrug der  $IC_{50}$ -Wert für DAAO<sup>+</sup>  $6.8 \pm 0.7 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>-</sup>  $5.9 \pm 0.6 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>R285A+</sup>  $7.1 \pm 1.8$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $5.6 \pm 1.2 \text{ nM}$  bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin und für DAAO<sup>+</sup>  $5.2 \pm 1.5 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>-</sup>  $4.6 \pm 1.3 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>R285A+</sup>  $5.6 \pm 0.3 \text{ nM}$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $4.7 \pm 0.1 \text{ nM}$  bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin. Bei diesen Messungen war zu erkennen, dass die  $IC_{50}$ -Werte der Kontrollen ohne Zugabe von D-Alanin geringer waren als die  $IC_{50}$ -Werte des jeweiligen Stammes mit Zugabe von D-Alanin. Dieser Trend war sowohl bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin als auch bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin zu beobachten, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Dieses Verhalten wurde ebenfalls bei den  $IC_{50}$ -Werten mit Chloroquin (Abbildung 25 C) bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin beobachtet. Hier betragen die Werte für DAAO<sup>+</sup>  $13.2 \pm 4.0 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>-</sup>  $11.9 \pm 4.2 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>R285A+</sup>  $13.0 \pm 3.9 \text{ nM}$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $11.3 \pm 2.7 \text{ nM}$ . Die beobachteten Unterschiede waren nicht signifikant. Bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin wurde ein Unterschied zwischen dem  $IC_{50}$ -Wert von DAAO<sup>-</sup> ( $15.5 \pm 10.0 \text{ nM}$ ) und den  $IC_{50}$ -Werten der anderen Bedingungen (DAAO<sup>+</sup>:  $10.0 \pm 1.1$ ; DAAO<sup>R285A+</sup>:  $10.9 \pm 0.7 \text{ nM}$ ; DAAO<sup>R285A-</sup>:  $11.9 \pm 3.4 \text{ nM}$ ) beobachtet. Der Stamm mit aktiver DAAO in der mitochondrialen Matrix ohne Zugabe von D-Alanin war also ggf. weniger sensitiv verglichen mit allen sonst genutzten Bedingungen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Für Atovaquon (Abbildung 25 D) wurde bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin kein signifikanter Unterschied zwischen den  $IC_{50}$ -Werten beobachtet. Ebenso wie bei Artesunat und Chloroquin wurde hier beobachtet, dass die  $IC_{50}$ -Werte ohne Zugabe von D-Alanin im Vergleich zu den  $IC_{50}$ -Werten mit Zugabe von D-Alanin etwas geringer waren. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug für DAAO<sup>+</sup>  $3.6 \pm 1.1 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>-</sup>  $2.9 \pm 0.9 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>R285A+</sup>  $4.1 \pm 1.1 \text{ nM}$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $3.5 \pm 0.9 \text{ nM}$ . Zudem wurde beobachtet, dass die  $IC_{50}$ -Werte zwischen  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin und  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin sich um den Faktor 3 – 6 unterschieden. Die Stämme DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> waren bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin sensitiver gegenüber Atovaquon. Bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin wurde mit Atovaquon der geringste  $IC_{50}$ -Wert mit DAAO<sup>R285A-</sup> von  $6.5 \pm 1.3 \text{ nM}$  ermittelt. Der  $IC_{50}$ -Wert von DAAO<sup>R285A+</sup> betrug  $14.5 \pm 7.6 \text{ nM}$ . Mit dem DAAO-Stamm wurden  $IC_{50}$ -Werte von  $9.8 \pm 2.1 \text{ nM}$  für DAAO<sup>+</sup> und  $16.4 \pm 5.5 \text{ nM}$  für DAAO<sup>-</sup> ermittelt.

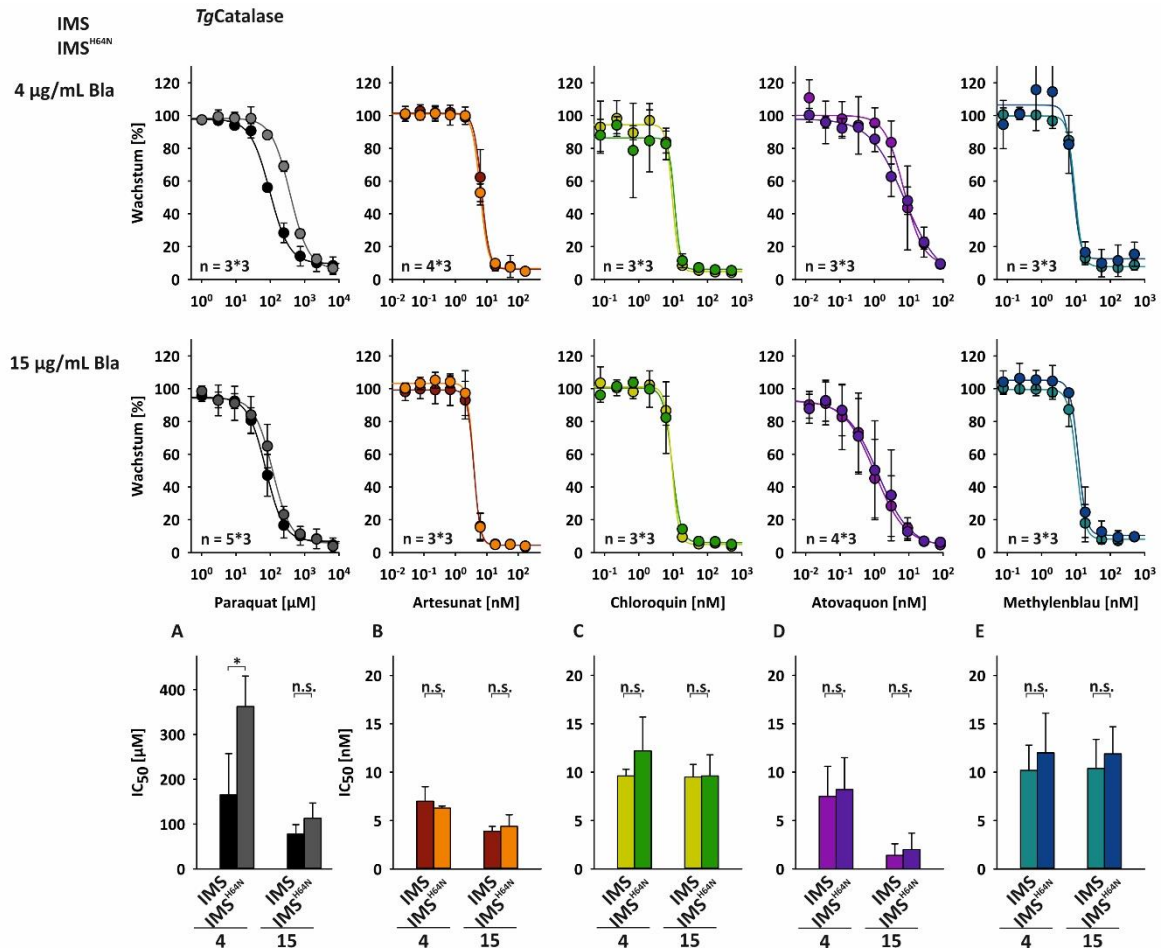
Mit Methylenblau (Abbildung 25 E) wurden bei 15 µg/mL Blastocidin IC<sub>50</sub>-Werte mit signifikantem Unterschied bei DAAO<sup>+</sup> und DAAO<sup>-</sup> bestimmt (P = 0.043). Hier betragen die Werte 4.4 ± 1.0 nM für DAAO<sup>+</sup> und 6.0 ± 0.6 nM für DAAO<sup>-</sup>. Der Stamm mit aktiver DAAO mit Zugabe von D-Alanin war sensitiver gegenüber Methylenblau als derselbe Stamm ohne Zugabe von D-Alanin. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Negativkontrollen DAAO<sup>R285A+</sup> und DAAO<sup>R285A-</sup> betragen 6.3 ± 0.1 nM und 6.3 ± 0.2 nM. Bei 4 µg/mL Blastocidin wurde mit Methylenblau kein Unterschied für den DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm beobachtet (DAAO<sup>R285A+</sup>: 7.7 ± 2.2 nM; DAAO<sup>R285A-</sup>: 7.5 ± 0.6 nM). Zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten des DAAO-Stammes war ein geringer Unterschied zu erkennen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen für DAAO<sup>+</sup> 8.4 ± 1.8 nM und für DAAO<sup>-</sup> 9.7 ± 4.3 nM. Der Stamm mit Zugabe von D-Alanin war ggf. sensitiver als die Kontrolle ohne Zugabe von D-Aminosäure. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

**Tabelle 20** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer D-Aminosäureoxidase (DAAO) oder inaktiver Punktmutante DAAO<sup>R285A</sup> in der mitochondrialen Matrix.

MitoM	4 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM] <sup>268</sup>	212 ± 131	188 ± 120	99 ± 27	90 ± 16
Artesunat [nM]	6.8 ± 0.7	5.9 ± 0.6	7.1 ± 1.8	5.6 ± 1.2
Chloroquin [nM]	13.2 ± 4.0	11.9 ± 4.2	13.0 ± 3.9	11.3 ± 2.7
Atovaquon [nM]	3.6 ± 1.1	2.9 ± 0.9	4.1 ± 1.1	3.5 ± 0.9
Methylenblau [nM]	8.4 ± 1.8	9.7 ± 4.3	7.7 ± 2.2	7.5 ± 0.6
MitoM	15 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM] <sup>268</sup>	102 ± 47	157 ± 8	127 ± 6	137 ± 12
Artesunat [nM]	5.2 ± 1.5	4.6 ± 1.3	5.6 ± 0.3	4.7 ± 0.1
Chloroquin [nM]	10.0 ± 1.1	15.5 ± 10.0	10.9 ± 0.7	11.9 ± 3.4
Atovaquon [nM]	9.8 ± 2.1	16.4 ± 5.5	14.5 ± 7.6	6.5 ± 1.3
Methylenblau [nM]	4.4 ± 1.0	6.0 ± 0.6	6.3 ± 0.1	6.3 ± 0.2

Erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der mitochondrialen Matrix scheinen einen Effekt auf die Wirkweise von Paraquat zu haben. Hierbei wurde erstmals eine Veränderung des Kurvenverlaufes der IC<sub>50</sub>-Kurve und demnach eine veränderte Sensitivität bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion beobachtet. Bei den untersuchten Antimalariamitteln wurde nur bei Methylenblau ein signifikanter Sensitivitätsunterschied ermittelt. Der Stamm mit aktiver DAAO war sensitiver, als die genutzten Kontrollen (Tabelle 20).

#### 5.1.5.4. IC<sub>50</sub>-Analysen von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit heterologen Redoxzymen im Intermembranraum des Mitochondriums



**Abbildung 26** IC<sub>50</sub>-Messungen der Stämme mit heterologer Katalase oder Mutante Katalase<sup>H64N</sup> im Intermembranraum des Mitochondriums mit den Substanzen Paraquat (A grau), Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methyleneblau (E blau). Alle Messungen wurden bei 4 und 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y \* z; y = biologisches Replikat; z = technisches Replikat; Statistik (t-Test): \*: P ≤ 0.05, \*\*: P ≤ 0.01, \*\*\*: P ≤ 0.001).

Zur Analyse von verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Intermembranraum des Mitochondriums von *Plasmodium falciparum* wurde der 3D7 Stamm mit heterologer Katalase im Intermembranraum des Mitochondriums mittels IC<sub>50</sub>-Messungen analysiert. Hierbei wurden neben der Positivkontrolle Paraquat, die Antimalariamittel Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und sowie die Substanz Methyleneblau verwendet.

Für Paraquat (Abbildung 26 A) wurde bei 4 µg/mL Blasticidin ein signifikanter Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase- und des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes beobachtet (P = 0.041). Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen 165 ± 92 µM für den Katalase- und 362 ± 68 µM für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm. Der Stamm mit aktiver Katalase im Intermembranraum des Mitochondriums war signifikant sensitiver verglichen mit der Negativkontrolle. Bei 15 µg/mL Blasticidin war ebenfalls eine erhöhte Sensitivität des Katalase-

Stammes zu beobachten. Hier war der Unterschied jedoch nicht signifikant (Katalase:  $78 \pm 21 \mu\text{M}$ ; Katalase<sup>H64N</sup>:  $113 \pm 34 \mu\text{M}$ ).

Für das Antimalariamittel Artesunat (Abbildung 26 B) wurde keine Unterschiede in den IC<sub>50</sub>-Werten zwischen dem Katalase- und dem Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm beobachtet. Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin für den Katalase-Stamm  $7.0 \pm 1.5 \text{ nM}$  und  $6.3 \pm 0.2 \text{ nM}$  für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm und mit  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin  $3.9 \pm 0.5 \text{ nM}$  bzw.  $4.4 \pm 1.2 \text{ nM}$ .

Für Chloroquin (Abbildung 26 C) war bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin ggf. eine erhöhte Sensitivität im Katalase-Stamm zu erkennen. Hier betrug der IC<sub>50</sub>-Wert für den Katalase-Stamm  $9.6 \pm 0.7 \text{ nM}$  und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm  $12.2 \pm 3.5 \text{ nM}$ . Der Unterschied zwischen diesen IC<sub>50</sub>-Werten war jedoch nicht signifikant. Bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin wurde kein Unterschied zwischen dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase-Stammes von  $9.5 \pm 1.3 \text{ nM}$  und dem IC<sub>50</sub>-Wert des Katalase<sup>H64N</sup>-Stammes von  $9.6 \pm 2.2 \text{ nM}$  beobachtet.

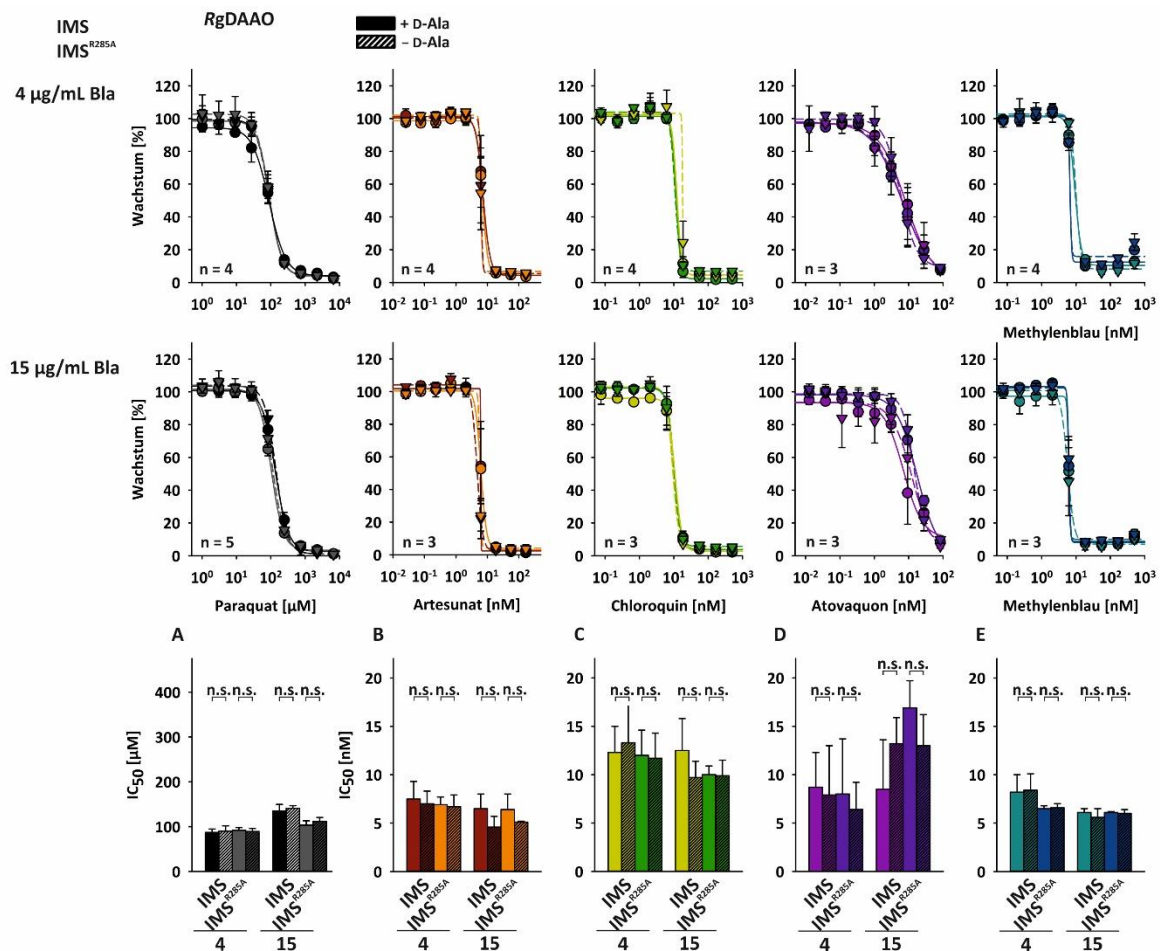
Für Atovaquon (Abbildung 26 D) wurden IC<sub>50</sub>-Werte von  $7.5 \pm 3.1 \text{ nM}$  für den Katalase-Stamm und  $8.2 \pm 3.3 \text{ nM}$  für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin ermittelt. Bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin wurde für den Katalase-Stamm ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $1.4 \pm 1.2 \text{ nM}$  und für den Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm von  $2.0 \pm 1.7 \text{ nM}$  gemessen. Bei beiden Blasticidinmengen war der Katalase-Stamm ggf. geringfügig sensitiver gegenüber Atovaquon, jedoch war kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Hingegen war bei den Stämmen mit heterologer Katalase im Intermembranraum des Mitochondriums, wie bei allen anderen Lokalisationen, ebenfalls ein größerer Unterschied in den IC<sub>50</sub>-Werten bei  $4$  und  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin zu erkennen. Die Werte bei erhöhter Blasticidinmenge waren geringer als bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin.

Für Methyleneblau (Abbildung 26 E) wurde sowohl bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin als auch bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin beobachtet, dass der Katalase-Stamm ggf. sensitiver war als der Katalase<sup>H64N</sup>-Stamm. Der Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten bei beiden Blasticidinmengen war jedoch nicht signifikant ( $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin: Katalase:  $10.2 \pm 2.6 \text{ nM}$ ; Katalase<sup>H64N</sup>:  $12.0 \pm 4.1 \text{ nM}$ ;  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin: Katalase:  $10.4 \pm 3.0 \text{ nM}$ , Katalase<sup>H64N</sup>:  $11.9 \pm 2.8 \text{ nM}$ ).

**Tabelle 21** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer Katalase oder inaktiver Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> im Intermembranraum des Mitochondriums.

IMS	4 $\mu\text{g/mL}$ Blasticidin		15 $\mu\text{g/mL}$ Blasticidin	
	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>
Paraquat [ $\mu\text{M}$ ]	$165 \pm 92$	$362 \pm 68$	$78 \pm 21$	$113 \pm 34$
Artesunat [nM]	$7.0 \pm 1.5$	$6.3 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.5$	$4.4 \pm 1.2$
Chloroquin [nM]	$9.6 \pm 0.7$	$12.2 \pm 3.5$	$9.5 \pm 1.3$	$9.6 \pm 2.2$
Atovaquon [nM]	$7.5 \pm 3.1$	$8.2 \pm 3.3$	$1.4 \pm 1.2$	$2.0 \pm 1.7$
Methyleneblau [nM]	$10.2 \pm 2.6$	$12.0 \pm 4.1$	$10.4 \pm 3.0$	$11.9 \pm 2.8$

Bei verringerten  $H_2O_2$ -Mengen im Intermembranraum des Mitochondriums wurde ein geringer Anstieg der Sensitivität gegenüber der Substanz Paraquat ermittelt. Mit den getesteten Antimalariamittel wurde kein Effekt beobachtet (Tabelle 21).



**Abbildung 27**  $IC_{50}$ -Messungen der Stämme mit heterologer DAAO oder Mutante DAAO<sup>R285A</sup> im Intermembranraum des Mitochondriums mit den Substanzen Paraquat (A grau)<sup>268</sup>, Artesunat (B rot/orange), Chloroquin (C grün), Atovaquon (D lila) und Methyleneblau (E blau). Alle Messungen wurden mit (ausgefüllte Balken) und ohne (gestreifte Balken) 5 mM D-Alanin und bei entweder 4 oder 15  $\mu\text{g/mL}$  Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). ( $n = y$ ;  $y =$  biologisches Replikat; technisches Replikat ( $z$ ): mit D-Ala:  $z = 4$ ; ohne D-Ala:  $z = 2$ ; Statistik (One Way ANOVA Holm-Sidak Methode): \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ).

Der Stamm mit heterologer DAAO im Intermembranraum des Mitochondriums wurde ebenfalls mittels  $IC_{50}$ -Messungen analysiert.

Die Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte für Paraquat mit heterologer DAAO im Intermembranraum des Mitochondriums wurde von Eileen Bischoff durchgeführt.<sup>268</sup> Die Daten wurden hier neu ausgewertet und zur Vollständigkeit nochmals beschrieben.

Für Paraquat (Abbildung 27 A) wurde sowohl bei 4  $\mu\text{g/mL}$  Blasticidin als auch bei 15  $\mu\text{g/mL}$  kein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten beobachtet (4  $\mu\text{g/mL}$  Blasticidin:

DAAO<sup>+</sup>:  $87 \pm 7 \mu\text{M}$ , DAAO<sup>-</sup>:  $90 \pm 12 \mu\text{M}$ , DAAO<sup>R285A+</sup>:  $92 \pm 6 \mu\text{M}$ , DAAO<sup>R285A-</sup>:  $89 \pm 7 \mu\text{M}$ ). Bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin war ein Unterschied zwischen dem DAAO- und DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm zu beobachten. Hier betragen die IC<sub>50</sub>-Werte für DAAO<sup>+</sup>  $135 \pm 14 \mu\text{M}$ , für DAAO<sup>-</sup>  $141 \pm 6 \mu\text{M}$ , für DAAO<sup>R285A+</sup>  $103 \pm 10 \mu\text{M}$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $112 \pm 9 \mu\text{M}$ . Der DAAO-Stamm war somit weniger sensitiv gegenüber Paraquat als die Negativkontrolle, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von D-Alanin.

Für Artesunat (Abbildung 27 B) wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet ( $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin: DAAO<sup>+</sup>:  $7.5 \pm 1.5 \text{ nM}$ , DAAO<sup>-</sup>:  $7.0 \pm 1.3 \text{ nM}$ , DAAO<sup>R285A+</sup>:  $6.9 \pm 0.8 \text{ nM}$ , DAAO<sup>R285A-</sup>:  $6.7 \pm 1.2 \text{ nM}$ ). Jedoch war zu beobachten, dass bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin sowohl im DAAO- als auch im DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm tendenziell eine geringere Sensitivität durch Zugabe der D-Aminosäure D-Alanin erzeugt wurde. Die IC<sub>50</sub>-Werte betragen für DAAO<sup>+</sup>  $6.5 \pm 1.5 \text{ nM}$ , für DAAO<sup>-</sup>  $4.6 \pm 1.1$ , für DAAO<sup>R285A+</sup>  $6.4 \pm 1.6 \text{ nM}$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $5.1 \pm 1.0 \text{ nM}$ .

Für Chloroquin (Abbildung 27 C) wurde bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin eine ggf. geringere Sensitivität des DAAO-Stammes bei Zugabe von D-Alanin beobachtet. Hier betrug der IC<sub>50</sub>-Wert  $12.5 \pm 3.3 \text{ nM}$ . Die Kontrollen ergaben IC<sub>50</sub>-Werte von  $9.7 \pm 1.7 \text{ nM}$  für DAAO<sup>-</sup>,  $10.0 \pm 0.9 \text{ nM}$  für DAAO<sup>R285A+</sup> und  $9.9 \pm 1.6 \text{ nM}$  für DAAO<sup>R285A-</sup>. Der Unterschied zwischen diesen Werten war nicht signifikant. Bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin wurden die IC<sub>50</sub>-Werte  $12.3 \pm 2.7 \text{ nM}$  für DAAO<sup>+</sup>,  $13.3 \pm 4.0 \text{ nM}$  für DAAO<sup>-</sup>,  $12.0 \pm 2.6 \text{ nM}$  für DAAO<sup>R285A+</sup> und  $11.7 \pm 2.6 \text{ nM}$  für DAAO<sup>R285A-</sup> ermittelt. Hier wurde kein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet.

Für Atovaquon (Abbildung 27 D) betrug bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin der IC<sub>50</sub>-Wert für DAAO<sup>+</sup>  $8.7 \pm 3.6 \text{ nM}$  und für DAAO<sup>-</sup>  $7.9 \pm 5.1 \text{ nM}$ . Im DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm betrug der IC<sub>50</sub>-Wert für DAAO<sup>R285A+</sup>  $8.0 \pm 5.7 \text{ nM}$  und für DAAO<sup>R285A-</sup>  $6.4 \pm 2.8 \text{ nM}$ . Bei  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin war eine ggf. erhöhte Sensitivität unter DAAO<sup>+</sup> Bedingungen zu erkennen. Hier betrug der IC<sub>50</sub>-Wert  $5.8 \pm 5.1 \text{ nM}$ , verglichen zu DAAO<sup>-</sup> mit  $13.2 \pm 2.7 \text{ nM}$ . Für DAAO<sup>R285A+</sup> wurde hingegen eine ggf. verringerte Sensitivität mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $16.9 \pm 2.8 \text{ nM}$  beobachtet. Der IC<sub>50</sub>-Wert für DAAO<sup>R285A-</sup> betrug  $13.0 \pm 3.2 \text{ nM}$ . Die für Atovaquon gemessenen Unterschiede in den IC<sub>50</sub>-Werten waren statistisch nicht signifikant.

Für Methyleneblau (Abbildung 27 E) wurde ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den IC<sub>50</sub>-Werten beobachtet ( $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin: DAAO<sup>+</sup>:  $8.2 \pm 1.8 \text{ nM}$ , DAAO<sup>-</sup>:  $8.4 \pm 1.7 \text{ nM}$ , DAAO<sup>R285A+</sup>:  $6.5 \pm 0.3 \text{ nM}$ , DAAO<sup>R285A-</sup>:  $6.6 \pm 0.4 \text{ nM}$ ;  $15 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin: DAAO<sup>+</sup>:  $6.1 \pm 0.4 \text{ nM}$ , DAAO<sup>-</sup>:  $5.6 \pm 0.9 \text{ nM}$ , DAAO<sup>R285A+</sup>:  $6.1 \pm 0.1 \text{ nM}$ , DAAO<sup>R285A-</sup>:  $6.0 \pm 0.4 \text{ nM}$ ). Bei  $4 \mu\text{g/mL}$  Blasticidin wurde ein geringer Unterschied zwischen der Sensitivität des DAAO-Stammes verglichen mit der Negativkontrolle, dem DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm, ermittelt. Die IC<sub>50</sub>-Werte des DAAO-Stammes mit und ohne Zugabe von D-Alanin waren höher als die des DAAO<sup>R285A</sup>-Stammes.

Bei erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Intermembranraum des Mitochondriums wurden keine Sensitivitätsunterschiede mit den hier getesteten Substanzen beobachtet (Tabelle 22).

**Tabelle 22** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte der *Plasmodium falciparum* Stämme mit heterologer D-Aminosäureoxidase (DAAO) oder inaktiver Punktmutante DAAO<sup>R285A</sup> im Intermembranraum des Mitochondriums.

IMS	4 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM] <sup>268</sup>	87 ± 7	90 ± 12	92 ± 6	89 ± 7
Artesunat [nM]	7.5 ± 1.8	7.0 ± 1.3	6.9 ± 0.8	6.7 ± 1.2
Chloroquin [nM]	12.3 ± 2.7	13.3 ± 4.0	12.0 ± 2.6	11.7 ± 2.6
Atovaquon [nM]	8.7 ± 3.6	7.9 ± 5.1	8.0 ± 5.7	6.4 ± 2.8
Methylenblau [nM]	8.2 ± 1.8	8.4 ± 1.7	6.5 ± 0.3	6.6 ± 0.4
	15 µg/mL Blastocidin			
	DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>
Paraquat [µM] <sup>268</sup>	135 ± 14	141 ± 6	103 ± 10	112 ± 9
Artesunat [nM]	6.5 ± 1.5	4.6 ± 1.1	6.4 ± 1.6	5.1 ± 1.0
Chloroquin [nM]	12.5 ± 3.3	9.7 ± 1.7	10.0 ± 0.9	9.9 ± 1.6
Atovaquon [nM]	8.5 ± 5.1	13.2 ± 2.7	16.9 ± 2.8	13.0 ± 3.2
Methylenblau [nM]	6.1 ± 0.4	5.6 ± 0.9	6.1 ± 0.1	6.0 ± 0.4

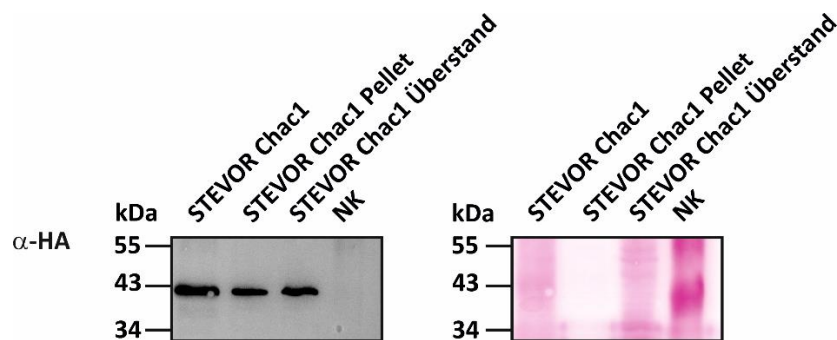
In den hier bestimmten IC<sub>50</sub>-Werten wurden nur vereinzelt Unterschiede in der Sensitivität beobachtet. Bei Unterschieden kam es sowohl bei verringerten als auch bei erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen zu einer gesteigerten Sensitivität des jeweiligen Parasitenstammes. Die kompartiment-spezifische Veränderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge scheint jedoch keinen bzw. nur geringen Einfluss auf die Wirkweise der Antimalariamittel Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau zu haben.

### 5.1.6. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit heterologer Chac1 oder DAAO mit STEVOR-Exportsignal

Die in diesem Kapitel genutzten Plasmide wurden wie die zuvor beschriebenen kloniert (5.1.1). Als Targetingsequenz wurden die 80 N-terminalen Aminosäuren der *subtelomeric variable open reading frame* (STEVOR) Exportsequenz und als Tag der 3xHA-Tag genutzt.<sup>273</sup> Die kombinierten Genabschnitte wurden mit dem Genabschnitt kodierend für die *Rhodoturula gracilis* DAAO oder für die *mouse* glutathionspezifische  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase 1 (Chac1) in das pHBIRH-Plasmid kloniert und erfolgreich in *Plasmodium falciparum* 3D7 WT Parasiten transfiziert.

Das Enzym Chac1 baut Glutathion unter Produktion von 5-Oxoprolin und Cysteinyl-Glycin ab und eine Überexpression des Gens führt in Hefe zur Glutathiondepletion, was Apoptose zur Folge hat.<sup>274</sup>

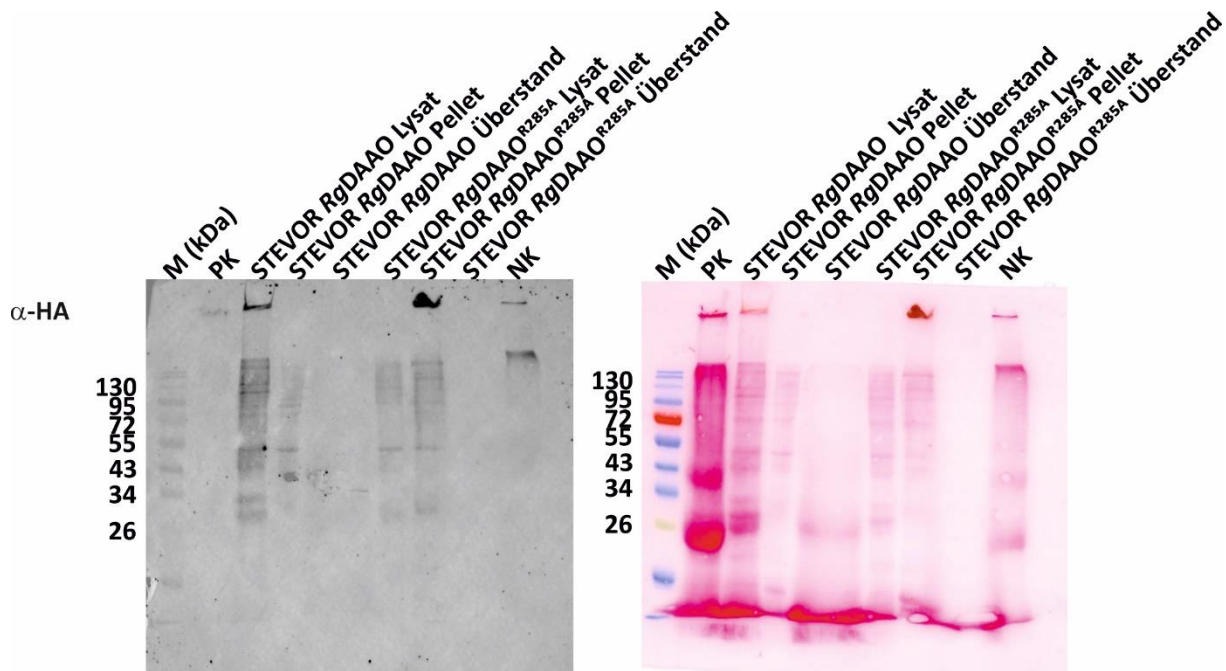
Die Produktion des STEVOR-Chac1 Konstrukts in *Plasmodium falciparum* wurde mittels Westernblotanalyse überprüft (Abbildung 28).



**Abbildung 28** Westernblotanalyse von 3D7 STEVOR + 3xHA + Chac1 pHBIRH-Kulturen mit 4  $\mu$ g/mL Blasticidin. Für den Westernblot wurden aufkonzentrierte Schizontenkulturen mit einer Parasitämie von 5 – 10 % genutzt. Anschließend wurde eine Saponinlyse durchgeführt und Volllysat (7 %), Pellet (10 %)- und Überstandsfraction (10 %) aufgetragen. Der Überstand wurde mit 10 % Trichloressigsäure gefällt und der pH-Wert wurde mittels NaOH eingestellt. Größe des erwartenden Konstruktes: STEVOR + 3xHA + Chac1: 38 kDa; 3xHA + Chac1: 28 kDa, Negativkontrolle: pHBIRH-Expressionsvektor mit Luciferasegen.

Es wurde die Produktion und die Lokalisation des STEVOR-Chac1-Konstruktes im Erythrozyten überprüft. Hierfür wurde der Überstand und das Pellet einer Saponinlyse von synchronen, aufkonzentrierten Schizontenkulturen mit 4  $\mu$ g/mL Blasticidin aufgetragen. Es konnte die STEVOR + 3xHA + Chac1 Größe von 38 kDa im Volllysat, im Pellet und der Überstandsfraction nachgewiesen werden. Die Lysatprobe ist ein Volllysat von Erythrozyten und Parasiten. Für die Trennung der Pellet- und Überstandsfraction wurde ein Volllysat mit Saponin lysiert. Saponin lysiert die Erythrozytenmembran, wodurch der Parasit und der Erythrozyt voneinander getrennt werden kann. Die Fraktion „Pellet“ beinhaltet nur Parasitenproteine, wohingegen der Überstand mit TCA gefällt wurde und die Protein des Erythrozyten beinhaltet.<sup>275</sup> Aufgrund dessen dient dieser Westernblot als Nachweis für den Export des Konstruktes in den Erythrozyten.

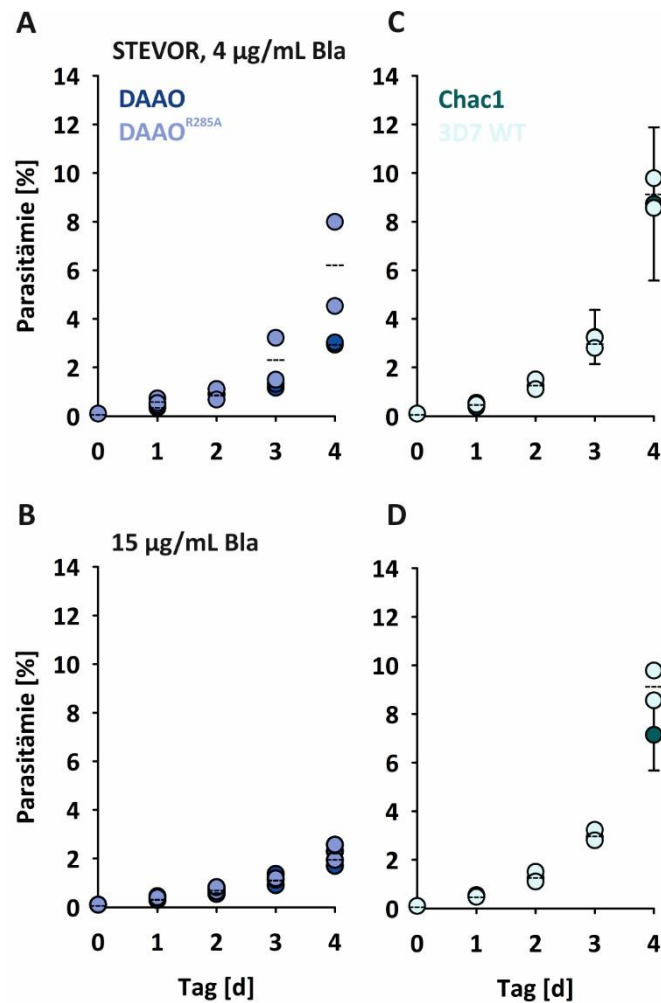
Zusätzlich wurde dieselbe Vorgehensweise für den STEVOR-DAAO-Stamm und die Negativkontrolle STEVOR-DAAO<sup>R285A</sup> angewandt (Abbildung 29).



**Abbildung 29** Westernblotanalyse der 3D7 STEVOR + 3xHA + DAAO/DAAO<sup>R285A</sup> pHBIRH-Stämme mit 4 µg/mL Blasticidin. Für den Westernblot wurden aufkonzentrierte Schizontenkulturen mit einer Parasitämie von 5 – 10 % genutzt. Anschließend wurde eine Saponinlyse durchgeführt und Volllysat (5 %), Pellet (20 %)- und Überstandsfraction (20 %) aufgetragen. Der Überstand wurde mit 10 % Trichloressigsäure gefällt und der pH-Wert wurde mittels NaOH eingestellt. Größe des erwartenden Konstruktes: STEVOR + 3xHA + DAAO: 53 kDa; 3xHA + DAAO: 44 kDa; PK (MitoM Katalase): 68/60 kDa; Negativkontrolle: pHBIRH-Expressionsvektor.

Es wurde sowohl im DAAO-Stamm als auch im DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm im Volllysat und in der Pellet Fraction, eine Bande passend für das unprozessierte Protein bei etwa 53 kDa beobachtet. Zum Überprüfen des Exportes wurde ebenfalls für beide Stämme der Überstand einer Saponinlyse aufgetragen, in dem keine Banden beobachtet wurden. Die TCA Fällung des Überstandes scheint nicht effizient gewesen zu sein. Zudem zeigt die Westernblotanalyse kein eindeutiges Ergebnis, da die Positivkontrolle bei 68 bzw. 60 kDa keine Bande aufwies.

Diese STEVOR-Stämme wurden außerdem auf ihr Wachstumsverhalten untersucht.



**Abbildung 30** Wachstumskurven der Stämme mit exportierter heterologer D-Aminosäureoxidase (A/B blau) oder heterologem Chac1 (C/D grün) oder der Negativkontrolle DAAO<sup>R285A</sup> (A/B hellblau) und 3D7 WT (C/D hellgrün). Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Die Versuche wurden bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blastocidin durchgeführt. Für den 3D7 WT Stamm wurde kein Blastocidin zugegeben. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von >2000 RBCs mit einer Standardabweichung von ≤0.1 %. Die Datenpunkte bilden eigenständige Versuche ab. Der Mittelwert der Replikate wird durch das gestrichelte Symbol dargestellt. (DAAO/DAAO<sup>R285A</sup> (A/B): n = 2, 4 µg/mL Blastocidin Chac1 (C): n = 4, 15 µg/mL Blastocidin Chac1 (D): n = 3, 3D7 WT (C/D): n = 2; n = biologische Replikate).

Bei 4 µg/mL Blastocidin wurde eine 1.24-fache Verdopplungszeit des DAAO- verglichen mit dem DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm beobachtet. Die Verdopplungszeiten betragen für den DAAO-Stamm 0.87 d und für den DAAO<sup>R285A</sup>-Stamm 0.70 d (Abbildung 30 A). Bei 15 µg/mL Blastocidin wurde hingegen keine veränderte Verdopplungszeit bei erhöhter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Erythrozyten beobachtet (DAAO: 1.00 d; DAAO<sup>R285A</sup>: 0.94 d; 1.06-fach; Abbildung 30 B). Durch die Analyse des Chac1-Stammes mit dem Exportsignal STEVOR wurde der Einfluss des GSH-Gehalts auf das Wachstum des Parasiten untersucht. Hier wurde bei 4 µg/mL Blastocidin eine Verdopplungszeit von  $0.64 \pm 0.07$  d ermittelt (Abbildung 30 C). Verglichen mit der Verdopplungszeit der Negativkontrolle, dem 3D7 WT Stamm, wurde kein abweichendes Wachstumsverhalten beobachtet. Die Verdopplungszeit der Negativkontrolle betrug

0.63 d. Bei 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin wurde ebenfalls kein Effekt beobachtet. Die Verdopplungszeit betrug  $0.68 \pm 0.02$  d, was einer 1.06-fachen Verdopplungszeit entsprach (Abbildung 30 D).

Demnach haben verringerte Glutathionmengen im Erythrozyten vermutlich keinen Einfluss auf das Wachstum des Parasiten (Tabelle 23). Erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen im Erythrozyten scheinen jedoch das Wachstum des Parasiten bei 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin negativ zu beeinflussen.

**Tabelle 23** Verdopplungszeiten der Stämme mit exportierter heterologer DAAO oder heterologem Chac1 und der Negativkontrolle DAAO<sup>R285A</sup> bei 4 und 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin. Als weitere Kontrolle wurde der 3D7 WT Stamm genutzt. Die Verdopplungszeiten wurden aus den in **Abbildung 30** dargestellten Wachstumskurven bestimmt. Das Ergebnis der biologischen Replikate wurde gemittelt. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten Mut/WT wurde angegeben.

		4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin		15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin	
		Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut	Verdopplungszeit [d]	Verhältnis WT/Mut
STEVOR	DAAO	0.87	1.24	1.00	1.06
	DAAO <sup>R285A</sup>	0.70		0.94	
	Chac1	$0.64 \pm 0.07$	1.00	$0.68 \pm 0.02$	1.06
	3D7 WT			0.63	

Der *Plasmodium falciparum* Stamm mit STEVOR-Chac1 wurde mittels DTNB-Recyclingassays<sup>261</sup> auf den Gesamtglutathiongehalt im Erythrozyten untersucht. Hierbei wurden Kulturen mit 4 und 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin verwendet und der 3D7 WT Stamm als Kontrolle genutzt.

**Tabelle 24** Im DTNB-Assay ermittelte GSH-Konzentrationen für die Kontrolle 3D7 WT und den GSH-Depletionsstamm mit exportiertem Chac1 mit 4 und 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin. Die errechnete GSH-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] im Lysat wurde gegen die Absorption bei 450 nm bzw. 545 nm normalisiert ( $n = 1$ ,  $n =$  biologische Replikate).

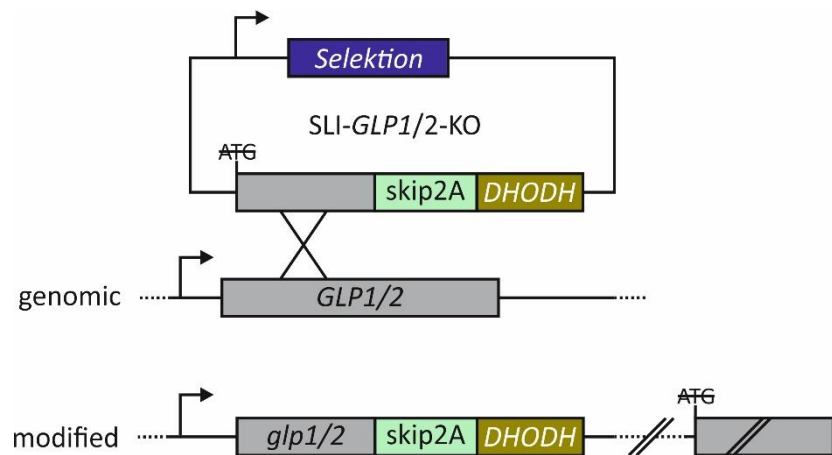
	GSH (Probe) [ $\mu\text{M}$ ]	GSH/Häm (450 nm)	GSH/Häm (545 nm)
3D7 WT	80	7	7
Chac1 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Bla	134	18	22
Chac1 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Bla	94	9	8

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gemessenen GSH-Konzentrationen auf die Hämabsorption normiert. Hierbei wurde für den 3D7 WT Stamm ein Wert von jeweils 7 ermittelt. Bei 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin wurde für den STEVOR-Chac1 Stamm ein Wert von 18 bzw. 22 beobachtet und bei erhöhter Blasticidinmenge von 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ein Wert von 9 bzw. 8. Zwischen der Normierung auf die Absorption bei 450 nm und 545 nm wurde somit kein großer Unterschied beobachtet.

Die Gesamtglutathionmenge im 3D7 WT Stamm und dem untersuchten STEVOR-Chac1 Stamm weist nur bei 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin eine geringe Abweichung auf.

Zusätzlich wurden von Frau Jessica Kehrer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Lanzer am Universitätsklinikums Heidelberg Oxidationsmessungen durchgeführt. Hierbei wurde eine gesteigerte Oxidation in den frühen Trophozoitenstadien des STEVOR-Chac1-Stamm beobachtet.



5.2. Untersuchung der *Glutaredoxin-like proteins* Glp1, Glp2 und Glp3 in *Plasmodium falciparum*

**Abbildung 31** Schematische Darstellung des *selection linked integration*-Systems (SLI)<sup>92</sup> zur Erstellung von  $\Delta glp1$ - und  $\Delta glp2$ -Stämmen. Das SLI-Plasmid besteht aus den Genen kodierend für einen Selektionsmarker (lila), dem Genfragment kodierend für das Knockout-Gen *GLP1/GLP2* ohne Startcodon ATG (grau), der Sequenz kodierend für das skip2A-Peptid (grün) und dem Gen für den Integrationsmarker  $\gamma$ DHODH (gelb).

Es wurden bereits Untersuchungen an den *Glutaredoxine-like proteins* *PfGlp1* und *PfGlp2* in *Plasmodium falciparum* durch Erstellen von Knockout-Stämmen vorgenommen. Diese Stämme wurden mittels Wachstumskurven und  $IC_{50}$ -Messungen analysiert.<sup>276</sup> Durch das Messen von  $IC_{50}$ -Werten von Substanzen, welche Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine oder den Eisen-Schwefel-Cluster-Metabolismus beeinflussen, wurde die Funktion der Proteine *PfGlp1* und *PfGlp2* untersucht. Hierbei wurde sowohl bei erhöhten als auch erniedrigten Eisen-Leveln sowie auch durch Beeinflussung des Eisen-Schwefel-Cluster-Metabolismus keine Funktion der Proteine in diesen Stoffwechselwegen festgestellt.<sup>276</sup> Zur weiteren Untersuchung der *Glutaredoxine-like proteins* in *Plasmodium falciparum* wurden deshalb in dieser Arbeit Doppelknockouts der drei *GLP*-Gene in *Plasmodium falciparum* Stämmen erzeugt.

Die Doppelknockouts wurden mittels *selection linked integration* (SLI)<sup>92</sup> in bereits bestehenden  $\Delta glp1$ -,  $\Delta glp2$ - und  $\Delta glp3$ -Stämmen erzeugt (Abbildung 31). Die bereits untersuchten 3D7  $\Delta glp1$ - und 3D7  $\Delta glp2$ -Stämme wurden mittels WR-Selektionsmarker und NeoR-Integrationsmarker hergestellt.<sup>276</sup> Für den  $\Delta glp3$ -Stamm wurde eine Zelllinie vom Arbeitskreis von Herrn Jude M Przyborski zur Verfügung gestellt. Dieser *Plasmodium falciparum* NF54 Stamm trägt an Stelle des *GLP3*-Gens ein Gen kodierend für Orp1-roGFP2, welches durch das pDC2-CAM-[X]-bsd-attP Plasmid erzeugt wurde.<sup>277</sup> Zur Gewährleistung der Funktion und Vermeidung ungewünschter homologer Rekombination wurden SLI-Plasmide mit geänderter Terminatorsequenz und alternativem Selektions- und Integrationsmarker erstellt.

**Tabelle 25** Zusammensetzung der Plasmide welche für die Erstellung der bereits vorhandenen *GLP*-Knockout-Stämme genutzt wurden.

Stamm	Promotor	Terminator	Selektionsmarker	Integrationsmarker
$\Delta glp1$	Cam 5'	hrp2 3'	<i>hDHFR</i>	NeoR
$\Delta glp2$	Cam 5'	hrp2 3'	<i>hDHFR</i>	NeoR
$\Delta glp3^{277}$	n.s.	n.s.	<i>bsd</i>	NeoR

Um einen 3D7  $\Delta glp2\Delta glp1$ -Stamm (Tabelle 26) zu erzeugen wurde im bereits vorhandenen SLI-*PFGLP1*-Plasmid (Tabelle 25) das Gen kodierend für den Selektionsmarker DHFR gegen das Gen kodierend für den Selektionsmarker *bsd* ausgetauscht. Zudem wurde das Gen kodierend für den Integrationsmarker NeoR gegen *yDHODH* getauscht.

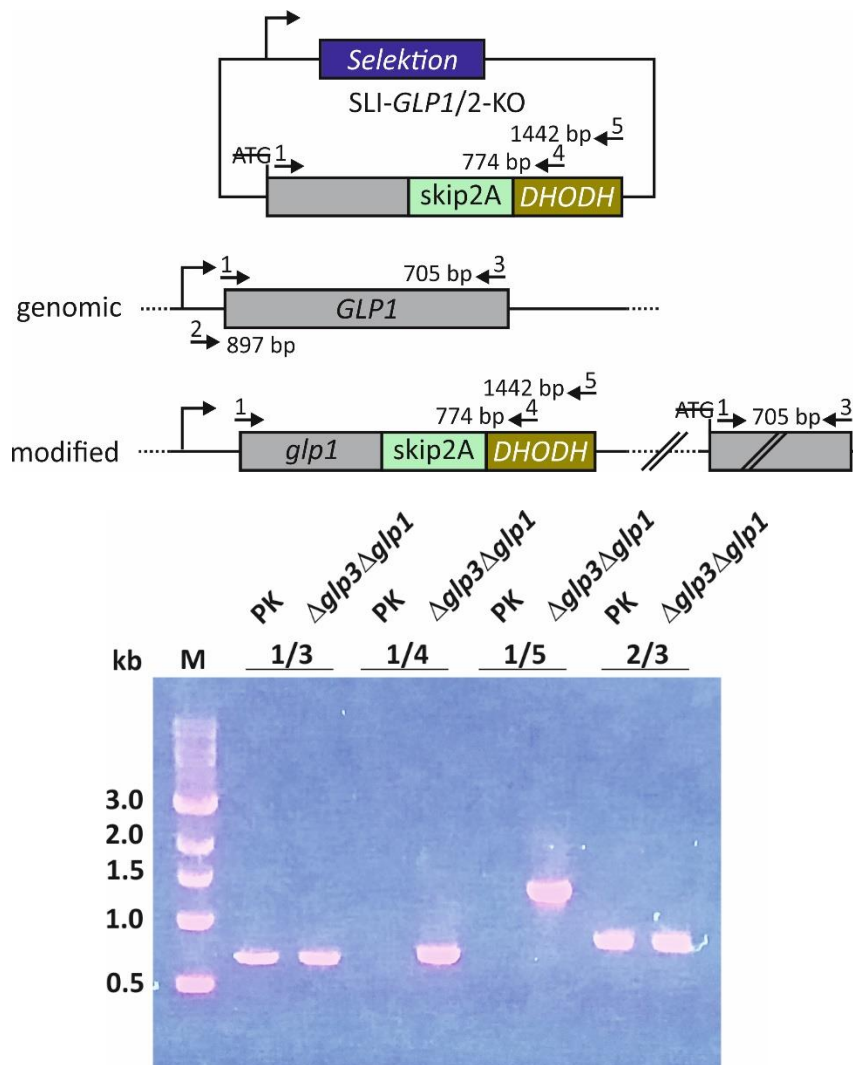
Um NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$ - und  $\Delta glp3\Delta glp2$ -Stämme zu erzeugen (Tabelle 26), wurde in den bereits vorhandenen SLI-*PFGLP1*- und SLI-*PFGLP2*-Plasmiden (Tabelle 25) das Gen kodierend für den Integrationsmarker NeoR durch das Gen kodierend für *yDHODH* ausgetauscht.

Zudem wurde, um die Wahrscheinlichkeit einer ungewünschten homologen Rekombination zu verringern, die Terminatorsequenz *hrp2 3'* gegen die Sequenz *PbDHFR-TS 3'* getauscht. Der geplante Austausch der Promotorsequenz Cam 5' gegen die Crt 5' Sequenz konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden.

**Tabelle 26** Zusammensetzung der Plasmide, welche für die Erstellung der *GLP*-Doppelknockout-Stämme genutzt wurden.

Stamm	Terminator	Selektionsmarker	Integrationsmarker
3D7 $\Delta glp2\Delta glp1$	<i>PbDHFR-TS 3'</i>	<i>bsd</i>	<i>yDHODH</i>
NF54 $\Delta glp3\Delta glp1$	<i>PbDHFR-TS 3'</i>	<i>hDHFR</i>	<i>yDHODH</i>
NF54 $\Delta glp3\Delta glp2$	<i>PbDHFR-TS 3'</i>	<i>hDHFR</i>	<i>yDHODH</i>

Nach erfolgreicher Transfektion und Selektion der neu klonierten SLI-Plasmide in den 3D7  $\Delta glp2$ - bzw. NF54  $\Delta glp3$ -Stamm wurde 10 – 14 Tage mit DSM1 zur Selektion der Integration inkubiert. Nur in der NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$ -Transfektion konnte nach anschließender Kultivierung ohne Selektionsdroge ein Parasitenwachstum beobachtet werden. Die Integration wurde mittels PCR überprüft.



**Abbildung 32** Integrationskontrolle des NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$ -Stammes nach Selektion für Transfektion und Integration. PCR der genomischen DNA des NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$ -Stammes mit alternativen Primern. Als Positivkontrolle dient genomische DNA des NF54  $\Delta glp3$ -Ausgangsstammes. Erwartete Größen: 1/3: 705 bp, 1/4: 774 bp, 1/5: 1442 bp, 2/3: 897 bp.

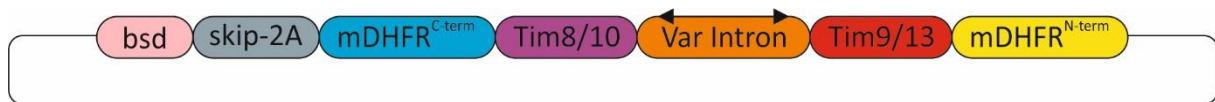
Die Genomüberprüfung durch PCR erzeugte kein eindeutiges Ergebnis (Abbildung 32). Die Kombination Primer 1/3, welche eine Bande von ca. 700 bp erzeugen sollte, war sowohl in der Kontrolle, der genomischen DNA von NF54  $\Delta glp3$  als auch in der DNA-Probe des Doppelknockouts NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$  zu erkennen. Durch homologe Rekombination kann dieses Signal sowohl durch das genomische *GLP1*-Gen, als auch durch die entstandene zweite *GLP1*-Kopie ohne ATG entstehen. Die Primerkombination 1/4 war mit einer Bande bei ca. 770 bp erfolgreich. Hier sollte nur eine Bande in Kombination mit der Doppelknockout-DNA beobachtet werden, da der antisense Primer 4 innerhalb des Gens kodierend für die  $\gamma$ DHODH bindet. Mit der Primerkombination 1/5 wurde analog die erwartete Bande nur mit der genomischen DNA des NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$ -Stammes erzeugt. Mit der Kontroll-DNA des NF54  $\Delta glp3$ -Stammes wurde mit diesen beiden Primerkombinationen keine Banden beobachtet. Mit der Primerkombination 2/3 sollte eine Bande mit der Kontroll-DNA des NF54  $\Delta glp3$ -Stammes beobachtet werden und nicht mit der genomischen DNA des NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$ -Stammes.

Hier bindet der sense Primer vor der Sequenz des *GLP1*-Gens und der antisense Primer am Ende des Gens, weshalb hier nur mit der Kontroll-DNA eine Bande bei ca. 900 bp erzeugt werden sollte. Diese Bande wurde in der durchgeführten Analyse für NF54  $\Delta glp3$  beobachtet. Zusätzlich war jedoch eine Bande mit der DNA des NF54  $\Delta glp3\Delta glp1$ -Stammes zu beobachten. Diese Ergebnisse geben den Hinweis auf einen teilweise erfolgreichen Knockout des Gens *GLP1* im bereits vorhandenen NF54  $\Delta glp3$ -Stamm.

### 5.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay (PCA) mit Split-Dihydrofolatreduktase (Split-DHFR)

#### 5.3.1. Vektorplanung

Während der Masterarbeit wurden Plasmide zur Protein-Protein-Interaktionsanalyse kloniert.<sup>276</sup> Hierfür wurden die Gene der Split-DHFR-Hälften (C-Term und N-Term) und der Testproteine Tim8, Tim9, Tim10 und Tim13 sowie eine I114A-Punktmutante der Split-DHFR-Hälften zur Analyse von starken Proteininteraktionen von GeneScript synthetisiert. Aufgrund des bidirektionalen Promotors und der Titrierbarkeit der Transkriptmenge durch Blasticidin wurden die synthetischen, codonoptimierten Gene in den von Epp *et al.* hergestellte pHBIRH-Vektor subkloniert (Abbildung 33)<sup>267</sup>



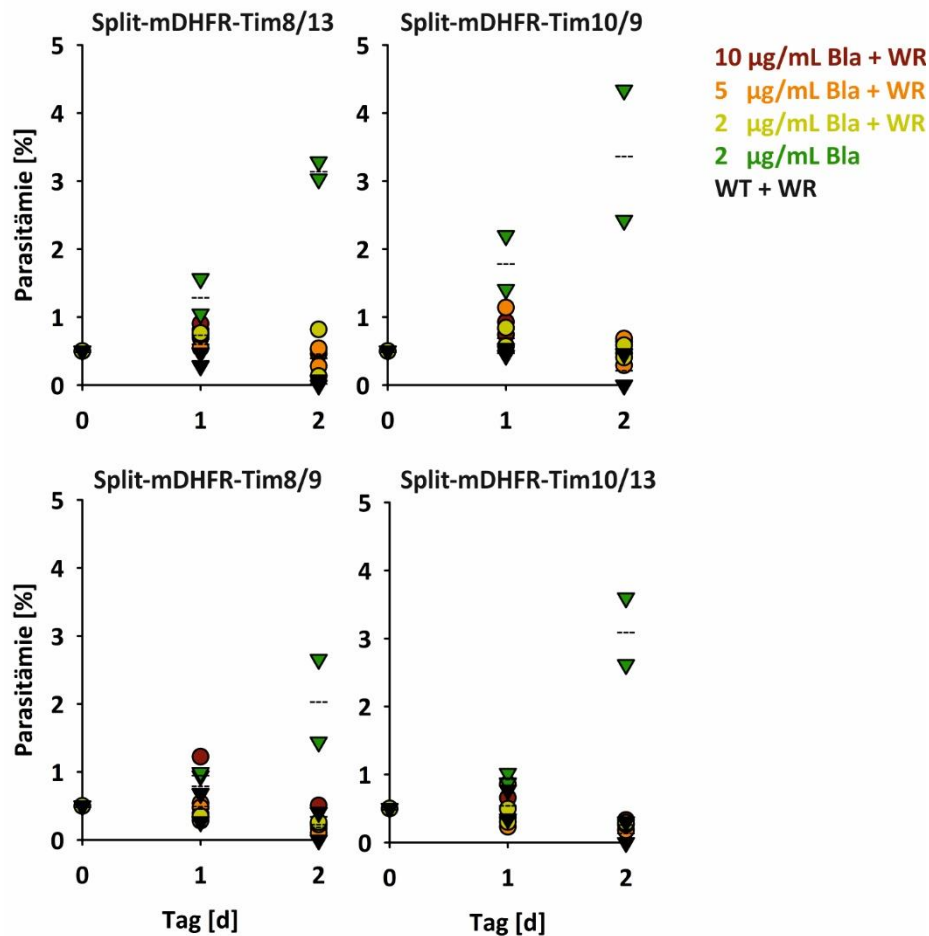
**Abbildung 33** Schematische Darstellung des Plasmids für die Split-mDHFR-Konstrukte mit den Genabschnitten kodierend für die *small Tims* (Tim8, Tim9, Tim10 und Tim13) als *gen of interest* (GOI).

In die MCS1 des Vektors wurde das Gen kodierend für Tim8 oder Tim10 und das mDHFR<sup>C-term</sup>-Fragment kloniert. In die MCS2 des pHBIRH-Vektors wurde das Gen für Tim9 oder Tim13 und das mDHFR<sup>N-term</sup>-Fragment kloniert. Zwischen dem Genabschnitt für die *small Tims* und dem Genabschnitt kodierend für die Split-DHFR-Fragmente wurde ein Polyglycin-Linker-Genabschnitt angefügt. Nach dem Genabschnitt des mDHFR<sup>C-term</sup>-Fragment befindet sich eine Sequenz für ein Skip-2A-Peptid, da anschließend die Blasticidin-Desaminase kodiert ist. Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung wurden die Plasmide in *Plasmodium falciparum* 3D7 WT Parasiten transfiziert.<sup>267</sup>

#### 5.3.2. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Split-mDHFR-System

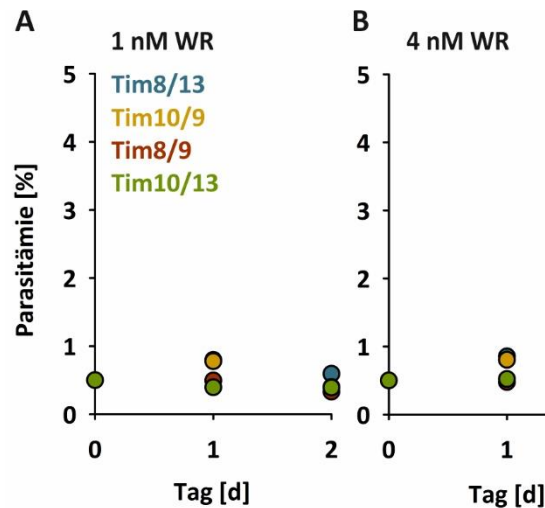
Während der Masterarbeit wurden bereits zwei WR-(WR99210)-Selektionsversuche mit den Split-mDHFR-Tim-Kulturen mit Tim8/13, Tim 10/9, Tim8/9 und Tim10/13 durchgeführt. Hierbei wurde kein eindeutiges Ergebnis erzielt, weshalb folgende Versuche in dieser Arbeit nochmals durchgeführt wurden.

Zur Etablierung der Methode wurden die Kombinationen Split-mDHFR-Tim8/9 und Tim10/13 als Negativkontrolle und die Kombinationen Tim8/13 und Tim10/9 als zu testende Proteininteraktionen genutzt.



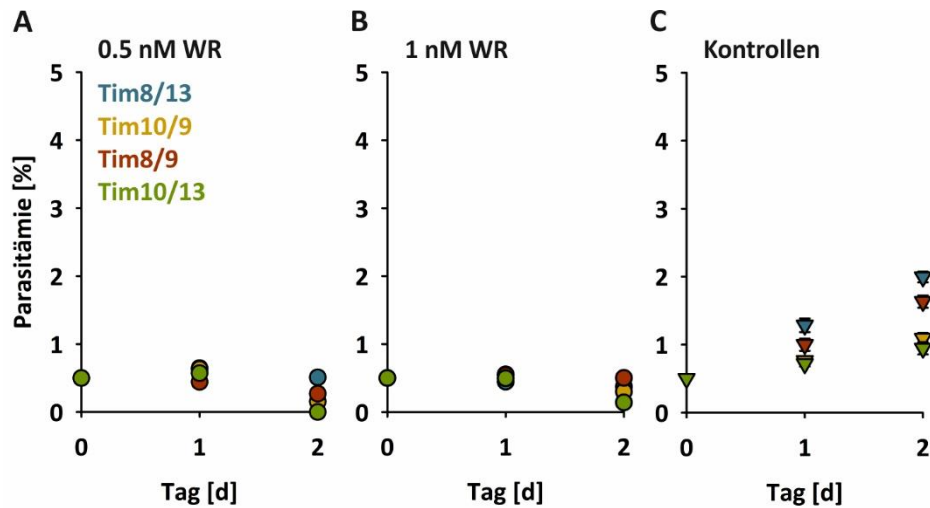
**Abbildung 34** WR-Selektion von Split-mDHFR-Tim8/13-, Tim10/9-, Tim8/9- und Tim10/13-Kulturen in 6-Well Platten mit variierender Blasticidinmenge (10 µg/mL (braun), 5 µg/mL (orange), 2 µg/mL (gelb), einer Kontrolle ohne WR (Dreieck) mit 2 µg/mL Blasticidin (grün) und einer Kontrolle von 3D7 WT mit WR (schwarz). Es wurde 4 nM WR genutzt und Wachstumskurven der Kulturen über zwei Tage aufgenommen. Die Kulturen wurden bei einer Startparasitämie von 0.5 % unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1$  %. Die Datenpunkte bilden eigenständige Versuche ab. Der Mittelwert der Replikate wird durch das gestrichelte Symbol dargestellt. (n = 2; n = biologische Replikate).

In allen verwendeten Split-mDHFR-*small Tim*-Kulturen (Tim8/13, Tim10/9, Tim8/9 und Tim10/13) wurde während einer Kultivierung mit 2 bis 10 µg/mL Blasticidin und 4 nM WR ein geringer Anstieg der Parasitämie an Tag 1 beobachtet (Abbildung 34). An Tag 2 der Wachstumskurven fiel die Parasitämie wieder unterhalb die Startparasitämie von 0.5 %. Als Kontrolle wurden Wachstumskurven der *small Tim*-Kulturen ohne WR-Selektion analysiert, bei denen ein Anstieg der Parasitämie von 0.5 % auf 2 – 3.5 % innerhalb von zwei Tagen beobachtet wurde. Außerdem wurde eine 3D7 WT-Kultur mit WR inkubiert, wobei kein Wachstum beobachtet werden konnte.



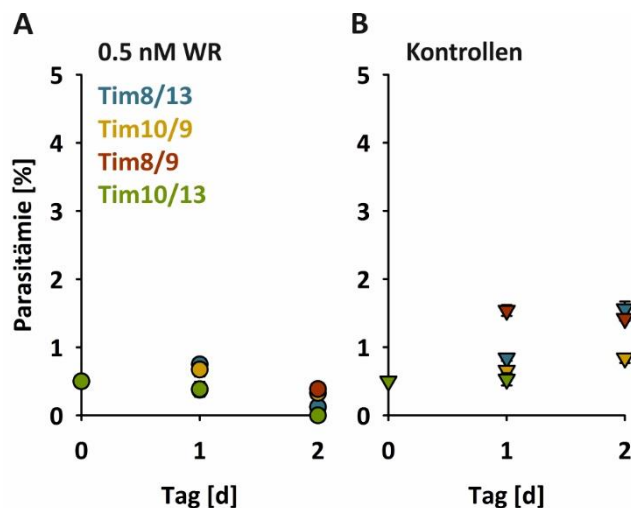
**Abbildung 35** WR-Selektion von Split-mDHFR-Tim8/13- (blau), Tim10/9- (gelb), Tim8/9- (rot) und Tim10/13- (grün)-Kulturen in 14 mL Kulturen mit 10 µg/mL Blasticidin. Es wurde 1 nM WR (A) bzw. 4 nM WR (B) genutzt und Wachstumskurven der Kulturen über zwei Tage aufgenommen. Die Kulturen wurden bei einer Startparasitämie von 0,5 % unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0,1$  %. (n = 1; n = biologische Replikate)

Des Weiteren wurden Wachstumskurven bei erhöhten Blasticidinmengen und variierenden WR-Konzentrationen aufgenommen. Bei Inkubation mit 10 µg/mL Blasticidin und einer verringerten WR-Konzentration von 1 nM wurde nur ein geringer Anstieg der Parasitämie auf knapp 1 % an Tag 1 in den Split-mDHFR-Tim8/13 und -Tim10/9 beobachtet (Abbildung 35 A). An Tag 2 lag die ermittelte Parasitämie wieder unterhalb des Startpunktes von 0,5 %. Dasselbe Verhalten wurde bei Inkubation mit 10 µg/mL Blasticidin und 4 nM WR beobachtet (Abbildung 35 B).



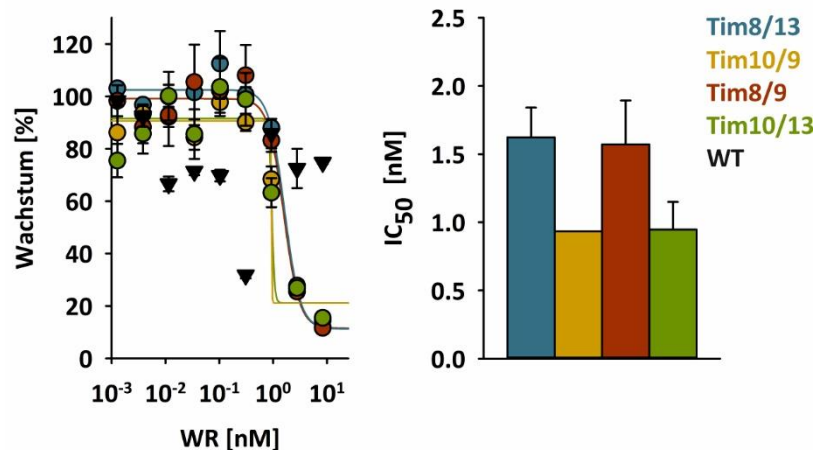
**Abbildung 36** WR-Selektion von Split-mDHFR-Tim8/13-(blau), Tim10/9-(gelb), Tim8/9-(rot) und Tim10/13-(grün)-Kulturen in 14 mL Kulturen mit 25 µg/mL Blasticidin. Es wurde 0.5 nM WR (A) bzw. 1 nM WR (B) genutzt. Als Kontrolle wurden Wachstumskurven der Stämme mit 25 µg/mL Blasticidin ohne Zugabe von WR aufgenommen (C). Es wurden Wachstumskurven der Kulturen über zwei Tage aufgenommen. Die Kulturen wurden bei einer Startparasitämie von 0.5 % unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von ≤ 0.1 %. (n = 1; n = biologische Replikate)

Bei auf 25 µg/mL erhöhter Blasticidinmenge und geringerer WR-Konzentration von 0.5 nM bzw. 1 nM wurde das bei 10 µg/mL Blasticidin beobachtete geringe Wachstum an Tag 1 der Stämme mit vorhergesagter Interaktion nicht mehr beobachtet (Abbildung 36 A/B). An Tag 2 reduzierte sich die Parasitämie wiederum unterhalb des Startwertes. Als Kontrolle wurden hier zusätzlich Wachstumskurven der *small Tim*-Kulturen ohne Zugabe von WR aufgenommen (Abbildung 36 C). Hier konnte ein Anstieg der Parasitämie auf 1 – 2 % innerhalb von zwei Tagen beobachtet werden.



**Abbildung 37** WR-Selektion von Split-mDHFR-Tim8/13-(blau), Tim10/9-(gelb), Tim8/9-(rot) und Tim10/13-(grün)-Kulturen in 14 mL Kulturen mit 50 µg/mL Blasticidin. Es wurde 0.5 nM WR (A) genutzt. Als Kontrolle wurden Wachstumskurven der Stämme mit 25 µg/mL Blasticidin ohne Zugabe von WR aufgenommen (B; für Split-mDHFR-Tim10/13 ist kein Datenpunkt an Tag 2 vorhanden). Es wurden Wachstumskurven der Kulturen über zwei Tage aufgenommen. Die Kulturen wurden bei einer Startparasitämie von 0.5 % unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von ≤ 0.1 %. (n = 1; n = biologische Replikate)

Bei 50 µg/mL Blasticidin wurde ebenfalls das Wachstum der *small Tim*-Kulturen mit 0.5 nM WR innerhalb von zwei Tagen untersucht (Abbildung 37 A). Hier wurde ein geringer Anstieg der Parasitämie der Kulturen Split-mDHFR-Tim8/13 und Tim10/9 beobachtet. An Tag 2 reduzierte sich die Parasitämie unterhalb von 0.5 %. Ohne Zugabe von WR konnte ein Anstieg der Parasitämie in allen Stämmen auf 1 – 2 % innerhalb von zwei Tagen beobachtet werden (Abbildung 37 B).

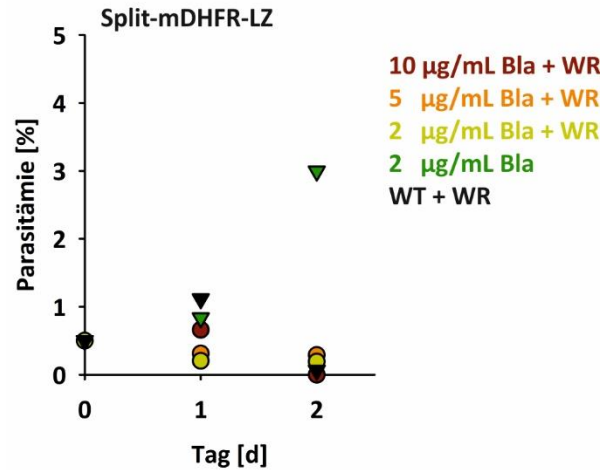


**Abbildung 38** Washout-Experiment mit Split-mDHFR-Tim8/13 (blau), Tim10/9 (gelb), Tim8/9 (rot) und Tim10/13 (grün) Kulturen mit 50 µg/mL Blasticidin und einer Kontrolle von 3D7 WT mit WR (schwarz). Die Kulturen wurden mit einer Konzentrationsreihe von WR für 1 h inkubiert und anschließend mit RPMI-Medium gewaschen und 72 h unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = 1; n = biologische Replikate)

Aufgrund der in den Wachstumskurven beobachteten sehr geringen Effekten wurden die *small Tim*-Stämme auf ihre Sensitivität gegenüber WR mittels Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte untersucht (Abbildung 38). Es wurde kein Unterschied im IC<sub>50</sub>-Wert zwischen dem Split-mDHFR-Tim8/13- und Tim10/9-Stamm und den Negativkontrollen Tim8/9 und Tim10/13 festgestellt. Der IC<sub>50</sub>-Wert des Split-mDHFR-Tim8/13- und Tim8/9-Stammes betrug 1.6 nM, für den Split-mDHFR-Tim10/9- und Tim10/13-Stamm 0.9 nM. Es wurde kein eindeutiger Trend in der Sensitivität gegenüber WR beobachtet.

Zur Überprüfung der Projektidee, beide Teilgene des Split-mDHFR-Systems auf einem Plasmid zu kodieren, wurde die bekannte Interaktion der GCN4 Leucinzipper von *Saccharomyces cerevisiae* untersucht.

Es wurde das Wachstum des Split-mDHFR-LZ-Stammes mit 10 µg/mL, 5 µg/mL und 2 µg/mL Blasticidin und 0.5 nM WR untersucht (Abbildung 39).



**Abbildung 39** WR-Selektion von Split-mDHFR-LZ-Kulturen in 6-Well-Platten mit variierender Blasticidinmenge (10 µg/mL (braun), 5 µg/mL (orange), 2 µg/mL (gelb), einer Kontrolle ohne WR (Dreieck) mit 2 µg/mL Blasticidin (grün) und einer Kontrolle 3D7 WT mit WR (schwarz). Es wurde 0.5 nM WR genutzt und Wachstumskurven der Kulturen über zwei Tage aufgenommen. Die Kulturen wurden bei einer Startparasitämie von 0.5 % unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von > 2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1$  %. (n = 1; n = biologische Replikate)

Es wurde für den Split-mDHFR-LZ-Stamm bei allen getesteten Blasticidinmengen während der Selektion mit 0.5 nM WR kein Wachstum beobachtet. Nur bei 10 µg/mL Blasticidin wurde an Tag 1 ein minimaler Anstieg der Parasitämie festgestellt. An Tag 2 wurde jedoch in allen Stämmen eine Parasitämie unterhalb der Startparasitämie von 0.5 % ermittelt. Ebenfalls in der 3D7 WT-Kontrolle mit WR wurde kein Wachstum festgestellt. Bei dem Split-mDHFR-LZ-Stamm mit 2 µg/mL Blasticidin ohne WR-Zugabe konnte an Tag 2 eine Parasitämie von über 3 % festgestellt werden.

Die negativen Ergebnisse der potentiellen Positivkontrolle zeigen, dass das Split-DHFR-System als Ein-Plasmid-System nicht erfolgreich etabliert wurde.

## 6. Diskussion

### 6.1. STRESSistance: Oxidative-Stress-Hypothese in *Plasmodium falciparum* und Wirkmechanismus von verschiedenen Antimalariamitteln

#### 6.1.1. Produktion und Charakterisierung von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit kompartiment-spezifischer Erhöhung und Erniedrigung der Wasserstoffperoxidmenge

Zur Überprüfung und kritischen Einordnung der Oxidativen-Stress-Hypothese in *Plasmodium falciparum* wurden 3D7-Stämme mit heterologen Redoxenzymen hergestellt, um den kompartiment-spezifischen Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bedingungen auf den Parasiten zu untersuchen. Die Produktion der heterologen Redoxenzyme Katalase und D-Aminosäureoxidase wurden mittels Westernblotanalyse überprüft. Hierbei wurde die erfolgreiche Produktion heterologer Katalase im Cytosol, der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranraum des Mitochondriums nachgewiesen (Abbildung 12 A/B). Die Analyse der Stämme mit Lokalisation der Redoxenzyme in der Verdauungsvakuole war nur teilweise erfolgreich (Abbildung 12 B/C). Für den Stamm der heterologen Katalase mit Targetingsequenz von Plasmepsin IV zur Lokalisation in der Verdauungsvakuole wurden Westernblotsignale bei der erwarteten Größe von 60 kDa für das prozessierte Protein beobachtet. Hier wurde ebenfalls für die Negativkontrolle, den Stamm mit identischer Targetingsequenz, jedoch mit inaktiver Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup>, ein Signal in der Westernblotanalyse beobachtet. Diese Signale wurde jedoch nicht auf derselben Westernblotmembran erhalten und eine Reproduktion war nur teilweise erfolgreich. Dies lag nicht nur an wiederholtem Auftauen und Einfrieren der Proben, da ebenfalls mit neu erstellten Westernblotproben nur einer der beiden Stämme ein Signal erzeugte. Dasselbe war mit den Stämmen der heterologen DAAO in der Verdauungsvakuole zu beobachten (Abbildung 13). Hier wurde nur ein Proteinsignal bei 52 kDa für das unprozessierte und bei 44 kDa für das prozessierte Protein in der Probe des Stammes mit DAAO<sup>R285A</sup> erhalten, jedoch kein Signal in der Probe des Stammes mit DAAO. Ebenso wurde auf diesem Westernblot keine erfolgreiche Positivkontrolle beobachtet, wodurch das Ergebnis nicht aussagekräftig ist. Da dieses Problem ausschließlich in den Stämmen mit Targetingsequenz für die Verdauungsvakuole auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass es auf die Lokalisation zurückzuführen ist. Die Verdauungsvakuole hat einen pH-Wert von ~5.2<sup>263</sup>, wodurch eventuell der genutzte HA-Tag entfernt oder das Enzym abgebaut wurde. Für die Westernblots wurden Kulturen im Trophozoiten und Schizontenstadium genutzt, welche über eine MACS Magnetic Column aufkonzentriert und aufgereinigt wurden. Hierbei gingen alle Parasiten ohne Verdauungsvakuole bzw. Hämozoin verloren.

Des Weiteren wurde bisher nur die korrekte Lokalisation der DAAO im Cytosol und in der mitochondrialen Matrix von Eileen Bischoff bestätigt.<sup>268</sup> Die Lokalisationsstudien mittels

Immunfluoreszenzmikroskopie in dieser Arbeit wiesen kein eindeutiges Ergebnis auf, weshalb in den weiteren Versuchen von der korrekten Lokalisation ausgegangen wurde, diese jedoch noch bestimmt werden muss (Abbildung 15).

#### 6.1.2. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit kompartiment-spezifischer Erhöhung und Erniedrigung der Wasserstoffperoxidmenge auf ihr Wachstumsverhalten

Sowohl bei verringerten als auch erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen im Cytosol wurde ein negativer Wachstumseffekt beobachtet (Abbildung 16). Hier könnten durch gesteigerte/verringerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen Signaltransduktionswege gestört werden.  $\text{H}_2\text{O}_2$  hat in der Zelle neben den postulierten negativen auch essentielle Eigenschaften für die Signalweiterleitung und dient z.B. in Säugern als Signalmolekül für die Regulation des Redoxmetabolismus durch z.B. Keap1 und Nrf2.<sup>38</sup> Durch Veränderung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge im Cytosol könnten äquivalente Signaltransduktionswege in *Plasmodium falciparum* gestört werden und das Wachstum der Parasiten beeinflussen. Hier wäre es interessant auf Transkript- und Proteinebene potentielle Anpassungen und Abweichungen zu beobachten. Interessant ist ebenfalls, dass es bei verringerten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen durch die dauerhafte Anwesenheit und Aktivität heterologer Katalase zu einer Adaption auf die verringerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge kommen könnte. Die Katalase wird nicht, wie zum Beispiel die DAAO, durch Zugabe einer Substanz aktiviert, sodass der Parasit sich auf die verringerten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen einstellen kann. Dadurch lassen sich eventuell der Unterschied der 4 und 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin Wachstumskurven bei erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen im Cytosol erklären. Der Stamm mit aktiver DAAO hat ein verringertes Wachstum mit einer 1.48- bzw. 1.67-fachen Verdopplungszeit (Tabelle 11). Dieser Unterschied lässt sich mit der Titrierbarkeit des pHBIRH-Plasmids erklären.<sup>267</sup> Durch die gesteigerte Blasticidinmenge für die Selektion liegt mehr Plasmid vor, was in einem Anstieg der Proteinmenge resultiert. Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit erfolgreich überprüft (Abbildung 14). Durch den plötzlichen, direkten Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge durch Zugabe von 5 mM D-Alanin könnte es hier nicht zu einer Präadaption des Stammes kommen, was einen stärkeren Effekt als bei dem Katalase-Stamm mit cytosolischer Lokalisation erklären könnte.

Bei durch Katalase verringerten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen in der mitochondrialen Matrix wurde kaum ein Effekt auf das Wachstumsverhalten beobachtet (Abbildung 18 A/B). Die Stämme mit aktiver Katalase hatten ein leicht gesteigertes Wachstum mit einer 0.84- bzw. 0.89-fachen Verdopplungszeit (Tabelle 13). Durch die dauerhafte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Erniedrigung in der mitochondrialen Matrix kann es, wie hier beobachtet, auch zu positiven Effekten kommen. Dies lässt sich ggf. dadurch erklären, dass in der mitochondrialen Matrix die Elektronentransportkette der Atmungskette eine potentielle Quelle von  $\text{O}_2^{\cdot -}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist.<sup>278</sup> Dieses  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann durch die Katalase abgebaut werden. Der Abbau kann das Redoxsystem des Parasiten entlasten, könnte jedoch bei einem zu hohen Maß des Abbaus ggf. auch das Redoxpotential im

Mitochondrium aus der Balance bringen. Bei erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen in der mitochondrialen Matrix kam es zu einem starken Wachstumsdefekt und einer Erhöhung der Verdopplungszeit um das 1.36- bzw. 1.76-fache (Abbildung 18 C/D, Tabelle 13). Dieser Effekt lässt sich eventuell durch die plötzliche Erzeugung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch das DAAO-System erklären. Die Induktion der Produktion durch Zugabe von D-Aminosäure verhindert eine Adaption der Parasiten auf die gesteigerten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen. Erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen können bei nicht ausreichendem Abbau durch Peroxiredoxine mit  $\text{Fe}^{2+}$  über die Fenton Reaktion zu  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{OH}^\cdot$  reagieren.  $\text{OH}^\cdot$  weisen eine hohe Reaktivität auf und können unter anderem durch Lipid- und DNA-Oxidation Zellen schädigen.<sup>61</sup> Durch die fehlende Möglichkeit der Adaption kann das Peroxiredoxinsystem den Überschuss an  $\text{H}_2\text{O}_2$  ggf. nicht detoxifizieren. Außerdem war zu erkennen, dass bei höherer Blasticidinmenge (und demnach auch höherer DAAO-Menge) ein größerer Defekt des Wachstumsverhalten vorliegt (Abbildung 18 C/D). Dieses Verhalten unterstützt die Annahme, dass der Wachstumseffekt durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion der DAAO verursacht wird. Ein toxischer Effekt der Proteinproduktion oder durch die Blasticidin-Inkubation ist auszuschließen, da die Negativkontrolle unter diesen Bedingungen keinen Wachstumsdefekt aufweist und das prozentuale Wachstum hier auf den Stamm der Negativkontrolle, die inaktive Punktmutante  $\text{DAAO}^{\text{R285A}}$ , bezogen wird.

Bei erniedrigten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen durch Katalase im Intermembranraum des Mitochondriums kommt es sowohl bei geringer als auch bei erhöhter Blasticidinmenge zu keinem Wachstumsdefekt der Parasitenkultur (Abbildung 19 A/B). Bei durch DAAO erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen im IMS ist nur bei hoher Blasticidinmenge (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ein verringertes Wachstum des DAAO-Stammes zu beobachten (1.19-fache Verdopplungszeit; Abbildung 19 D, Tabelle 14) Es wurde in der Negativkontrolle, dem Stamm mit inaktiver Mutante  $\text{DAAO}^{\text{R285A}}$ , ein geringer Einfluss der Proteintoxizität oder Blasticidintoxizität beobachtet. Hierbei hatte der Stamm bei 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin eine Verdopplungszeit von 0.75 d und bei hoher Blasticidinmenge von 0.83 d (Tabelle 14). Hier kann das zur Selektion genutzte Blasticidin oder zelluläre Prozesse der Proteinproduktion, der -Transports oder des -Abbaus zu einer Abnahme des Wachstums führen.<sup>267</sup> Es ist in Hefe bekannt, dass die *PfSOD1* teilweise im Mitochondrium lokalisiert ist.<sup>279-281</sup> Während der oxidativen Faltung von Disulfid-Proteinen im IMS durch Hefe Erv1 kann es bei einer direkten Cytochrom *c*-abhängigen Reoxidation von Hefe Erv1 durch molekularen Sauerstoff zur Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommen.<sup>279</sup> Ein Zusammenhang der IMS  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration und der Aktivierung von verschiedenen Kinasen, wie die *tyrosin-protein kinases* SYK und Lyn und die *mitogen activated protein (MAP) kinase*, als kritische Faktoren für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Signaltransduktion wurde in der Literatur für Opisthokonten beschrieben.<sup>282</sup>

Ein interessantes Phänomen wurde im Wachstumsverhalten der Stämme mit heterologen Redoxenzym in der Verdauungsvakuole beobachtet. Bei verringerten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen in der Verdauungsvakuole wurde kein Wachstumsdefekt ermittelt (Abbildung 17 A/B). Sowohl bei 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Blasticidin als auch bei 15 µg/mL wurde kein Unterschied beobachtet (Tabelle 12). Bei erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen wurde jedoch ein Anstieg des Wachstums bei beiden genutzten Blasticidinmengen detektiert (Abbildung 17 C/D). Hierbei handelt es sich um eine Verringerung der Verdopplungszeit um das 0.78- bzw. 0.76-fache (Tabelle 12). Ebenso ist es interessant, dass das generelle Wachstum der Stämme mit Katalase<sup>H64N</sup>- und DAAO<sup>R285A</sup> in der Verdauungsvakuole im Vergleich zu den anderen Lokalisationen sehr gering war. Hier betrug die Verdopplungszeit ~1.0 d. Dies kann auf eine Belastung des sekretorischen Pathways hinweisen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss ebenfalls beachtet werden, dass es Probleme bei der Überprüfung der Proteinproduktion in den Verdauungsvakuole-Stämmen gab und die korrekte Lokalisation bisher nicht bestätigt werden konnte.

Im Vergleich zu einem 3D7 WT-Wachstum wurde bei allen Stämmen mit heterologem Redoxenzym eine generelle Abnahme des Wachstums beobachtet (Verdopplungszeit 3D7 WT 0.63 d Tabelle 23). Dies weist auf einen Einfluss der Proteintoxizität hin. Die generelle Produktion eines weiteren Proteins innerhalb des Parasiten sollte keinen großen Einfluss auf das Parasitenwachstum haben. Jedoch kann falsche Faltung und Transport zu Proteinstress führen. Die *unfolded protein response* (UPR) wird z.B. aktiviert, um falsch gefaltete Proteine abzubauen. Der UPR-Pathway beruht auf drei unterschiedlichen Adaptionsmechanismen, welche ein komplexes Netzwerk aufspannen. In Hefe wird durch die Aktivierung der PERK der *translation initiation factor 2 subunit-α* (eIF2α) phosphoryliert, was zu einer Reduktion der generellen mRNA-Translation führt. Selektiv wird die Transkription von UPR-Genen für z.B. die Aminosäurebiosynthese, die antioxidative Zellantwort, Autophagie und Apoptose aktiviert. Zusätzlich akkumulieren nicht-gefaltete oder fehlgefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum und werden durch die *proteasome-based ER-associated protein degradation* (ERAD) Maschinerie abgebaut.<sup>283</sup> Diese Reaktionen könnten Effekte erklären, die unabhängig von der Art des genutzten Redoxenzym, seiner Funktion und der Funktionalität sind.

### 6.1.3. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit kompartiment-spezifischer Erhöhung und Erniedrigung der Wasserstoffperoxidmenge auf ihre Sensitivität gegenüber Antimalariamitteln

Die genutzte Substanz Paraquat formt O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, welches durch SODs zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disproportioniert wird. Generell wurde bei den Katalase- und DAAO-Messungen mit Paraquat ein Unterschied vom IC<sub>50</sub>-Wert des WT 3D7-Stammes von 53 µM<sup>284</sup> beobachtet (Abbildung 20 – 27 A). Der leicht erhöhte IC<sub>50</sub>-Wert der Stämme deutet auf eine Präadaption hin, welche durch z.B. Proteinstress ausgelöst werden kann. Nicht nur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress kann die Stressantwort auslösen, ebenso Proteinproduktions- und -Faltungsstress könnten diesen Weg aktivieren. *Plasmodium falciparum* besitzt fünf Peroxiredoxine: TPx-1 (Prx1a), TPx-2 (Prx1m), Prx5/AOP, Prx6 und nPrx. TPx-1 und TPx-2 können neben der Funktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detoxifizierung auch als Chaperone fungieren und bei der Proteinfaltung unterstützen.<sup>61,285</sup> Für das Antimalariamittel Artesunat wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert zwischen 3.0 – 9.5 nM

ermittelt (Abbildung 20 – 27 B). Für Chloroquin und Methylenblau 7.4 – 14.3 nM, bzw. 5.6 – 16.0 nM (Abbildung 20 – 27 C/E; Tabelle 15 – 22). Diese Werte sind mit den Literaturwerten von Artesunat (9.0 nM)<sup>286</sup>, Chloroquin (8.0 nM) und Methylenblau (3.8 nM) vergleichbar.<sup>284</sup>

Stämme mit durch heterologe Katalase verringerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Cytosol und der mitochondrialen Matrix weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Paraquat bei 15 µg/mL im Vergleich zu 4 µg/mL Blasticidin auf (Abbildung 20/24 A). Die IC<sub>50</sub>-Werte bei 4 µg/mL Blasticidin sind höher als die bei 15 µg/mL Blasticidin. Eine stärkere Erniedrigung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu erhöhter Sensitivität. Hier scheint ein negativer Effekt auf die Sensitivität vorzuliegen, wenn weniger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im jeweiligen Kompartiment vorhanden ist. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann in Bakterien, Eukaryoten und Säugetieren über verschiedene bekannte regulatorische Mechanismen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Hierbei kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neben der Hochregulierung der Transkription auch die Stabilität mit dem abbauenden Ubiquitin-Ligase-Komplex herabsetzen oder auch die DNA-Bindungs-eigenschaften verändern.<sup>46</sup> Die Störung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts kann zur Veränderung von Signaltransduktionswegen und hiermit zur veränderten Expression von Redoxenzym-Genen führen.<sup>38</sup> Diese Veränderung im Proteingehalt von z.B. Peroxiredoxinen könnte bei Paraquat-induziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur gesteigerten Sensitivität führen. Zudem ist zu beachten, dass das Katalase-System nicht durch die Zugabe von z.B. D-Aminosäuren induziert wird, sondern die Katalase dauerhaft aktiv ist. Dadurch kann es zu langfristigen Anpassungen im Parasiten kommen. Um dies zu verifizieren könnten Transkriptions- und Proteomsanalysen durchgeführt werden. Hierbei wäre ein Vergleich von Stämmen mit verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Cytosol oder der mitochondrialen Matrix (15 µg/mL Blasticidin) und deren inaktiven Punktmutanten interessant, um eine tendenzielle Adaption zu analysieren, da diese Katalase-Stämme zudem ein verändertes Wachstum aufwiesen (Abbildung 16 B) und einen signifikanten Sensitivitätsunterschied gegenüber Paraquat zeigten (Abbildung 20 A). Nach Analyse ohne zusätzliche Substanz könnte das Transkriptom und Proteom nach Inkubation mit der 10-fachen IC<sub>50</sub>-Konzentration Paraquat für kurze Zeit (z.B. 1-2 h) als zusätzlicher Faktor analysiert werden.

Zudem wurde ein Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten gegenüber Paraquat des DAAO-Stammes verglichen mit denen des DAAO<sup>R285A</sup>-Stammes, unabhängig der Zugabe der D-Aminosäure, in allen getesteten Kompartimenten beobachtet (Abbildung 21/23/25/27 A). Dies deutet auf einen weiteren Präadaptionsmechanismus hin. Hier könnte ein hypothetischer endogener D-Aminosäuremetabolismus die Erklärung sein. Potentiell könnte der Apikoplast von *Plasmodium falciparum*, welcher laut Endosymbiontentheorie durch Aufnahme einer Rotalge als primärer Endosymbiont entstand,<sup>287-289</sup> Quelle endogener D-Aminosäuren sein. Die Funktion der D-Aminosäuren ist in Pflanzen unbekannt, jedoch ist der Metabolismus existent.<sup>290</sup> Als bekannte Funktion des Apikoplast wurde bisher hauptsächlich die Synthese von Isoprenoid-Vorstufen angenommen.<sup>291</sup> Hier

wären ebenso Transkriptom- und Proteomanalysen für cytosolische und mitochondriale Matrix DAAO und die Negativkontrollen mit und ohne D-Alanin sowie nach Inkubation mit Paraquat interessant. Die Ergebnisse der cytosolisch erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen könnte bei Vergleich mit cytosolisch verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen Erkenntnisse über Anpassungen des Parasiten bringen. Erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in der mitochondrialen Matrix (15 µg/mL Blasticidin) wären interessant, da hier in der IC<sub>50</sub>-Analyse mit Paraquat eine eindeutige Veränderung des Kurvenverlaufs stattfand (Abbildung 25 A).

Des Weiteren ist in allen Kompartimenten bei durch Katalase verringerten Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein Effekt auf die Sensitivität gegenüber Atovaquon zu sehen (Abbildung 20/22/24/26 D). Hier ist innerhalb einer Blasticidinmenge kein Unterschied zu den Negativkontrollen zu erkennen, jedoch zwischen den Blasticidinmengen ein großer Unterschied der IC<sub>50</sub>-Werte zu beobachten (Tabelle 15/17/19/21). Hier waren die Parasiten der Katalase-Stämme bei 4 µg/mL Blasticidin weniger sensitiv als bei 15 µg/mL Blasticidin. Die höhere beobachtete Sensitivität des Katalase-Stammes bei 15 µg/mL Blasticidin (Tabelle 15/17/19/21) stimmt mit der Literatur, von  $1.15 \pm 0.02 \text{ nM}^{292}$  für den 3D7 WT-Stamm, überein. Bei 4 µg/mL Blasticidin ist eine verringerte Sensitivität zu beobachten (Tabelle 15/17/19/21). Bei durch DAAO erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Cytosol und in der mitochondrialen Matrix wurden generell bei 15 µg/mL Blasticidin höhere IC<sub>50</sub>-Werte als bei 4 µg/mL bestimmt (Abbildung 21/25 D). Daher kann ein reiner proteintoxischer Effekt ausgeschlossen werden. Zusätzlich scheint es kein kompartment-spezifischer Effekt zu sein, da er bei fast allen Lokalisationen der heterologen Enzyme auftritt. Ebenso kann ein Effekt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgeschlossen werden, da kein Unterschied zu der Negativkontrolle beobachtet werden kann. Atovaquon inhibiert den Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex der mitochondrialen Atmungskette, was die ATP- und Pyrimidinsynthese beeinflusst.<sup>97,102</sup> Der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex bindet eine Häm-Gruppe,<sup>118</sup> welche ebenso in der Katalase vorhanden ist<sup>135</sup>. Bei hohen Blasticidinmengen könnte die Menge an bereitstehendem Häm für den Atmungskettenkomplex durch das Vorhandensein der Katalase verringert sein. Durch diese nicht vollständige Sättigung des Enzymkomplexes könnte es zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber dem Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex-inhibierenden Antimalariamittel Atovaquon kommen. Dies könnte jedoch nicht die Effekte des DAAO-Stammes erklären, da diese nicht auf Häm zurückzuführen sind. Dieser lässt sich eher durch die generelle Proteinabundanz der DAAO und einen kompensierten proteintoxischen Effekt erklären.

#### 6.1.3.1. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit cytosolisch erhöhter und erniedrigter Wasserstoffperoxidmenge auf ihre Sensitivität gegenüber Antimalariamitteln

Mit verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen im Cytosol kann ein weiterer Effekt für das Antimalariamittel Artesunat beobachtet werden (Abbildung 20 B, Tabelle 15). Hier findet eine gesteigerte Sensitivität des Katalase-Stammes statt. Die unterschiedliche Sensitivität zwischen den Messungen bei 4 und 15 µg/mL

Blasticidin könnte durch gestörte Signaltransduktionswege und veränderte Proteinmengen an Peroxiredoxinen etc. erklärt werden.

Mit den getesteten Antimalariamitteln wurden mit cytosolischer Lokalisation der DAAO keine Unterschiede mit und ohne D-Alanin-Inkubationen beobachtet (Abbildung 21 B – E). Dies weist darauf hin, dass das Cytosol nicht der Wirkort für diese Antimalariamittel ist, bzw. dass gesteigerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen die Funktionsweise dieser Substanzen nicht beeinflussen oder der Parasit sich auf die Bedingungen eingestellt hat.

#### 6.1.3.2. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit erhöhter und erniedrigter Wasserstoffperoxidmenge in der Verdauungsvakuole auf ihre Sensitivität gegenüber Antimalariamitteln

Es wurde nur eine signifikante Änderung der Sensitivität gegenüber Chloroquin bei stark verringerten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen in der Verdauungsvakuole beobachtet (Abbildung 22 C, Tabelle 17). Es scheint, als sei  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Verdauungsvakuole irrelevant für die anderen hier getesteten Substanzen. Chloroquin hemmt die Häm-Detoxifizierung in der Verdauungsvakuole, wodurch es zur Akkumulation von reaktivem Häm kommt. Dieses kann z.B.  $\text{O}_2^{\cdot -}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder durch die Fenton-Reaktion  $\text{OH}^{\cdot}$  bilden, was die Zelle durch unspezifische Modifikationen von Proteinen, Membranen, der DNA und Lipiden schädigen kann. Bei verringerten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen in der Verdauungsvakuole könnte es zu einer Veränderung des pH-Wertes kommen.<sup>293</sup> Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Änderung des pH-Wertes ins alkalische hervorruft. Ein gesteigerter pH-Wert ist ungünstiger für den radikalischen Zerfall von  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>294</sup> Aufgrund dieser Tatsache könnte eine Entfernung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  das Ansäuern der Verdauungsvakuole zur Folge haben, wodurch die Menge an entstehendem  $\text{OH}^{\cdot}$  ansteigen könnte. Dieses Molekül ist hochreaktiv und kann, wie zuvor beschrieben, zur Schädigung der Zelle führen.<sup>295</sup> Bei der Interpretation der Daten, welche mit den Stämmen der DAAO in der Verdauungsvakuole erzeugt wurden, muss weiterhin beachtet werden, dass bisher kein eindeutiger Nachweis der Produktion und Lokalisation des heterologen Enzyms erfolgen konnte.

#### 6.1.3.3. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit erhöhter und erniedrigter Wasserstoffperoxidmenge in der mitochondrialen Matrix auf ihre Sensitivität gegenüber Antimalariamitteln

Bei geringer Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge in der mitochondrialen Matrix wurde keine Änderung der Sensitivität gegenüber Paraquat, unabhängig von der Inkubation mit D-Alanin, beobachtet (Abbildung 25 A, Tabelle 20). Bei 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin könnte der beobachtete signifikante Effekt durch eine Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge auf ein toxisches Level erklärt werden. Hier wurden die Parasiten mit aktiver DAAO und unter D-Alanin-Inkubation sensitiver gegenüber Paraquat. Eventuell ist hier die

Kapazität, welche durch kurzfristige Anpassungen auf Transkriptom- und Proteomebene möglich ist, aufgebraucht und der Parasit wird durch gesteigerte  $H_2O_2$ -Mengen geschädigt.

Bei gesteigerten  $H_2O_2$ -Mengen in der mitochondrialen Matrix wurde zusätzlich eine veränderte Sensitivität gegenüber Methylenblau bei hoher Blasticidinmenge beobachtet (Abbildung 25 E, Tabelle 20). Es ist bekannt, dass Methylenblau den Glutathion-Metabolismus *in vitro* durch die Inhibition der Glutathionreduktase beeinflusst und Glutathion direkt ohne vorherige Produktion von  $H_2O_2$  oxidiert.<sup>270,271</sup> Zudem hat Methylenblau eine Rolle als Redoxzyklussubstrat bei der Wechselwirkung mit der Hämgruppe von Hämozoin.<sup>272</sup> Der Glutathionpool in der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranraum des Mitochondriums ist ebenso wie das Cytosol stark reduzierend. Der Glutathionpool des IMS ist im Equilibrium mit dem cytosolischen Glutathionpool, da durch Poren der freie Transport von reduziertem und oxidiertem Glutathion durch die OM gewährleistet ist. Der Glutathiontransport in die Matrix ist jedoch durch die IM limitiert und erzeugt somit einen kinetisch isolierten Glutathionpool.<sup>296</sup> Durch diese Abschirmung des Glutathionpools kann es sein, dass Methylenblau durch Oxidation von Glutathion einen im  $IC_{50}$ -Wert beobachtbaren Effekt bei gesteigerten  $H_2O_2$ -Mengen in der mitochondrialen Matrix erzeugt. Im Cytosol ist hingegen die GR vorhanden, welche GSSG schnell reduzieren kann und es nicht zur Akkumulation kommt. Aufgrund der Lokalisation der *Plasmodium falciparum* GR im Cytosol und dem Apikoplast<sup>61</sup>, könnte der Effekt in der mitochondrialen Matrix ausschließlich durch die Oxidation von Glutathion entstehen.

#### 6.1.3.4. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit erhöhter und erniedrigter Wasserstoffperoxidmenge im Intermembranraum des Mitochondriums auf ihre Sensitivität gegenüber Antimalariamitteln

Bei verringerten  $H_2O_2$ -Mengen im Intermembranraum des Mitochondriums wurde eine erhöhte Sensitivität gegenüber Paraquat bei 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin beobachtet (Abbildung 26 A). Das IMS ist das kleinste der hier getesteten Kompartimente, weshalb es bei 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin zu Proteotoxizität und –Adaptionen kommen könnte. Aufgrund der Vorschädigung der Parasiten durch im IMS verringerte  $H_2O_2$ -Mengen könnten diese eine gesteigerte Sensitivität gegenüber der  $O_2^{\cdot-}$ -produzierenden Substanz Paraquat zeigen. Außerdem könnte Paraquat durch Aufnahme von Elektronen aus dem Komplex III der Atmungskette<sup>118</sup> im IMS vermehrt aktiviert werden.

Bei Lokalisation der heterologen Redoxenzyme Katalase und DAAO im Intermembranraum des Mitochondriums wurden keine Effekte in der Sensitivität gegenüber Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau beobachtet, weshalb das IMS eher als Wirkort ausgeschlossen werden kann (Abbildung 26/27).

Die bei dieser Analyse beobachteten Effekte der IC<sub>50</sub>-Werte beziehen sich auf minimale Änderungen und auch statistisch signifikante Ergebnisse sollten vorsichtig interpretiert werden. Bei der Auswertung der angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte wurde auf das Wachstum des Stammes ohne Zugabe der Testsubstanz, dem Antimalariamittel normiert. Durch diese Vorgehensweise sollten Einflüsse auf den IC<sub>50</sub>-Wert durch veränderte Wachstumsverhalten verringert werden, Schwankungen können jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden. Es muss beachtet werden, dass alle DAAO-Stämme mit unterschiedlichen Lokalisationen bei 15 µg/mL Blasticidin unter D-Alanin-Inkubation ein eindeutig verändertes Wachstumsverhalten aufwiesen. Dieser Effekt könnte nicht nur durch die genutzte Blasticidinmenge erklärt werden, sondern könnte aus einem Effekt der gesteigerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge resultieren.

#### 6.1.4. Analyse von *Plasmodium falciparum* Stämmen mit verringerter Glutathionmengen oder erhöhter Wasserstoffperoxidmenge im Erythrozyten

Es wurde die Produktion und der Export des mit dem STEVOR-Exportsignal versehenen Chac1-Enzyms bestätigt, jedoch kam es nicht zum vollständigen Export des Proteins, da weiterhin eine starke Bande in der Pelletfraktion der Westernblotanalyse zu erkennen war (Abbildung 28). Für den Stamm mit dem STEVOR-DAAO-Konstrukt konnte keine genaue Aussage über die Produktion und den Export der DAAO getroffen werden. Es scheint, als gäbe es eine erfolgreiche Produktion des 53 kDa großen unprozessierten Proteins und eine Bande bei dieser Größe wurde auch in der Pelletfraktion beobachtet, jedoch kann mit dem in dieser Arbeit abgebildeten Westernblot, aufgrund der nicht erfolgreichen Positivkontrolle, kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden (Abbildung 29).

Das in dieser Arbeit genutzte Chac1-System ist ein nicht induzierbares, dauerhaft aktives System, welches kontinuierlich die Menge an Glutathion im Erythrozyten verringert. Bei niedriger Blasticidinmenge von 4 µg/mL wurde ein Anstieg der im Erythrozyten befindlichen Gesamtglutathionmenge beobachtet (Tabelle 24). Dies deutet auf einen Adaptionsmechanismus des Parasiten hin. In Barrand *et al.* wurde der Glutathionefflux des Parasiten ohne Einfluss von Substanzen und unter Inkubation mit Hypoxanthin, Xanthinoxidase oder einem Superoxiddismutase-System getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass unter diesen Bedingungen (oxidative Challenge) eine Verringerung des Glutathionexportes stattfand.<sup>261</sup> Durch den durch Chac1-vermittelten Abbau von Glutathion im Erythrozyten könnte es demnach zu einem erhöhten Export von Glutathion in den Erythrozyten kommen, um das Redoxmilieu aufrecht zu erhalten. Bei hohen Blasticidinmengen könnte der durch Chac1-vermittelte Abbau von Glutathion stärker als die Exportkapazität des Parasiten sein. Dies lässt die Annahme zu, dass durch weitere Erhöhung der genutzten Blasticidinmenge eine Erniedrigung des Gesamtglutathiongehaltes unterhalb der Menge der Negativkontrolle erzeugt werden könnte.

Die in roGFP2-Messungen ermittelte verstärkte Oxidation des Erythrozytencytosols im frühen Trophozitenstadium zeigt, dass das Chac1-Enzym aktiv ist und zu einer Verschiebung des Redoxstatus führt. Durch Abbau von Glutathion im Erythrozyten könnte die Menge an verfügbarem, reduzierten Glutathion eingeschränkt sein.

Die zu dieser Methode gezeigten Daten wurden nur einfach bestimmt und die Übertragung des in Barrand *et al.* genutzten recycling-Assays stellte sich als kompliziert heraus. Die hier gezeigten Werte wurden nicht reproduziert, weshalb die Interpretation mit Vorsicht betrachtet werden sollte. Zusätzlich muss zur vollständigen Charakterisierung des genutzten STEVOR-Chac1-Stammes über Immunfluoreszenzmikroskopie die Lokalisation bestätigt werden. Der hier mittels Westernblot gezeigte Export des Proteins reicht nicht als zuverlässige Bestätigung aus. Außerdem muss durch den nicht vollständigen Export des Proteins ebenfalls von einem Abbau des Glutathions innerhalb des Parasiten ausgegangen werden.

## 6.2. Funktionale Charakterisierung von *PfΔglp1*, *PfΔglp2* und *PfΔglp1* Doppelknockout-Stämmen

*Selection linked integration*-Plasmide zum Erzeugen eines Doppelknockouts von *PFGLP1*, *PFGLP2* und *PFGLP3* in allen möglichen Kombinationen wurden erfolgreich kloniert. Hierfür wurden von bereits im Single-Knockout genutzten DNA-Sequenzen die Terminatorsequenzen sowie die Resistenzmarkergene ausgetauscht, um ungewollte homologe Rekombinationen zu vermeiden. Diese wurden erfolgreich in die Single-Knockouts transfiziert und der *Δglp3Δglp1*-Stamm teilweise erfolgreich selektioniert. Die in der PCR beobachtete Bande für die erfolgreiche Integration zeigt, dass das SLI-Plasmid in das Gen *PFGLP1* integriert war (Abbildung 32). Es wurde jedoch kein reiner Knockout-Stamm erzeugt. Die PCR zeigte ebenfalls Signale für das Wildtyp *PFGLP1*. Hierbei handelte es sich dementsprechend um eine Mischkultur. Eine wiederholte Selektion mit WR könnte einen reinen Knockout erzeugen. Unter Selektionsdruck würden nur die Parasiten mit vollständig korrekter Integration überleben. Es scheint jedoch, dass *PFGLP3* und *PFGLP1* nicht essentiell für das Überleben des Parasiten sind und *PfGlp2* oder andere Proteine deren Funktion komplementieren können. Die Möglichkeit der Komplementierung wurde ebenfalls in den in der Masterarbeit erzeugten Daten mit *Δglp1* und *Δglp2* beobachtet.<sup>276</sup> Hier wurde kein Einfluss des Knockouts auf das Wachstum und die Sensitivität gegenüber veränderten Eisenbedingungen beobachtet. Ebenso wurde keine veränderte Sensitivität im IC<sub>50</sub>-Wert für Antimalariamittel, welche abhängig von Eisen-, bzw. Eisen-Schwefel-Cluster-Proteinen (Fosmidomycin, Atovaquon, Chloroquin) sind, festgestellt.<sup>276</sup> Um genaue Aussagen über den *Δglp3Δglp1*-Stamm treffen zu können müssen für einen reinen Knockout-Stamm identische Versuche durchgeführt werden. Laut GFP-Fusionskonstrukten hat *PfGlp1* und *PfGlp2* cytosolische und *PfGlp3* mitochondriale Lokalisation.<sup>205</sup> Wenn diese Lokalisation korrekt ist, scheint die Funktion des mitochondrialen *PfGlp3* durch ein anderes Enzym komplementiert werden zu können. Ebenfalls wird *PFGLP3* oft als Insertionsgen für verschiedene Versuche, wie Orp1-roGFP-Insertion,<sup>277</sup> genutzt, ohne einen offensichtlichen Einfluss auf den Parasiten zu haben. Andererseits hat nur *PfGlp1* eine vorhergesagte mitochondriale Targetingsequenz. Über die Essentialität von *PFGLP1/PFGLP2* und auch *PFGLP2/PFGLP3* kann nach dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden. Es wurden wiederholt nicht erfolgreiche Integrationsversuche durchgeführt. Dies kann auf eine Essentialität hinweisen, ist jedoch kein ausreichender Beweis hierfür. Um dies zu untersuchen könnten Knockdown- oder Komplementationsversuche weitere Hinweise auf die Funktion der Glps geben. Eine Funktion der Glps im Fe/S-Cluster-Transport, wie das mitochondriale Grx5 in Hefe,<sup>194</sup> kann nicht bestätigt werden. Aufgrund des CGFS-Motivs von *PfGlp1* hat es Ähnlichkeiten mit Grx3, Grx4<sup>181,197,199</sup> und Grx5 aus Hefe und rekombinantes *PfGlp1* hat keine Aktivität im HEDS-Assay.<sup>173,204</sup> Aufgrund dieser Eigenschaften könnte *PfGlp1* eine Rolle im intrazellulären Eisentransport und -sensing haben. *PfGlp2* und *PfGlp3* haben ein CKFS- bzw. CKYS-Motiv<sup>173</sup> und gehören deshalb ebenfalls zu den Klasse II Monothiol-Glutaredoxinen.



### 6.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay mit Split-Dihydrofolatreduktase

Zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion der *small Tims* aus *Plasmodium falciparum* wurden bereits in der Masterarbeit erfolgreich Split-mDHFR-*small Tim*-Konstrukte kloniert und in 3D7 WT-Parasiten transfiziert. Diese Stämme wurden auf ihr Wachstumsverhalten unter WR-Selektionsdruck untersucht.<sup>276</sup> Hierbei wurde keine Interaktion zwischen Tim8/13 und Tim9/10 beobachtet. Stämme mit der Kombination Tim8/9 und Tim10/13 dienten als Negativkontrolle. Auch nach Absenken der für die Selektion genutzten WR-Menge wurde nur eine minimale Wachstumsveränderung an Tag 1 beobachtet (Abbildung 34 – 37). Dies weist darauf hin, dass die Parasiten nicht fähig waren, einen vollständigen Wachstumszyklus zu durchlaufen. Das Transkriptionsprofil des genutzten Var intron-Promotors (PFC0005w) zeigt für das in Epp *et al.* genutzte Luciferasegen im Vergleich zu PFB1055c und *Psti/Pcam* eine hohe Expression mit maximaler Expression 38 – 42 h nach Invasion.<sup>267</sup> Eine mögliche Erklärung wäre eine Notwendigkeit der Interaktion der *small Tim*-Proteine in frühen Stadien des Parasitenzyklus, weshalb bei hoher Expression der Gene im Trophozoiten- und Schizontenstadium keine bzw. geringere Interaktion stattfindet. Vergleiche der Transkriptionsprofile der *small Tims* zeigen eine maximale Expression der Transkripte 25 h nach Invasion. Die Expression ist nur im Ring-Stadium gering.<sup>297</sup> Dies schließt die vorherig genannte Erklärung aus. Der minimale Anstieg der Parasitämie wurde ebenfalls in der 3D7 WT-Kontrolle unter WR-Selektion beobachtet, weshalb der Effekt eher auf eine verzögerte Wirkung von WR rückschließen lässt.

Um geringe Änderungen der Sensitivität auszuschließen, wurden IC<sub>50</sub>-Washout-Experimente durchgeführt (Abbildung 38). Hierbei konnte jedoch das vorhergesagte Interaktionsmuster, Tim8/13 und Tim10/9, nicht bestätigt werden. Die Stämme mit der Kombination Tim8/13 und Tim8/9 waren geringfügig weniger sensitiv als die Stämme Tim10/9 und Tim10/13. Dieser Effekt ist vernachlässigbar.

Ebenfalls könnte eine ungleiche Expression der Gene durch den bidirektionalen Var Intron-Promotor des pHBIRH-Plasmides ein Auslöser der nicht erfolgreichen Etablierung sein. Es wurde in Epp *et al.* und auch in dieser Arbeit gezeigt, dass das pHBIRH-Plasmid mit der Selektionsdroge Blastocidin titrierbar ist,<sup>267</sup> jedoch nicht, dass beide Richtungen des Promotors gleichmäßig abgelesen werden. Das Gen kodierend für Split-mDHFR<sup>C-term</sup> fusioniert mit Tim9 oder Tim13 wurde in eine *Multiple Cloning Site* vor das Blastocidin-Desaminase-Gen kloniert. Das Split-mDHFR<sup>N-term</sup>-Tim8- bzw. Tim10-Gen wurde, in die für pHBIRH übliche *Cloning Site* des ursprünglichen Luciferasegens kloniert.

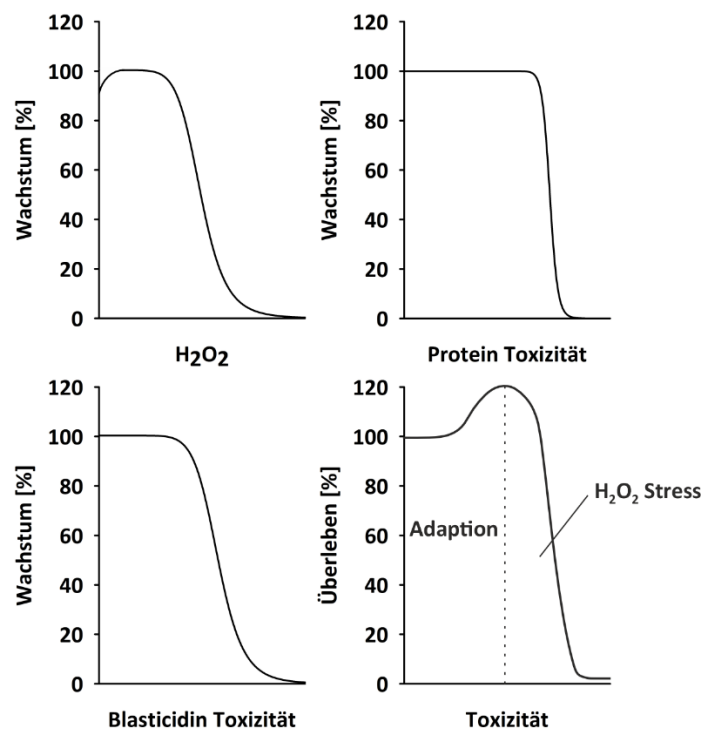
Ein zusätzlicher Faktor könnte die Proteinfaltung der *small Tims* sein. Durch eine zu sperrige Tertiärstruktur könnte durch Fusion mit den Split-mDHFR-Fragmenten die Faltung der *small Tims*, sowie die Faltung der DHFR behindert werden und deren Funktion könnte nicht ausgeführt werden. Dies kann jedoch durch das Nutzen der Leucinzipper als Kontrolle ausgeschlossen werden. GCN4 Leucinzipper aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde bereits bei der Etablierung des Split-DHFR-Systems

durch Levray *et al.* erfolgreich genutzt.<sup>224</sup> In dem in dieser Arbeit genutzten Ein-Plasmid-System wurde ebenfalls mit dem LZ als POI kein Parasitenwachstum nach Tag 2 beobachtet. Ein aufgrund der Fusion missgeleiteter Import der Testproteine ist hierdurch ebenfalls auszuschließen.

## 7. Fazit und Ausblick

### 7.1. STRESSistance

In dieser Arbeit wurde die Oxidative-Stress-Hypothese des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* kritisch hinterfragt und experimentell untersucht. Hierfür wurden erfolgreich Parasitenstämme hergestellt, welche kompartiment-spezifisch  $H_2O_2$  erzeugen oder entfernen. Diese Stämme wurden auf das Wachstumsverhalten und die Sensitivität gegenüber vermeintlich über sogenannte „ROS“ wirkende Antimalariamittel untersucht. Verringerte  $H_2O_2$ -Mengen zeigten nur geringen oder keinen Einfluss auf das Wachstum. Erhöhte  $H_2O_2$ -Mengen resultierten in verschiedenen Kompartimenten in einem verringerten Wachstum. Außerdem wurden  $IC_{50}$ -Analysen der Stämme mit der Positivkontrolle Paraquat angefertigt. Die hierbei gemessenen Sensitivitätsunterschiede zwischen den Stämmen mit aktiver Katalase oder DAAO und den Negativkontrollen könnten durch Adaptionen der Parasiten auf die veränderten  $H_2O_2$ -Mengen in den verschiedenen Kompartimenten erklärt werden. Um diese Adaptionen zu benennen müssen noch Proteom- und Transkriptomanalysen der in dieser Arbeit erstellten *Plasmodium falciparum* Stämme angefertigt werden. Hierfür würden sich aufgrund der  $IC_{50}$ -Ergebnisse die Stämme mit erhöhten und verringerten  $H_2O_2$ -Mengen im Cytosol und der mitochondrialen Matrix anbieten. Diese Stämme könnten ebenfalls nach Inkubation mit Paraquat auf mögliche Adaptionen untersucht werden.



**Abbildung 40** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Faktoren, die das Wachstum der Parasiten beeinflusst. Oben: links:  $H_2O_2$ ; rechts: Protein Toxizität; Unten: links: Blasticidin-Toxizität; rechts: Zusammenschluss der verschiedenen Faktoren und ihr Einfluss auf was Wachstum der Parasiten.

Zudem ist hervorzuheben, dass die hier gemessenen Effekte nicht ausschließlich durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu erklären sind (Abbildung 40). Die Proteintoxizität sowie auch Effekte des zur Selektion genutzten Blasticidins müssen beachtet werden. Der Zusammenschluss dieser multikausalen Effekte erzeugt das hier zu beobachtende Verhalten. Es kann zu einem gesteigerten Überleben der Parasiten durch unterschiedliche Adaptionsmechanismen kommen. Anschließend könnte der zu hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress zu einem verringerten Überleben des Parasiten führen. Jedoch haben ebenfalls Protein- und Blasticidin-Toxizität einen Einfluss auf dieses Verhalten.

Bei der Analyse der Antimalariamittel Artesunat, Chloroquin, Atovaquon und Methylenblau wurden kaum Sensitivitätsunterschiede zwischen den Stämmen mit veränderten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen und den verwendeten Negativkontrollen beobachtet. Die erhaltenen Unterschiede in den  $\text{IC}_{50}$ -Werten sind nur minimal und es scheint, als würde  $\text{H}_2\text{O}_2$  keine Rolle für die Wirkweise dieser Antimalariamittel spielen. Zudem können die in dieser Arbeit zwar erstellten, aber nicht analysierten, Stämme mit roGFP2-getaggten heterologen Redoxenzymen Katalase und DAAO auf den Redoxstatus in den verschiedenen Kompartimenten analysiert werden. Hiermit können Änderungen des kompartiment-spezifischen Redoxstatus durch Produktion oder Entfernung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  untersucht werden. Ein weiterer Ansatz wäre zum Beispiel ein Plasmid kodierend für den Redoxsensor HyPer7 kompartiment-spezifisch zu transfizieren, um die redox-spezifische Änderungen der Fluoreszenz zu messen.

Um genaue Aussagen über die in dieser Arbeit angefertigten Ergebnisse zu treffen, muss die Lokalisation der Katalase mit unterschiedlichen Targetingsequenzen und der DAAO-Stämme mit Targetingsequenz der Verdauungsvakuole und dem Intermembranraum des Mitochondriums durch Immunofluoreszenzmikroskopie noch bestätigt werden.

Um den Einfluss des Glutathionabbaus im Erythrozyten zu analysieren wurde ein STEVOR-Chac1-Stamm erstellt und der Glutathionmenge im Erythrozyten mittels Glutathion-Recycling-Assay gemessen. Dies führte zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen, weshalb diese Untersuchung besser durch eine HPLC-Methode abgedeckt wäre. Die Funktionalität der Chac1 konnte von Frau Jessica Kehrer (Lanzer Lab) mittels roGFP2-Messungen erfolgreich bestätigt werden und es führt zu einer gesteigerten Oxidation des Erythrozytencytosols in frühen Trophozoiten. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Glutathion für den Redoxmetabolismus des Parasiten und erzeugt weitere Möglichkeiten, die Adaption auf Veränderung des Redoxmilieu zu untersuchen. Zudem wurde ein STEVOR-DAAO-Stamm erstellt, welcher noch auf Produktion und Export des heterologen Enzyms charakterisiert werden muss. Anschließend können die Einflüsse von erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen im Erythrozyten mit Hilfe dieses Stammes analysiert werden. Mit diesem System könnte durch

Transfektion von Redoxsensoren, wie zum Beispiel roGFP2, der Redoxstatus im Parasiten durch veränderte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mengen im Erythrozyten mikroskopisch analysiert werden.



### 7.2. Funktionale Charakterisierung von *PfΔglp1*, *PfΔglp2* und *PfΔglp1* Doppelknockout-Stämmen

In dieser Arbeit wurden die *Glutaredoxin-like proteins* von *Plasmodium falciparum* auf ihre Essentialität im Doppelknockout getestet. Hierfür wurden SLI-Plasmide kloniert, um in bereits bestehenden  $\Delta glp2$ - oder  $\Delta glp3$ -Stämmen *PFGLP1* bzw. *PFGLP2* zu inaktivieren. Die Plasmide wurden vollständig korrekt sequenziert und erfolgreich transfiziert. Bei der Selektion der Integration konnte nur ein  $\Delta glp3\Delta glp1$ -Stamm erhalten werden. Dieser scheint jedoch eine Mischkultur zu sein, weshalb hier weitere Selektionsversuche durchgeführt werden müssen. Jedoch kann vermutet werden, dass *PfGlp2* die Funktion von *PfGlp1* und *PfGlp3* kompensieren kann. Die nicht erfolgreiche Erzeugung eines  $\Delta glp2\Delta glp1$ - und  $\Delta glp3\Delta glp2$ -Stammes lässt vermuten, dass hier die Funktion nicht komplementierbar ist. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssen jedoch weitere Analysen, wie zum Beispiel eine Komplementation des Doppelknockout-Gens folgen.

### 7.3. Protein-Fragment-Komplementationsassay mit Split-Dihydrofolatreduktase

In dieser Arbeit wurde versucht, das Split-mDHFR-Assay als Ein-Plasmid-System in *Plasmodium falciparum* zu etablieren. Hierzu sollte die Protein-Protein-Interaktion der *small Tim*-Proteine Tim8/13 und Tim9/10 untersucht werden. Bei WR-Selektionsversuchen wurde nur ein kurzfristiges Wachstum an Tag 1 beobachtet. Anschließend kam es zum Absterben der Parasiten. Auch bei Washout-Experimenten wurde kein Unterschied in der Sensitivität, verglichen mit den Kontrollen, ermittelt. Um die generelle Funktionsweise des Ein-Plasmid-Systems zu analysieren wurden als POI der Leucinzipper GCN4 von Hefe als bekannte Protein-Protein-Interaktion genutzt. Hierbei wurde ebenfalls keine erfolgreiche WR-Selektion durchgeführt. Das Split-mDHFR-System als Ein-Plasmid-System wurde nicht erfolgreich etabliert.



## 8. Anhang

### 8.1. STRESSistance DNA-Sequenzen der synthetisierten Sequenzen

#### 8.1.1. Sequenzen der genutzten Targetingsequenzen

Beispielhaftes Konstrukt: MitoM + 3xHA + *Tg*Katalase

**Schnittstellen** MitoM-Targetingsequenz **3xHA-Tag** *Tg*Katalase

ACTAGT**ATG**GATAAGTACATTAAGAGGTAAAATATTTAATAATGGTAGTAATAGAAATAAATGTGTTTCAATTTTAAGTAATAT  
 ACAAAAAAGAAATATTAGTAAAGATATTAGATTTGGATCAGATGCAAGAACAGCTATGTTAACAGGTTGTAATAAATTAGCTG  
 ATGCTGTATCTGTAACTTTAGGTCCAAAAGGTAGAAATGTAATA**GGATCC**TATCCTTATGATGTTCCAGATTATGCAGGTTAT  
 CCTTATGATGTACCAGATTATGCTGGTTATCCTTATGATGTTCTGATTATGCA**GCGGCCGC**AACACAAGTACCTCCTGTAAC  
 ATTTCAACAATATGGTCCAGTAATAACAACAAGTGTGGTAATCCTGTAGATGATAATCAAAATAGTGTAAACAGCAGGTCCTT  
 ATGGACCAGCTATTTAAGTAATTTTCATTTAATAGATAAATTAGCACATTTTGATAGAGAAAAGAATACCAGAAAAGAGTTGTA  
 CATGCAAAAGGTGGAGGAGCATTGGTTATTTTGAAGTTACACATGATATAACAAGATTTTGTAAAGCTAAATTGTTTAAAA  
 AATAGGAAAAAGAACCAGTATTTGCAAGATTTTCAACAGTTGCTGGTGAAAGTGGATCAGCAGATACAAGAAGAGATCCAA  
 GAGGTTTTGCATTAATAATTTTATACAGAAGAAGTAATTTGGGATATGGTAGGAAATAATACACCAATATTTTCGTTAGAGAT  
 GCTATAAAATTTCCAGATTTTATACATACACAAAAAGACATCCACAAAACATTTACATGATCCAAATATGGTATGGGATTT  
 CTTTAGTTTAGTCCAGAATCAGTTCATCAAGTAACATTTTATATACAGATAGAGGTACACCAGATGGATTTAGACACATGA  
 ATGGTTATGGAAGTCATACATTTAAATTTATTAATAAAGATAATGAAGCATTTTATGTAAAATGGCATTTTAAAACAAATCAA  
 GGAATTAATAATTTAATAGACAAAGAGCAAAAGAATTAGAAAGTGAAGATCCAGATTATGCTGTAAGAGATTTATTTAATGC  
 AATTGCTAAAAGAGAATTTCCATCATGGACATTTTGTATACAAGTTATGCCATTAAGATGCTGAAACATATAAATGGAATG  
 TTTTGTAGTAACAAAAGTTTGGCCACATGGTGATTATCCATTAATCCAGTAGGAAGATTAGTTTTAGATAGAAATCCAGAA  
 AATTATTTTCAAGATGTAGAACAAGCAGCTTTTGCACCAGCTCACATGGTTCAGGTATTGAACCAAGTGAAGATAGAATGTT  
 ACAAGGAAGAATGTTTTCATATATAGATACACATAGACATAGATTAGGTGCAAATTATCATCAAATACCAGTTAATAGACCTT  
 GGAATGCTAGAGGTGGAGATTATTCAGTAAGAGATGGTCCAATGTGTGTTGATGGTAATAAAGGAAGTCAATTAATTTATGAA  
 CCAAATTCAGTAGATGGATTTCCAAAAGAAGATAGAAATGCAGCTGTTAGTGGTACAACAACAGTATCAGGAACAGTTGCATG  
 TCATCCACAAGAACATCCAAATAGTGATTTTGAACAACCTGGTAATTTTATAGAACAGTATTATCAGAACCAGAAAGAGAAG  
 CATTAATTGAAATATAGCAGAACATTTAAGACAAGCTAGAAGAGATATACAAGAAAGACAAGTTAAAATATTCTATAAATGT  
 GATCCAGAATATGGTGAAAGAGTAGCAAGAGCAATAGGTTTACCAACAGCAGCATGTTATCCAGCAAAAATG**TAAAGAGCTC**

Targetingsequenzen:

Für cytosolische Lokalisation:

ACTAGT**ATGGGATCC**

Aminosäuresequenz:

M

Verdauungsvakuole (Plasmeypsin IV):

ACTAGT**ATG**GCATTAACAGTAAAAGAAGAAGAAATTTAGTAATACATTAATAAAAAATGCTAGTGCATTTGATAGATTAATAAT  
 AGGAAATTTAAAAATTTAAAAATACAAAAGAAATTACAATTTTTATATTTAATATTTATTTGTTTTAATTACAGGTGTTTTTT  
 TTTTTTTTTTAAATAGGAAATTTTTATTCACATAGAAAATTATATCAAGTT**GGATCC**

## Aminosäuresequenz:

MALTVKEEEFSNTLIKNASAFDRLKLGNLKLNKLIQKKLQFLYLILFVLIITGVFFFFLIGNFYSHRKLYQV

Mitochondriale Matrix (Hsp60):

ACTAGTATGATAAGTACATTAAGAGGTAAAATATTTAATAATGGTAGTAATAGAAATAAATGTGTTTCAATTTAAGTAATAT  
ACAAAAAGAAATATTAGTAAAGATATTAGATTTGGATCAGATGCAAGAACAGCTATGTTAACAGGTTGTAATAAATTAGCTG  
ATGCTGTATCTGTAACCTTTAGGTCCAAAAGGTAGAAATGTAATA GGATCC

## Aminosäuresequenz:

MISTLRGKIFNNGSNRNKCVSILSNIQKRNIKDIRFGSDARTAMLTGCNKLADAVSVTLGPKGRNVI

Intermembranraum des Mitochondriums (DHODH):

ACTAGTATGATTAGTAAATTAACCTCAATTTATGTTTTTACCTAAAAACATATATATCTTATTGTAGAAAAGATGTATT  
AAATTTATTTGAACAAAAATTTTATTATACAAGTAAAAGAAAAGAATCAAATAATATGAAAAATGAAAGTTTATTAAGATTAA  
TTAATTATAATAGATATTATAATAAAATTTGATTCAAATAATTATTATAATGGAGGTAAAATATTGAGTAATGATAGACAATAT  
ATTTATTCACCATTATGTGAATATAAAAAGAAAATAAATGATATAAGTAGTTATGTTAGTGTACCATTTAAAAATAAATATTAG  
AAATTTAGGAACATCAAATTTTGTAAATAATAAAAAGATGTATTAGATAATGATTATATATATGAAAAATAAAGAAAGAAA  
AAAGTAAACATAAGAAAATAATATTTTGTATTTTGTTTCATTATTTGGTTTATATGGTTTTTTTGAATCTTATAATGGTTCT  
GGTAGTGGTAGTGGTTCT GGATCC

## Aminosäuresequenz:

MISKLKPFQFMFLPKKHILSYCRKDVNLFEQKFYYTSKRKESNNMKNESLLRLINYNRYNKKIDSNNYNGGKILSNDRQYIY  
SPLCEYKKKINDISSYVSPFKINIRNLGTSNFMVNNKDVLDNDYIYENIKKEKSKHKKIIFLLFVSLFGLYGFESYNGSGS  
GSGS

Intermembranraum des Mitochondriums<sup>new</sup> (NADH Cytochrom *b*<sub>5</sub>-Reduktase):

ACTAGTATGAAAAGAAGTTTTAGATCAATGTTAAGAAGTATATTTATGAGAATATTATATTTCTTAACATCAAATATTAGTTC  
AATAATTATATTTTGTGTTAGTATATCATTTTTAGGATATTTTGGTAAAAGAATTACATAATAATAAAGGAAGTGGTTCAG  
GAAGTGGTTCAGGATCC

## Aminosäuresequenz:

MKRSFRSMLRSIFMRILYFLTSNISSIIIFCVSISFLGYFGKELHNNKGS GSGSGS

Erythrozyten (STEVOR):

ACTAGTATGAAAATGTATTATTTAAAAATGTTATTATTTAATTTCTTAATAAATGTTTGTAGTATTACCACATTATGAAAATTA  
TCAAAATAATCATTATAATATAAGATTAATTCAAAATAACATATAGAATAACAATAAAAGTAGATTATTAGCACAAACAC  
AAATTCATAATCCACATTATCATAATGATCCAGAATAAAAGAAATAATTGATAAATTAATGAAGATGCTATAAAGAAA GGA  
TCC

## Aminosäuresequenz:

MKMYYLKMLLFNFLINVLVLPHYENYQNNHYNIRLIPNNTYRITIKSRLLAQTQIHNPYHNDPELKEIIDKLNEDA I KK

Tag:3xHA-Tag:

GGATCC TATCCTTATGATGTTCCAGATTATGCAGGTTATCCTTATGATGTACCAGATTATGCTGGTTATCCTTATGATGTTCC  
TGATTATGCAGCGGCCGC

## Aminosäuresequenz:

YPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDY

roGFP2:

GGATCC GCAAGCGAATTCTCAAAGGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCTATTTTAGTCGAATTGGACGGTGACGTTAA  
TGGTCATAAGTTT TAGTGTAGTGGTGAAGGTGAAGGTGACGCAACATACGGTAAATTGACCTTGAAGTTTATTTCAACTACTG  
GTAAATTGCCAGTTCCTTGGCCAAC TTTGGTAACCACTTTAACATATGGTGTACAATGTTTCAGTAGATACCCTGATCATATG  
AAACAACACGACTTTTTCAAGTCTGCTATGCCAGAAGGTACGTTCAAGAAAGAACTATTTTCTTTAAGGATGACGGTAACTA  
CAAGACCAGAGCAGAAGTCAAATTTGAAGGTGACACTTTGGTTAACAGAATCGAATTGAAGGGTATCGATTTCAAGGAAGACG  
GTAACATCTTGGGTCATAAATTGGAATACAAC TACAAC TGTACAATGTATACATAATGGCCGATAAGCAAAGAATGGTATC  
AAAGTCAACTTCAAGATCAGACATAACATCGAAGATGGTCTGTTCAATTAGCTGACCACTATCAACAAAATACACCTATTGG  
TGACGGTCTGTTTTGTTACCAGACAACCACTTACTTGTCTACCTGCTCAGCTTTATCCAAAGATCCAAATGAAAAGAGAGACC  
ATATGGTATTGTTAGAATTTGTCACCGCAGCAGGTATCACATTGGGTATGGATGAATTGTATAAAACTAGCGGTGGTTCAGGT  
GGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGAGGAGGATCAGGAGGAGGAGGATCAGGAGGAGGAGGATCAGGAGGAGAATT  
CGCGGCCGC

## Aminosäuresequenz:

ASEFSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFI STTGKLPVWPPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQ  
HDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD TLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNCHNVYIMADKQKNGIKV  
NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLS TCSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYKTS GSGSGGG  
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGEF

Heterologe Redoxenzyme:*Rhododurula gracilis* D-Aminosäure Oxidase:

GCGGCCGC ACATAGTCAAAAAAGAGTAGTTGTATTAGGTT CAGGAGTTATTGGTTTATCATCAGCATTAAATTTAGCAAGAAA  
AGGTTATTCAGTTCATATATTAGCTAGAGATTTACCAGAAGATGTTAGTTCACAAACATTTGCAAGTCTTGGGCAGGAGCTA  
ATTGGACACCATTTATGACATTAACAGATGGTCCAAGACAAGCTAAATGGGAAGAATCAACATTTAAAAAATGGGTTGAATTA  
GTACCAACAGGACATGCTATGTGGTTAAAAGGTACAAGAAGATTTGCACAAAATGAAGATGGATTATTAGGTCATTGGTATAA  
AGATATAACACCAAATTTATAGACCATTACCAAGTTCAGAATGTCCACCAGGAGCTATAGGTGTTACTTATGATACATTAAGTG  
TACATGCACCAAATATTGTCAATATTTAGCTAGAGAATTACAAAAATTTGGGAGCAACATTTGAAAGAAGAACAGTAACAAGT  
TTAGAACAAGCATTGATGGTGTGATTTAGTTGTTAAATGCAACAGGATTAGGTGCAAAATCAATAGCTGGAATTGATGATCA  
AGCAGCTGAACCAATTAGAGGTCAAACAGTTTTAGTAAAAAGTCCATGTAAAAGATGTACAATGGATAGTTCAGATCCAGCAT  
CACCAGCTTATATAATTTCCAAGACCAGGTGGAGAAGTTATTTGTGGAGGAACCTTATGGAGTTGGTATTGGGATTTATCAGTT  
AATCCAGAAACAGTACAAAGAATATTTAAACATTTGTTTAAAGATTAGATCCAACAATTAGTTCAGATGGAACAATAGAAGGTAT  
AGAAGTTTTAAGACATAATGTAGGATTAAGACCAGCTAGAAGAGGTGGACCAAGAGTTGAAGCAGAAAGAATTGTATTACCAT  
TAGATAGAACAAAAGTCCATTATCATTTAGGAAGAGGTAGTGCAAGAGCAGCTAAAGAAAAAGAAGTTACATTAGTACATGCT  
TATGGATTTAGTTCAGCTGGTTATCAACAATCATGGGGTGCAGCTGAAGATGTTGCACAATTAGTAGATGAAGCATTTC AAAG  
ATATCATGGAGCAGCAAGAGAATCAGGTTTAAAGAGCTC

**Aminosäuresequenz:**

HSQKRVVVLGSGVIGLSSALILARKGYSVHILARDLPEDVSSQTFASPWAGANWTFMFLTDGPRQAKWEESTFKKWVELVPT  
 GHAMWLKGTTRRFAQNEDEGLLGHWYKIDITPNYRPLPSSECPPGAIGVITYDLSVHAPKYCQYLARELQKLGATFERRTVTSLEQ  
 AFDGADLVVNATGLGAKSIAGIDDDQAAEPIRGQTVLVKSPCKRCTMDSSDPASPAYIIPRPGGEVICGGTYGVGDWDLVSNPE  
 TVQRILKHCLRLDPTISSDGTIEGIEVLRHNVGLRPARRGGPRVEAERIVLPLDRTKSPLSLGRGSARAAKEKEVTLVHAYGF  
 SSAGYQQSWGAAEDVAQLVDEAFQRYHGAARESGL\*

**Rhododurula gracilis D-Aminosäureoxidase<sup>R285A</sup>:**

GCGGCCGCACATAGTCAAAAAAGAGTAGTTGTATTAGGTTTCAGGAGTTATTGGTTTATCATCAGCATTAAATTTAGCAAGAAA  
 AGGTTATTTCAGTTTCATATATTAGCTAGAGATTTACCAGAAGATGTTAGTTTCACAAACATTTGCAAGTCTTGGGCAGGAGCTA  
 ATTGGACACCATTTATGACATTAACAGATGGTCCAAGACAAGCTAAATGGGAAGAATCAACATTTAAAAATGGGTTGAATTA  
 GTACCAACAGGACATGCTATGTGGTTAAAAGGTACAAGAAGATTTGCACAAAATGAAGATGGATTATTAGGTCATTGGTATAA  
 AGATATAACACCAAATTATAGACCATTACCAAGTTCAGAATGTCCACCAGGAGCTATAGGTGTTACTTATGATACATTAAGTG  
 TACATGCACCAAAATATTGTCAATATTTAGCTAGAGAATTACAAAAATTTGGGAGCAACATTTGAAAGAAGAACAGTAACAAGT  
 TTAGAACAAGCATTGATGGTGTGATTTAGTTGTAATGCAACAGGATTAGGTGCAAAATCAATAGCTGGAATTGATGATCA  
 AGCAGCTGAACCAATTAGAGGTCAAACAGTTTTAGTAAAAAGTCCATGTAAAAGATGTACAATGGATAGTTCAGATCCAGCAT  
 CACCAGCTTATATAATTTCCAAGACCAGGTGGAGAAGTTATTTGTGGAGGAACTTATGGAGTTGGTGATTGGGATTTATCAGTT  
 AATCCAGAAACAGTACAAAGAATATTA AACATTGTTTAAGATTAGATCCAACAATTAGTTTCAGATGGAACAATAGAAGGTAT  
 AGAAGTTTTAAGACATAATGTAGGATTAACCAGCTAGAAGAGGTGGACCAAGAGTTGAAGCAGAAAGAATTGTATTACCAT  
 TAGATAGAACAAAAAGTCCATTATCATTAGGAAGAGGTAGTGCAAGAGCAGCTAAAGAAAAAGAAGTTACATTAGTACATGCT  
 TATGGATTTAGTTTCAGCTGGTTATCAACAATCATGGGGTGCAGCTGAAGATGTTGCACAATTAGTAGATGAAGCATTTCAAAAG  
 ATATCATGGAGCAGCAAGAGAATCAGGTTTATAAGAGCTC

**Aminosäuresequenz:**

HSQKRVVVLGSGVIGLSSALILARKGYSVHILARDLPEDVSSQTFASPWAGANWTFMFLTDGPRQAKWEESTFKKWVELVPT  
 GHAMWLKGTTRRFAQNEDEGLLGHWYKIDITPNYRPLPSSECPPGAIGVITYDLSVHAPKYCQYLARELQKLGATFERRTVTSLEQ  
 AFDGADLVVNATGLGAKSIAGIDDDQAAEPIRGQTVLVKSPCKRCTMDSSDPASPAYIIPRPGGEVICGGTYGVGDWDLVSNPE  
 TVQRILKHCLRLDPTISSDGTIEGIEVLRHNVGLAPARRGGPRVEAERIVLPLDRTKSPLSLGRGSARAAKEKEVTLVHAYGF  
 SSAGYQQSWGAAEDVAQLVDEAFQRYHGAARESGL\*

**Toxoplasma gondii Katalase:**

GCGGCCGCACACAAAGTACCTCCTGTAACATTTCAACAATATGGTCCAGTAATAACAACAAGTCTGGTAACTCCTGTAGATGA  
 TAATCAAAATAGTGTAACAGCAGGTCCTTATGGACCAGCTATTTTAAGTAATTTTCATTTAATAGATAAATTAGCACATTTTG  
 ATAGAGAAAGAATACCAGAAAGAGTGTACATGCAAAAGGTGGAGGAGCATTGGTTATTTTGAAGTTACACATGATATAACA  
 AGATTTTGTAAGCTAAATTGTTTGAAAAAATAGGAAAAAGAACCAGTATTTGCAAGATTTTCAACAGTTGCTGGTGAAAG  
 TGGATCAGCAGATAACAAGAAGAGATCCAAGAGGTTTTGCATTAATAATTTTATACAGAAGAAGGTAATTGGGATATGGTAGGAA  
 ATAATACACCAATATTTTTCGTTAGAGATGCTATAAAATTTCCAGATTTTATACATACACAAAAAGACATCCACAAACACAT  
 TTACATGATCCAAATATGGTATGGGATTTCTTTAGTTTAGTTCCAGAATCAGTTTCATCAAGTAACATTTTATATACAGATAG  
 AGGTACACCAGATGGATTTAGACACATGAATGGTTATGGAAGTCATACATTTAAATTTATTAATAAAGATAATGAAGCATT  
 ATGTAAAATGGCATTTTAAAACAAATCAAGGAATTAATAATTTAATAGACAAAGAGCAAAAGAATTAGAAAGTGAAGATCCA  
 GATTATGCTGTAAGAGATTTATTTAATGCAATTGCTAAAAGAGAATTTCCATCATGGACATTTTGTATACAAGTTATGCCATT  
 AAAAGATGCTGAAACATATAAATGGAATGTTTTGTATGTAACAAAAGTTTGGCCACATGGTGATTATCCATTAATTCAGTAG  
 GAAGATTAGTTTTAGATAGAAATCCAGAAAATTTTCAAGATGTAGAACAAGCAGCTTTTGCACCAGCTCAGATGGTTCCA  
 GGTATTGAACCAAGTGAAGATAGAATGTTACAAGGAAGAATGTTTTCATATATAGATACACATAGACATAGATTAGGTGCAAA  
 TTATCATCAAAATACCAGTTAATAGACCTTGAATGCTAGAGGTGGAGATTATTCAGTAAGAGATGGTCCAATGTGTGTTGATG

GTAATAAAGGAAGTCAATTAAATTATGAACCAAATTCAGTAGATGGATTTCCAAAAGAAGATAGAAATGCAGCTGTTAGTGGT  
 ACAACAACAGTATCAGGAACAGTTGCATGTCCACAAGAACATCCAAATAGTGATTTTGAACAACCTGGTAATTTTTATAG  
 AACAGTATTATCAGAACCAGAAAGAGAAGCATTAAATTGAAATATAGCAGAACATTTAAGACAAGCTAGAAGAGATATAACAAG  
 AAAGACAAGTTAAATATTCTATAAATGTGATCCAGAATATGGTGAAAGAGTAGCAAGAGCAATAGGTTTACCAACAGCAGCA  
 TGTATCCAGCAAAAATG**TAA GAGCTC**

#### Aminosäuresequenz:

TQVPPVTFQQYGPVITTSAGNPVDDNQNSVTAGPYGPAILSNFHLLDKLAHFDRERI PERVVHAKGGGAFGYFEVTHDITRFC  
 KAKLFEKIGKRTPVFARFSTVAGESGSADTRRDPRGFALKFYTEEGNWDVMGNNTPIFFVRDAIKFPDFIHTQKRHPQTHLHD  
 PNMVWDFFSVLPESVHQVTFLYTDRTGTPDGRHMNGYGSHTFKFINKDNEAFYVKWHFKTNQGIKNLNRQRAKELESEDPDYA  
 VRDLFNIAIAKREFPSWTFICIQVMPLKDAETYKWNVFDVTKVWPHGDYPLIPVGRVLVDRNPENYFQDVEQAAAFAPAHMVPGIE  
 PSEDRMLQGRMFSYIDTHRHLRGANYHQIPVNRPNWARGGDYSVRDGPVCVDGNKGSQLNYPNSVDGFPKEDRNAAVSGTTT  
 VSGTVACHPQEHNSDFEQPGNFYRTVLSEPEREALIGNIAEHLRQARRDIQERQVKIFYKCDPEYGERVARAIGLPTAACYP  
 AKM\*

#### *Toxoplasma gondii* Katalase<sup>H64N</sup>:

**GCGGCCGC**AACACAAGTACCTCCTGTAACATTTCAACAATATGGTCCAGTAATAACAACAAGTGCTGGTAATCCTGTAGATGA  
 TAATCAAATAGTGTAACAGCAGGTCTTATGGACCAGCTATTTTAAAGTAATTTTCATTTAATAGATAAATTAGCACATTTTG  
 ATAGAGAAAAGAATACCAGAAAGAGTTGTAATGCAAAAAGGTGGAGGAGCATTGGTTATTTTGAAGTTACACATGATATAACA  
 AGATTTTGTAAGCTAAATTTGTTTGAATAAATAGGAAAAAGAACACCAGTATTTGCAAGATTTTCAACAGTTGCTGGTGAAAAG  
 TGGATCAGCAGATACAAGAAGAGATCCAAGAGGTTTTGCATTAATAATTTTATACAGAAGAAGTAATGGGATATGGTAGGAA  
 ATAATACACCAATATTTTTCGTTAGAGATGCTATAAAAATTTCCAGATTTTATACATACACAAAAAGACATCCACAAACACAT  
 TTACATGATCCAAATATGGTATGGGATTTCTTTAGTTTAGTTCCAGAATCAGTTCATCAAGTAACATTTTATATACAGATAG  
 AGGTACACCAGATGGATTTAGACACATGAATGGTTATGGAAGTCATACATTTAAATTTATTAATAAAGATAATGAAGCATTTT  
 ATGTAATAATGGCATTTTAAAACAAATCAAGGAATTAATAATTTAAATAGACAAAGAGCAAAAAGTAATAAAGTGAAGATCCA  
 GATTATGCTGTAAGAGATTTATTTAATGCAATTGCTAAAAGAGAATTTCCATCATGGACATTTTGTATACAAGTTATGCCATT  
 AAAAGATGCTGAAACATATAAATGGAAATGTTTTGATGTAACAAAAGTTTGGCCACATGGTGATTATCCATTAATTCAGTAG  
 GAAGATTAGTTTTAGATAGAAATCCAGAAAATTTTTCAGATGTAGAACAAGCAGCTTTTGCACCAGCTCAGATGGTTCCA  
 GGTATTGAACCAAGTGAAGATAGAATGTTACAAGGAAGAATGTTTTCATATATAGATACACATAGACATAGATTAGGTGCAAA  
 TTATCATCAAATACCAGTTAATAGACCTTGAATGCTAGAGGTGGAGATTATTTCAGTAAGAGATGGTCCAATGTGTGTTGATG  
 GTAATAAAGGAAGTCAATTAATTTATGAACCAAATTCAGTAGATGGATTTCCAAAAGAAGATAGAAATGCAGCTGTTAGTGGT  
 ACAACAACAGTATCAGGAACAGTTGCATGTCCACAAGAACATCCAAATAGTGATTTTGAACAACCTGGTAATTTTTATAG  
 AACAGTATTATCAGAACCAGAAAGAGAAGCATTAAATTGAAATATAGCAGAACATTTAAGACAAGCTAGAAGAGATATAACAAG  
 AAAGACAAGTTAAATATTCTATAAATGTGATCCAGAATATGGTGAAAGAGTAGCAAGAGCAATAGGTTTACCAACAGCAGCA  
 TGTATCCAGCAAAAATG**TAA GAGCTC**

#### Aminosäuresequenz:

TQVPPVTFQQYGPVITTSAGNPVDDNQNSVTAGPYGPAILSNFHLLDKLAHFDRERI PERVVNAKGGGAFGYFEVTHDITRFC  
 KAKLFEKIGKRTPVFARFSTVAGESGSADTRRDPRGFALKFYTEEGNWDVMGNNTPIFFVRDAIKFPDFIHTQKRHPQTHLHD  
 PNMVWDFFSVLPESVHQVTFLYTDRTGTPDGRHMNGYGSHTFKFINKDNEAFYVKWHFKTNQGIKNLNRQRAKELESEDPDYA  
 VRDLFNIAIAKREFPSWTFICIQVMPLKDAETYKWNVFDVTKVWPHGDYPLIPVGRVLVDRNPENYFQDVEQAAAFAPAHMVPGIE  
 PSEDRMLQGRMFSYIDTHRHLRGANYHQIPVNRPNWARGGDYSVRDGPVCVDGNKGSQLNYPNSVDGFPKEDRNAAVSGTTT  
 VSGTVACHPQEHNSDFEQPGNFYRTVLSEPEREALIGNIAEHLRQARRDIQERQVKIFYKCDPEYGERVARAIGLPTAACYP  
 AKM\*

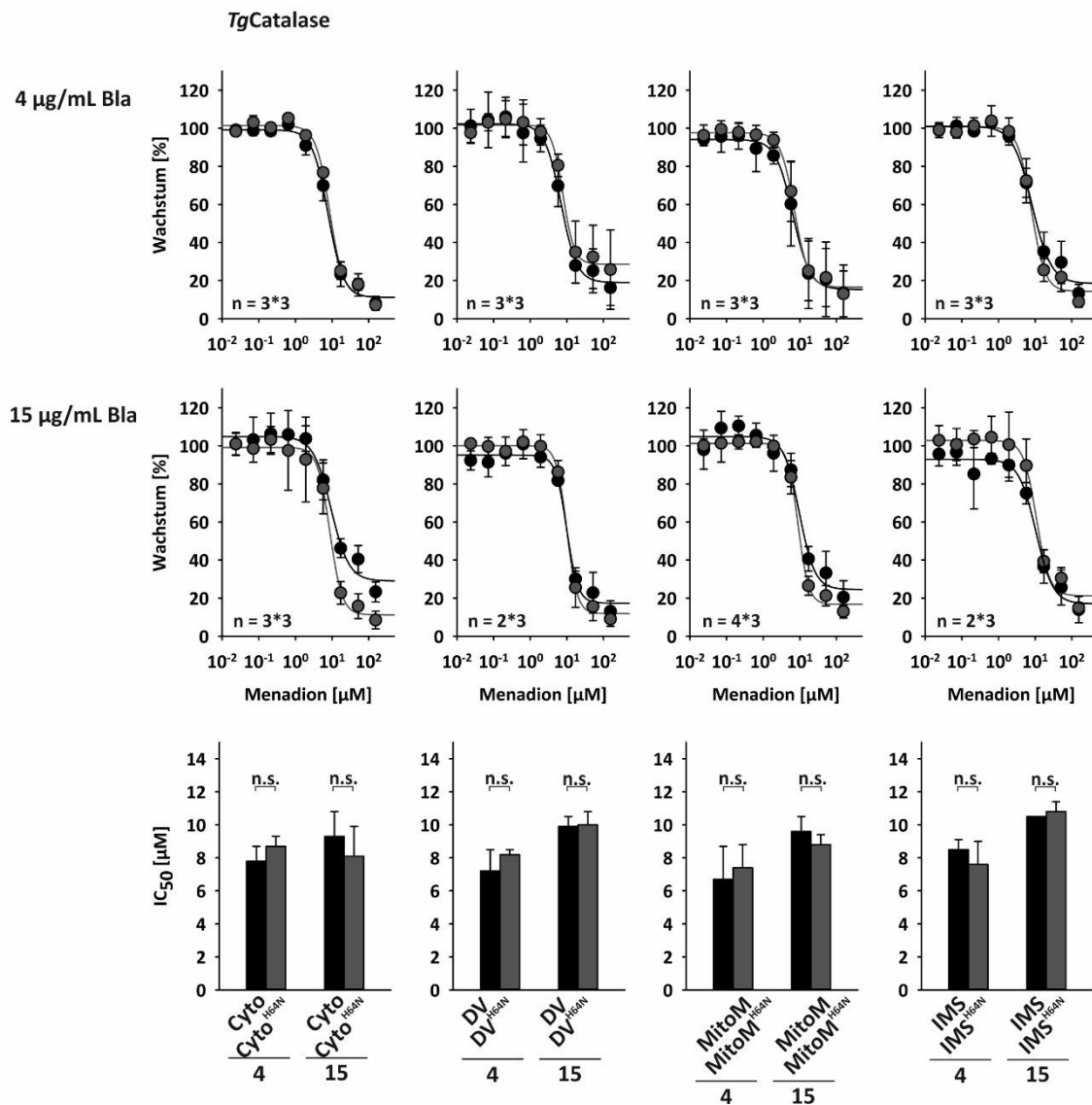
**Chac1:**

GCGGCCGC AAAACAAGAAAGTGCATCACAAAGTACACCACCACCATCATTAAGTCCAGCACCAAGTTCAGCTCAACCATTTG  
GGGAGATGGTGATCCACAAGCATTATGGATATTTGGATATGGTTCATTAGTTTGGAAACCAGATTTTGCTTATTCAGATAGTA  
GAGTTGGATTTGTAAGAGGTTATTCAAGAAGATTTTGGCAAGGAGATACATTTTCATAGAGGTAGTGATAAAATGCCAGGAAGA  
GTTGTAACATTATTAGAAGATCATGAAGGAAGTACATGGGGTGTGCTTATCAAGTTAGAGGTGAACAAGTTAATGAAGCATT  
AAAATATTTAAATGTTAGAGAAGCTGTATTAGGTGGATATGATACAAAAGAAGTAACATTTTATCCACAAGATACACCAGATC  
AACCATTAACAGCATTAGCTTATGTTGCAACACCACAAAATCCAGGATATTTAGGTCCAGCTCCAGAAGAAGTAATAGCAACA  
CAAATTTTAGCTTCAAGAGGATTTAGTGGTCATAATTTAGAATATTTATTAAGATTAGCAGATTTTATGCAATTATCAGGTCC  
ACAAGCTCAAGATGAACATTTAGAAGCAATTGTTGATGCTGTAGGAACATTATTACCAAGTTCATATTTACCAGAACAACCAT  
TAGCATTAACATAAAGAGCTC

**Aminosäuresequenz:**

KQESASQSTPPPSLSPAPSSAQPFWDGDPQALWIFGYGSLVWKPDFAYSDSRVGFVRGYSRRFWQGDTFHRGSDKMPGRVVT  
LLEDHEGSTWGVAYQVRGEQVNEALKYLNVREAVLGGYDTKEVTFYPQDTPDQPLTALAYVATPQNPGYLGPAPEEVIATQIL  
ASRGFSGHNLEYLLRLADFMQLSGPQAQDEHLEAIVDAVGTLLPSSYLPEQPLALT\*

8.1.2. IC<sub>50</sub>-Analyse der Stämme mit heterologer Katalase mit Menadion



**Abbildung 41** IC<sub>50</sub>-Messungen der Stämme mit heterologer Katalase (schwarz) oder Negativkontrolle Katalase<sup>H64N</sup> (grau) im Cytosol, der Verdauungsvakuole, der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranraum des Mitochondriums mit der Substanz Menadion. Alle Messungen wurden mit 4 oder 15 µg/mL Blasticidin zur Selektion durchgeführt. Für die Messungen wurden asynchrone Parasitenkulturen in 96-Wellplatten genutzt. Die Kulturen wurden bei einer Anfangsparasitämie von 0.5 % 72 h bei Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Das Wachstum wurde über Messung der DNA mittels SYBRgreen I bestimmt (100 % Wachstum entspricht einer Kultur ohne Zugabe von Substanz). (n = y; y = biologisches Replikat; technisches Replikat (z))

**Tabelle 27** Gemessene IC<sub>50</sub>-Werte für Menadion mit *Plasmodium falciparum* Stämmen mit heterologer Katalase oder inaktiver Punktmutante Katalase<sup>H64N</sup> im Cytosol, der Verdauungsvakuole, der mitochondrialen Matrix oder dem Intermembranraum des Mitochondriums.

Menadion [µM]	4 µg/mL Blasticidin		15 µg/mL Blasticidin	
	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>	Katalase	Katalase <sup>H64N</sup>
Cyto	7.8 ± 0.9	8.7 ± 0.6	9.3 ± 1.5	8.1 ± 1.8
DV	7.2 ± 1.3	8.2 ± 0.3	9.9 ± 0.6	10.0 ± 0.8
MitoM	6.7 ± 2.0	7.4 ± 1.4	9.6 ± 0.9	8.8 ± 0.6
IMS	8.5 ± 0.6	7.6 ± 1.4	10.5 ± 0.0	10.8 ± 0.6

8.1.3. Statistik zu den IC<sub>50</sub>-Analysen der Stämme mit heterologer Katalase und DAAO

## One Way Analysis of Variance

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

## Cyto DAAO Paraquat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	102.500	22.200	12.817
DAAO <sup>-</sup>	3	0	140.200	14.300	8.256
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	76.600	4.500	2.598
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	75.000	5.300	3.060

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	65.200	5.849	0.002	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	63.600	5.705	0.002	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	37.700	3.382	0.038	Yes
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	27.500	2.467	0.112	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	25.900	2.323	0.095	No
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	0.144	0.889	0.889	No

## Cyto DAAO Paraquat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	7	0	159.800	36.400	13.758
DAAO <sup>-</sup>	7	0	151.000	21.200	8.013
DAAO <sup>R285A+</sup>	7	0	120.600	8.500	3.213
DAAO <sup>R285A-</sup>	7	0	124.600	8.400	3.175

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	39.200	3.350	0.016	Yes
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	35.200	3.008	0.030	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	30.400	2.598	0.062	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	26.400	2.256	0.097	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	8.800	0.752	0.708	No
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	4.000	0.342	0.735	No

## Cyto DAAO Artesunat 4 g/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.724).

## Cyto DAAO Artesunat 15 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.120).

## Cyto DAAO Chloroquin 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.110).

## Cyto DAAO Chloroquin 15 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.408).

## Cyto DAAO Atovaquon 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.629).

## Cyto DAAO Atovaquon 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	7.200	1.200	0.693
DAAO <sup>-</sup>	3	0	7.000	2.100	1.212
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	11.800	1.700	0.981
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	12.200	2.500	1.443

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>-</sup>	5.200	3.290	0.064	No
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	5.000	3.163	0.065	No
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	4.800	3.037	0.063	No
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>+</sup>	4.600	2.910	0.058	No
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	0.400	0.253	0.963	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	0.200	0.127	0.902	No

## Cyto DAAO Methylenblau 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	8.400	1.000	0.577
DAAO <sup>-</sup>	3	0	12.100	2.500	1.443
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	6.600	0.1000	0.0577
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	8.100	1.200	0.693

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	5.500	4.568	0.011	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	4.000	3.322	0.051	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	3.700	3.073	0.060	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	1.800	1.495	0.435	No
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	1.500	1.246	0.435	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	0.300	0.249	0.810	No

## Cyto DAAO Methylenblau 15 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.119).

## DV DAAO Paraquat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	160.500	24.200	13.972
DAAO <sup>-</sup>	3	0	159.400	44.900	25.923
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	79.000	7.200	4.157
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	80.200	9.800	5.658

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	81.500	3.807	0.031	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	80.400	3.756	0.028	Yes
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	80.300	3.751	0.022	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	79.200	3.700	0.018	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	1.200	0.0561	0.998	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	1.100	0.0514	0.960	No

## DV DAAO Paraquat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	147.300	23.100	13.337
DAAO <sup>-</sup>	3	0	154.000	17.500	10.104
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	76.400	9.500	5.485
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	80.600	10.600	6.120

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	77.600	5.887	0.002	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	73.400	5.569	0.003	Yes
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	70.900	5.379	0.003	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	66.700	5.060	0.003	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	6.700	0.508	0.859	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	4.200	0.319	0.758	No

## DV DAAO Artesunat 4 g/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.968).

## DV DAAO Artesunat 15 g/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.433).

## DV DAAO Chloroquin 4 g/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.265).

## DV DAAO Chloroquin 15 g/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.958).

## DV DAAO Atovaquon 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	11.400	2.000	1.155
DAAO <sup>-</sup>	3	0	12.800	3.100	1.790
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	26.100	4.900	2.829
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	20.800	0.600	0.346

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>+</sup>	14.700	5.843	0.022	Yes
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	13.300	5.286	0.004	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	9.400	3.736	0.023	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>-</sup>	8.000	3.180	0.039	Yes
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	5.300	2.107	0.132	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	1.400	0.556	0.593	No

## DV DAAO Atovaquon 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	15.600	2.500	1.443
DAAO <sup>-</sup>	3	0	14.900	4.600	2.656
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	11.900	1.200	0.693
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	21.300	2.500	1.443

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	9.400	3.886	0.027	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>-</sup>	6.400	2.646	0.139	No
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	5.700	2.357	0.172	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	3.700	1.530	0.417	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	3.000	1.240	0.437	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	0.700	0.289	0.780	No

#### DV DAAO Methylenblau 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.974).

#### DV DAAO Methylenblau 15 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.153).

#### MitoM DAAO Paraquat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	7	0	212.400	131.300	49.627
DAAO <sup>-</sup>	7	0	188.400	119.900	45.318
DAAO <sup>R285A+</sup>	7	0	98.700	26.800	10.129
DAAO <sup>R285A-</sup>	7	0	89.700	15.500	5.858

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	122.700	2.544	0.102	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	113.700	2.357	0.128	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	98.700	2.046	0.192	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	89.700	1.860	0.209	No
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	24.000	0.498	0.858	No
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	9.000	0.187	0.854	No

#### MitoM DAAO Paraquat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	5	0	102.400	47.300	21.153
DAAO <sup>-</sup>	5	0	156.600	7.800	3.488
DAAO <sup>R285A+</sup>	5	0	127.300	5.700	2.549
DAAO <sup>R285A-</sup>	5	0	137.200	11.800	5.277

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	54.200	3.449	0.020	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	34.800	2.214	0.192	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	29.300	1.864	0.286	No
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>+</sup>	24.900	1.584	0.348	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	19.400	1.234	0.415	No
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	9.900	0.630	0.538	No

#### MitoM DAAO Artesunat 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.271).

#### MitoM DAAO Artesunat 15 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.610).

## MitoM DAAO Chloroquin 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.911).

## MitoM DAAO Chloroquin 15 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.624).

## MitoM DAAO Atovaquon 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.567).

## MitoM DAAO Atovaquon 15 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.127).

## MitoM DAAO Methylenblau 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.730).

## MitoM DAAO Methylenblau 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	3	0	4.400	1.000	0.577
DAAO <sup>-</sup>	3	0	6.000	0.600	0.346
DAAO <sup>R285A+</sup>	3	0	6.300	0.1000	0.0577
DAAO <sup>R285A-</sup>	3	0	6.300	0.200	0.115

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>+</sup>	1.900	3.919	0.026	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	1.900	3.919	0.022	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	1.600	3.301	0.043	Yes
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>-</sup>	0.300	0.619	0.911	No
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>-</sup>	0.300	0.619	0.800	No
DAAO <sup>R285A+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	0.000	0.000	1.000	No

## IMS DAAO Paraquat 4 µg/mL Blasticidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.884).

## IMS DAAO Paraquat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DAAO <sup>+</sup>	5	0	135.300	14.100	6.306
DAAO <sup>-</sup>	5	0	140.700	6.100	2.728
DAAO <sup>R285A+</sup>	5	0	103.200	9.700	4.338
DAAO <sup>R285A-</sup>	5	0	111.800	8.600	3.846

Comparison1	Comparison2	Diff of Means	t	P	P<0.050
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	37.500	5.899	<0.001	Yes
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	32.100	5.050	<0.001	Yes
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	28.900	4.546	0.001	Yes
DAAO <sup>+</sup>	DAAO <sup>R285A-</sup>	23.500	3.697	0.006	Yes
DAAO <sup>R285A-</sup>	DAAO <sup>R285A+</sup>	8.600	1.353	0.352	No
DAAO <sup>-</sup>	DAAO <sup>+</sup>	5.400	0.850	0.408	No

## IMS DAAO Artesunat 4 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.850).

## IMS DAAO Artesunat 15 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.228).

## IMS DAAO Chloroquin 4 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.888).

## IMS DAAO Chloroquin 15 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.362).

## IMS DAAO Atovaquon 4 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.932).

## IMS DAAO Atovaquon 15 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.112).

## IMS DAAO Methylenblau 4 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.102).

## IMS DAAO Methylenblau 15 µg/mL Blastocidin

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.635).

## t-test

## Cyto Katalase Paraquat 4 µg/mL Blastocidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	157.800	60.100	34.699
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	192.200	88.800	51.269
Difference			-34.400		

t = -0.556 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -206.282 to 137.482

Two-tailed P-value = 0.608

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.608).

## Cyto Katalase Paraquat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	5	0	60.900	27.500	12.298
Katalase <sup>H64N</sup>	5	0	138.400	25.100	11.225
Difference			-77.500		

t = -4.654 with 8 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -115.897 to -39.103

Two-tailed P-value = 0.00164

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.002).

## Cyto Katalase Artesunat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	5.600	0.700	0.404
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	9.700	1.900	1.097
Difference			-4.100		

t = -3.507 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -7.346 to -0.854

Two-tailed P-value = 0.0247

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.025).

## Cyto Katalase Artesunat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	5.100	1.000	0.577
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	5.700	1.300	0.751
Difference			-0.600		

t = -0.634 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -3.229 to 2.029

Two-tailed P-value = 0.561

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.561).

## Cyto Katalase Chloroquin 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	9.100	1.500	0.866
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	12.400	2.800	1.617
Difference			-3.300		

t = -1.799 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -8.392 to 1.792

Two-tailed P-value = 0.146

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.146).

## Cyto Katalase Chloroquin 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	7.400	0.500	0.289
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	8.700	0.600	0.346
Difference			-1.300		

t = -2.883 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -2.552 to -0.0480

Two-tailed P-value = 0.0449

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.045).

## Cyto Katalase Atovaquon 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	4	0	6.000	2.600	1.300
Katalase <sup>H64N</sup>	4	0	7.800	2.200	1.100
Difference			-1.800		

t = -1.057 with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -5.967 to 2.367

Two-tailed P-value = 0.331

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.331).

## Cyto Katalase Atovaquon 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	0.700	0.500	0.289
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	0.500	0.300	0.173
Difference			0.200		

t = 0.594 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -0.735 to 1.135

Two-tailed P-value = 0.584

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.584).

## Cyto Katalase Methylenblau 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	4	0	9.800	1.500	0.750
Katalase <sup>H64N</sup>	4	0	16.000	3.500	1.750
Difference			-6.200		

t = -3.256 with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -10.859 to -1.541

Two-tailed P-value = 0.0173

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.017$ ).

Cyto Katalase Methylenblau 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	12.500	4.200	2.425
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	14.500	2.300	1.328
Difference			-2.000		

$t = -0.723$  with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -9.676 to 5.676

Two-tailed P-value = 0.509

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.509$ ).

DV Katalase Paraquat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	5	0	323.100	257.300	115.068
Katalase <sup>H64N</sup>	5	0	247.400	87.600	39.176
Difference			75.700		

$t = 0.623$  with 8 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -204.604 to 356.004

Two-tailed P-value = 0.551

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.551$ ).

DV Katalase Paraquat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	4	0	104.800	47.300	23.650
Katalase <sup>H64N</sup>	4	0	140.800	39.080	19.540
Difference			-36.000		

$t = -1.173$  with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -111.066 to 39.066

Two-tailed P-value = 0.285

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.285$ ).

DV Katalase Artesunat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	5.900	1.000	0.577
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	5.700	0.900	0.520
Difference			0.200		

$t = 0.257$  with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -1.957 to 2.357

Two-tailed P-value = 0.810

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.810)

DV Katalase Artesunat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	3.000	0.200	0.115
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	3.300	0.600	0.346
Difference			-0.300		

t = -0.822 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -1.314 to 0.714

Two-tailed P-value = 0.457

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.457).

DV Katalase Chloroquin 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	14.300	4.200	2.425
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	11.000	1.300	0.751
Difference			3.300		

t = 1.300 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -3.748 to 10.348

Two-tailed P-value = 0.263

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.263).

DV Katalase Chloroquin 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	8.500	0.800	0.462
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	10.300	0.700	0.404
Difference			-1.800		

t = -2.933 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -3.504 to -0.0960

Two-tailed P-value = 0.0427

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.043).

DV Katalase Atovaquon 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	5.400	1.800	1.039
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	5.000	1.800	1.039
Difference			0.400		

t = 0.272 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -3.681 to 4.481

Two-tailed P-value = 0.799

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.799).

DV Katalase Atovaquon 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	0.700	0.400	0.231
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	0.500	0.200	0.115
Difference		0.200			

t = 0.775 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -0.517 to 0.917

Two-tailed P-value = 0.482

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.482).

DV Katalase Methylenblau 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	5	0	11.800	2.800	1.252
Katalase <sup>H64N</sup>	5	0	12.300	4.100	1.834
Difference		-0.500			

t = -0.225 with 8 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -5.620 to 4.620

Two-tailed P-value = 0.827

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.827)

DV Katalase Methylenblau 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	13.300	2.200	1.270
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	13.700	3.700	2.136
Difference		-0.400			

t = -0.161 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -7.300 to 6.500

Two-tailed P-value = 0.880

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.880).

MitoM Katalase Paraquat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	5	0	153.000	67.800	30.321
Katalase <sup>H64N</sup>	5	0	214.600	107.200	47.941
Difference		-61.600			

$t = -1.086$  with 8 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -192.408 to 69.208

Two-tailed P-value = 0.309

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.309$ ).

MitoM Katalase Paraquat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	5	0	75.700	6.000	2.683
Katalase <sup>H64N</sup>	5	0	94.100	11.200	5.009
Difference			-18.400		

$t = -3.238$  with 8 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -31.503 to -5.297

Two-tailed P-value = 0.0119

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.012$ ).

MitoM Katalase Artesunat 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	8.800	1.100	0.635
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	7.900	1.800	1.039
Difference			0.900		

$t = 0.739$  with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -2.481 to 4.281

Two-tailed P-value = 0.501

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.501$ ).

MitoM Katalase Artesunat 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	4	0	5.100	2.900	1.450
Katalase <sup>H64N</sup>	4	0	5.400	2.500	1.250
Difference			-0.300		

$t = -0.157$  with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -4.984 to 4.384

Two-tailed P-value = 0.881

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.881$ ).

## MitoM Katalase Chloroquin 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	14.000	1.800	1.039
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	12.000	2.100	1.212
Difference			2.000		

t = 1.252 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -2.434 to 6.434

Two-tailed P-value = 0.279

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.279).

## MitoM Katalase Chloroquin 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	7.100	4.400	2.540
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	8.400	4.700	2.714
Difference			-1.300		

t = -0.350 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -11.620 to 9.020

Two-tailed P-value = 0.744

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.744).

## MitoM Katalase Atovaquon 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	5	0	7.000	2.800	1.252
Katalase <sup>H64N</sup>	5	0	4.900	2.800	1.252
Difference			2.100		

t = 1.186 with 8 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -1.984 to 6.184

Two-tailed P-value = 0.270

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.270).

## MitoM Katalase Atovaquon 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	1.800	2.300	1.328
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	1.600	2.000	1.155
Difference			0.200		

t = 0.114 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -4.686 to 5.086

Two-tailed P-value = 0.915

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.915$ ).

MitoM Katalase Methylenblau 4 µg/mL Blastidicin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	6	0	11.600	3.500	1.429
Katalase <sup>H64N</sup>	6	0	12.500	4.100	1.674
Difference			-0.900		

$t = -0.409$  with 10 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -5.804 to 4.004

Two-tailed P-value = 0.691

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.691$ ).

MitoM Katalase Methylenblau 15 µg/mL Blastidicin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	4	0	9.300	2.100	1.050
Katalase <sup>H64N</sup>	4	0	10.600	4.100	2.050
Difference			-1.300		

$t = -0.564$  with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -6.936 to 4.336

Two-tailed P-value = 0.593

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.593$ ).

IMS Katalase Paraquat 4 µg/mL Blastidicin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	165.400	92.000	53.116
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	362.400	67.900	39.202
Difference			-197.000		

$t = -2.984$  with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -380.290 to -13.710

Two-tailed P-value = 0.0406

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.041$ ).

IMS Katalase Paraquat 15 µg/mL Blastidicin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	5	0	78.000	20.900	9.347
Katalase <sup>H64N</sup>	5	0	113.000	34.000	15.205

Difference -35.000

t = -1.961 with 8 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -76.158 to 6.158

Two-tailed P-value = 0.0855

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.086).

#### IMS Katalase Artesunat 4 µg/mL Blastidicin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	4	0	7.000	1.500	0.750
Katalase <sup>H64N</sup>	4	0	6.300	0.200	0.1000
Difference			0.700		

t = 0.925 with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -1.151 to 2.551

Two-tailed P-value = 0.391

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.391).

#### IMS Katalase Artesunat 15 µg/mL Blastidicin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	3.900	0.500	0.289
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	4.400	1.200	0.693
Difference			-0.500		

t = -0.666 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -2.584 to 1.584

Two-tailed P-value = 0.542

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.542).

#### IMS Katalase Chloroquin 4 µg/mL Blastidicin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	9.600	0.700	0.404
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	12.200	3.500	2.021
Difference			-2.600		

t = -1.262 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -8.322 to 3.122

Two-tailed P-value = 0.276

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.276).

## IMS Katalase Chloroquin 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	9.500	1.300	0.751
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	9.600	2.200	1.270
Difference			-0.1000		

t = -0.0678 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -4.196 to 3.996

Two-tailed P-value = 0.949

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.949).

## IMS Katalase Atovaquon 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	7.500	3.100	1.790
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	8.200	3.300	1.905
Difference			-0.700		

t = -0.268 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -7.958 to 6.558

Two-tailed P-value = 0.802

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.802).

## IMS Katalase Atovaquon 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	4	0	1.400	1.200	0.600
Katalase <sup>H64N</sup>	4	0	2.000	1.700	0.850
Difference			-0.600		

t = -0.577 with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -3.146 to 1.946

Two-tailed P-value = 0.585

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.585).

## IMS Katalase Methylenblau 4 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	10.200	2.600	1.501
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	12.000	4.100	2.367
Difference			-1.800		

t = -0.642 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -9.582 to 5.982

Two-tailed P-value = 0.556

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.556$ ).

IMS Katalase Methylenblau 15 µg/mL Blasticidin

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Katalase	3	0	10.400	3.000	1.732
Katalase <sup>H64N</sup>	3	0	11.900	2.800	1.617
Difference		-1.500			

$t = -0.633$  with 4 degrees of freedom.

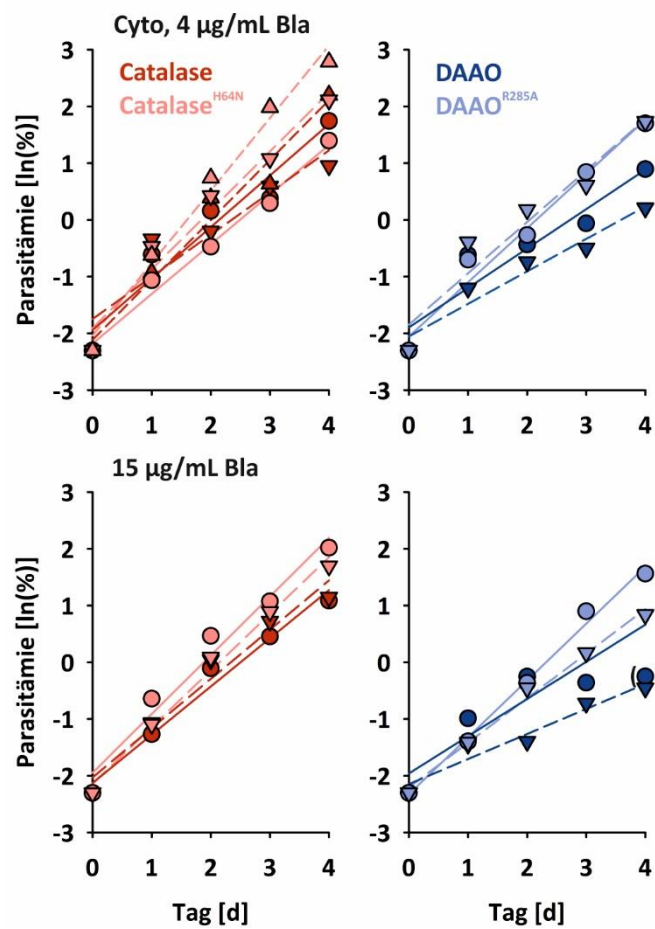
95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -8.078 to 5.078

Two-tailed P-value = 0.561

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ( $P = 0.561$ ).

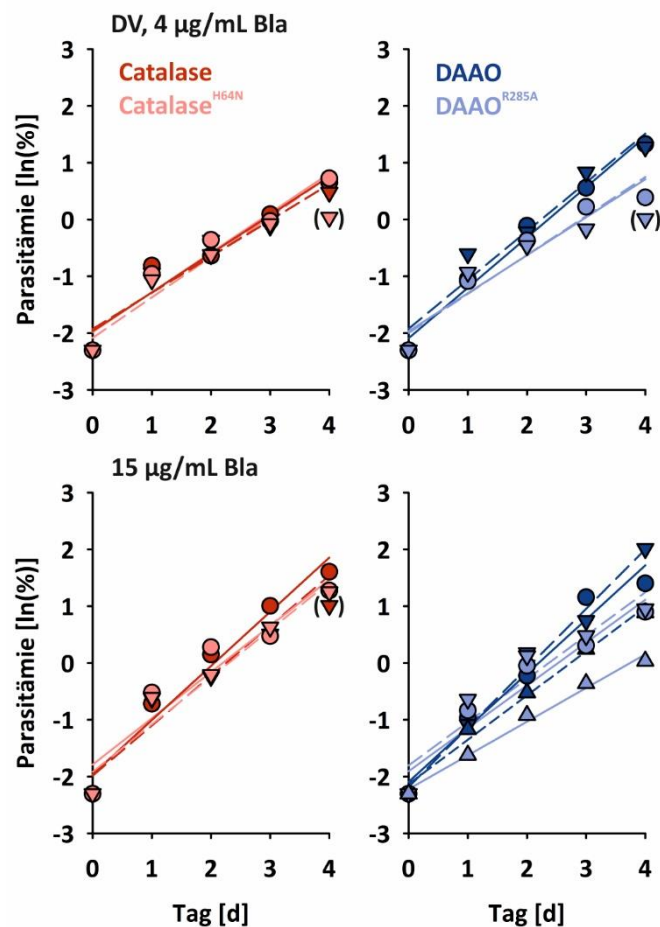
## 8.1.4. Verdopplungszeitanalyse

## 8.1.4.1. Lokalisation der heterologen Redoxenzyme im Cytosol



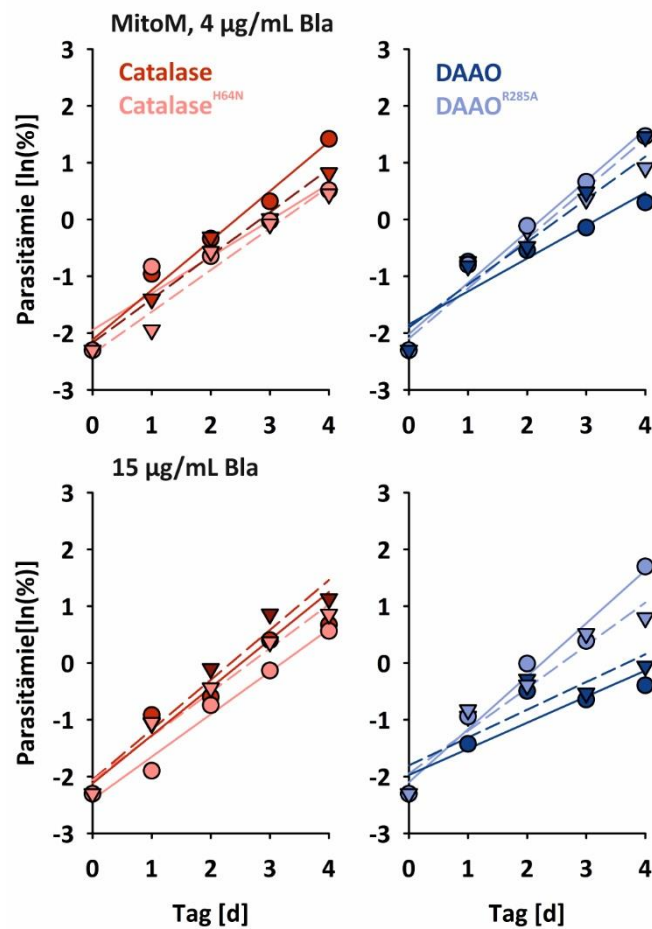
**Abbildung 42** Graphische Auswertung der Wachstumskurven cytosolischer Katalase (rot), Katalase<sup>H64N</sup> (hellrot), DAAO (blau) oder DAAO<sup>R285A</sup> (hellblau). Die Parasitämien wurden logarithmiert und anschließend linear gefittet. Mit der Steigung des Fits wurde die Verdopplungszeit berechnet. Die Verdopplungszeit ergibt sich aus  $x = \ln(2)/\ln(\text{Parasitämie})$ . Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blasticidin durchgeführt und die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von >2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1$  %. Die gestrichelten Datenpunkte stellen den Mittelwert der Replikate dar. (n = 2, n = biologische Replikate; Versuch 1: Kreis/vollständiger Strich, Versuch 2: Dreieck/unterbrochener Strich; DAAO 15 µg/mL Blasticidin Versuch 1 Tag 4 aus linearer Regression ausgeschlossen).

## 8.1.4.2. Lokalisation der heterologen Redoxenzyme in der Verdauungsvakuole



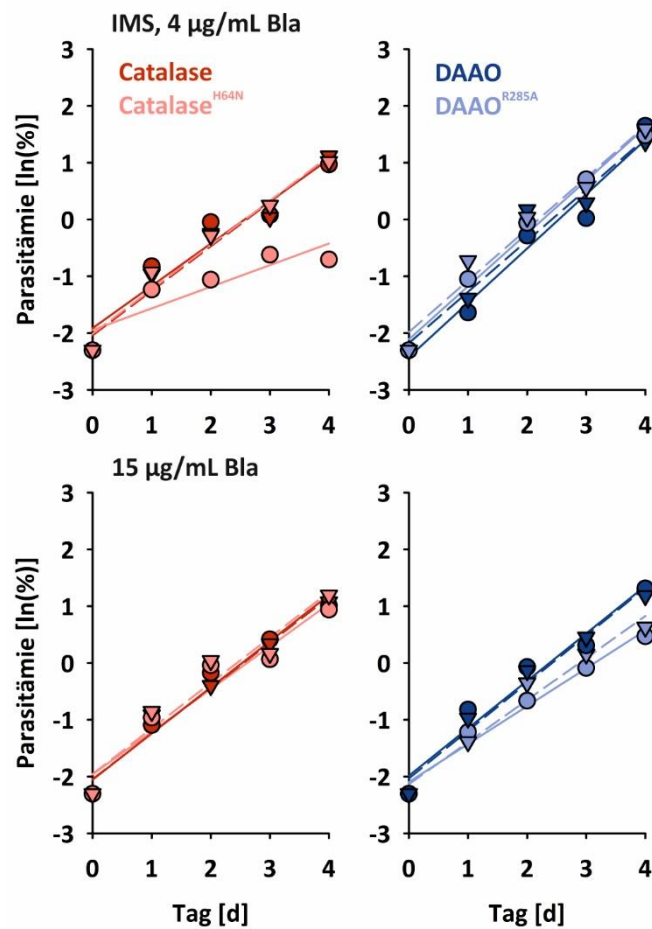
**Abbildung 43** Graphische Auswertung der Wachstumskurven mit Katalase (rot), Katalase<sup>H64N</sup> (hellrot), DAAO (blau) oder DAAO<sup>R285A</sup> (hellblau) in der Verdauungsvakuole. Die Parasitämies wurden logarithmiert und anschließend linear gefittet. Mit der Steigung des Fits wurde die Verdopplungszeit berechnet. Die Verdopplungszeit ergibt sich aus  $x = \ln(2)/\ln(\text{Parasitämie})$ . Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blastocidin durchgeführt. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von >2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1$  %. Die gestrichelten Datenpunkte stellen den Mittelwert der Replikate dar. (n = 2, DAAO 15 µg/mL Bla: n = 3 n = biologische Replikate; Versuch 1: Kreis/vollständiger Strich, Versuch 2: Dreieck unten/unterbrochener Strich; Versuch 3: Dreieck oben/kurz unterbrochener Strich; Katalase<sup>H64N</sup> 4 µg/mL Blastocidin Versuch 2 Tag 4 aus linearer Regression ausgeschlossen; Katalase 15 µg/mL Blastocidin Versuch 2 Tag 4 aus linearer Regression ausgeschlossen; DAAO<sup>R285A</sup> 4 µg/mL Blastocidin Versuch 2 Tag 4 aus linearer Regression ausgeschlossen).

## 8.1.4.3. Lokalisation der heterologen Redoxenzyme in der mitochondrialen Matrix



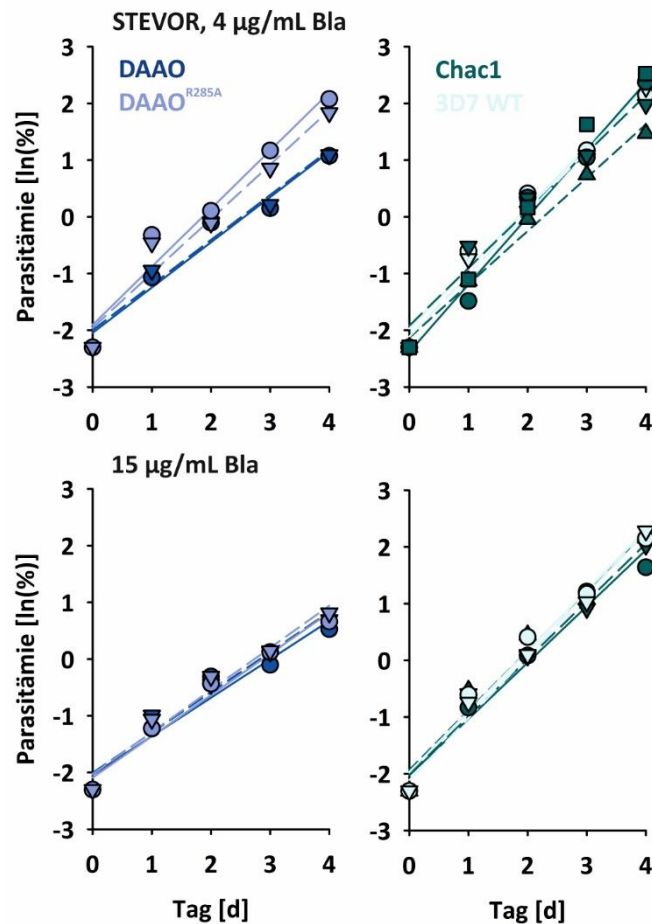
**Abbildung 44** Graphische Auswertung der Wachstumskurven mit Katalase (rot), Katalase<sup>H64N</sup> (hellrot), DAAO (blau) oder DAAO<sup>R285A</sup> (hellblau) der mitochondrialen Matrix. Die Parasitämien wurden logarithmiert und anschließend linear gefittet. Mit der Steigung des Fits wurde die Verdopplungszeit berechnet. Die Verdopplungszeit ergibt sich aus  $x = \ln(2)/\ln(\text{Parasitämie})$ . Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blasticidin durchgeführt. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von >2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1$  %. Die gestrichelten Datenpunkte stellen den Mittelwert der Replikate dar. ( $n = 2$ ,  $n =$  biologische Replikate; Versuch 1: Kreis/vollständiger Strich, Versuch 2: Dreieck/unterbrochener Strich).

## 8.1.4.4. Lokalisation der heterologen Redoxenzyme im Intermembranraum des Mitochondriums



**Abbildung 45** Graphische Auswertung der Wachstumskurven mit Katalase (rot), Katalase<sup>H64N</sup> (hellrot), DAAO (blau) oder DAAO<sup>R285A</sup> (hellblau) im Intermembranraum des Mitochondriums. Die Parasitämien wurden logarithmiert und anschließend linear gefittet. Mit der Steigung des Fits wurde die Verdopplungszeit berechnet. Die Verdopplungszeit ergibt sich aus  $x = \ln(2)/\ln(\text{Parasitämie})$ . Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blasticidin durchgeführt. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von >2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1$  %. Die gestrichelten Datenpunkte stellen den Mittelwert der Replikate dar. ( $n = 2$ ,  $n =$  biologische Replikate; Versuch 1: Kreis/vollständiger Strich, Versuch 2: Dreieck/unterbrochener Strich).

## 8.1.4.5. Lokalisation von heterologen Redoxenzymen im Erythrozyten mit Exportsignal STEVOR



**Abbildung 46** Graphische Auswertung der Wachstumskurven mit exportiertem DAAO (blau), Chac1 (grün) oder DAAO<sup>R285A</sup> (hellblau) und dem 3D7 WT Stamm (hellgrün). Die Parasitämien wurden logarithmiert und anschließend linear gefittet. Mit der Steigung des Fits wurde die Verdopplungszeit berechnet. Die Verdopplungszeit ergibt sich aus  $x = \ln(2)/\ln(\text{Parasitämie})$ . Die Kulturen wurden an Tag 0 auf eine Parasitämie von 0.1 % angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kulturen DAAO und DAAO<sup>R285A</sup> wurden ab Tag 0 kontinuierlich mit 5 mM D-Alanin inkubiert. Der Versuch wurde jeweils bei 4 µg/mL (oben) und 15 µg/mL (unten) Blasticidin durchgeführt. Für den 3D7 WT Stamm wurde kein Blasticidin zugegeben. Die Parasitämie wurde täglich mittels Giemsa-Ausstrich ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Parasitämie von >2000 RBCs mit einer Standardabweichung von  $\leq 0.1\%$ . Die gestrichelten Datenpunkte stellen den Mittelwert der Replikate dar. (n = 2, n = biologische Replikate; Versuch 1: Kreis/vollständiger Strich, Versuch 2: Dreieck/unterbrochener Strich, Versuch 3: Dreieck oben/kurz unterbrochener Strich, Versuch 3: Rechteck/klein unterbrochener Strich).

## 8.2. Split-mDHFR-DNA-Sequenzen der synthetisierten Konstrukte

8.2.1. DNA-Sequenz MCS2-Linker-mDHFR<sup>N-term</sup>

**ACTAGTCCCGGGGAATTC**TCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTATGGTTAGACCATTGAACTGTATCGTT  
GCTGTTTCTCAAACATGGGTATCGGCAAGAACGGTGATTTTCCATGGCCACCATTAAGAAACGAATCAAAGTAC  
TTCCAAAGAATGACTACAACCTTCTCAGTTGAAGGCAAGCAAACCTTGGTTATCATGGGTAGAAAGACATGGTTC  
TCAATCCCAGAAAAGAATAGACCATTGAAGGATAGAATCAACATCGTTTTGTCAAGAGAATTAAGAAACCA  
AGAGGTGCTCATTCTTGGCAAAGTCATTAGATGATGCATTGAGATTGATCGAACCAACCAGAATTG**TAA****GAGCTC**

8.2.2. DNA-Sequenz MCS1-Linker-mDHFR<sup>C-term</sup>-skip2A

**GGATCCTCTAGACTCGAG**TCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGCTTCAAAGTTGATATGGTTTGGATT  
GTTGGTGGTTCTCAGTTTATCAAGAAGCAATGAATCAACCAGGTCATTTGAGATTGTTTCGTTACTAGAATCATG

CAAGAATTTGAATCTGATACTTTCTTTCCAGAAATCGATTTGGGCAAGTACAAGTTGTTACCAGAATACCCAGGT  
 GTTTTATCAGAAGTTCAAGAAGAAAAAGGTATTAATATAAAATTTGAAGTTTACGAAAAGAAAGATGGATCTGGA  
 GAAGGAAGAGGAAGTTTATTAACATGTGGAGATGTAGAAGAAAATCCAAGACCAAGATCT

### 8.2.3. DNA-Sequenz MCS1-Linker-mDHFR<sup>C-term-I115A</sup> skip2A

GGATCTCTAGACTCGAGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCTGCTTCAAAGTTGATATGGTTTGGCA  
 GTTGGTGGTCTTTCAGTTTATCAAGAAGCTATGAATCAACCAGGTCATTTGAGATTGTTTCGTTACTAGAATCATG  
 CAAGAATTTGAATCTGATACTTTCTTTCCAGAAATCGATTTGGGCAAGTACAAGTTGTTACCAGAATACCCAGGT  
 GTTTTATCAGAAGTTCAAGAAGAAAAAGGTATTAATATAAAATTTGAAGTTTACGAAAAGAAAGATGGATCTGGA  
 GAAGGAAGAGGAAGTTTATTAACATGTGGAGATGTAGAAGAAAATCCAAGACCAAGATCT

### 8.2.4. DNA-Sequenz MCS2-Tim9

ACTAGTATGGAAAAATCTTTGGATTTATCAGCTTTCAACAAGTCTGATAGAGATAAGATCTTGAAGAAAATTAAT  
 AAAGCAGAATATGAAGATACTATGAATACATACAATTCAATTGTTGAAAGATGTTTTAATGAATGTATTACTTCT  
 TTTAGATCAAAAGAATTGGATAACAACGAAAACAACGTATCTTGAAGTGTGTTAAAAAATTTTCTATTTTCTCT  
 CAAAGAATTGGTATGAAATTTACTCAAAATTTAAATAATGAAATGCAAAGAAAACTGAATTC

### 8.2.5. DNA-Sequenz MCS2-Tim13

ACTAGTATGGATTTGTCTTCATTGCCAACTGATGATAATTTGGATGATAAGAAAAGAGCTGCAGTTTTGTTATCA  
 TTACAAGAAATGTTCAAAAACAAAAGAAAATGTTAAGGTTATGGATATCTGTTTTCAACAAGTGTGTTTCAAAG  
 ATCGGTCCAAAGTTGTCTTCATCTGAACAAAAGTGTATCTGGGATTGTGCTAATTTACTTCTACACAAATGTT  
 TTCTTGAATCAAAGATTAGAACAAATGACTAAAATTTTGAATCAAATTTCTGATTATACAAATTTAGAATTC

### 8.2.6. DNA-Sequenz MCS1-Tim10

GGATCCATGAAACGATAACATCTCTAAGGTTAATTCAACTGTTGTTGAATTGTTGGGCATGTCTGATTTGTTCAAG  
 AGAATGCAAACACATGTTGGTTGAAGTGTATCCAGATGTTTCATGATTCATTTTTGTCAGTTGGTGAACTTCT  
 TGTGTTGATAGATGTGTTAACAAGTACATGGAAATCCATACTTTGGTTGGTAAAAATTTACAAGAATCACAAAT  
 ACAAAACTCGAG

### 8.2.7. DNA-Sequenz MCS1-Tim8

GGATCCATGGAAAAATAAGCTAAAGAAGAAAATTTAGATAATTTCTTGACTCAATTGAACACATTGAACAAGATC  
 ATCACTTCTTTTAAAGAAACATGTAAAATTTCTTCATATTGTTTTCGATAAGTGTGTTTCATACCCAGAAAAGTCT  
 TTGTCAAACACTAACAAGAAGTGTATTTGGAATTGTACACAAAGATATATTGAATGTGAATACTTTATTAATAAT  
 AGATCTAAAGATAATCAATCTTTGTCAAACCTCGAATTGATCAAGAACATGAACTCTTCTGAAAATTTAGCAGAA  
 TTGAAAATGATAATAATAAACTGAAAATTTGTTTTAAAGATCTCGAG

## 9. Literatur

1. Kappe, S.H., Vaughan, A.M., Boddey, J.A. & Cowman, A.F. That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda. *Science* **328**, 862-6 (2010).
2. Price, R.N. *et al.* Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* **77**, 79-87 (2007).
3. Tuteja, R. Malaria - an overview. *FEBS J* **274**, 4670-9 (2007).
4. Maier, A.G., Matuschewski, K., Zhang, M. & Rug, M. Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol* **35**, 481-482 (2019).
5. Frischknecht, F. *et al.* Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes. *Cell Microbiol* **6**, 687-94 (2004).
6. Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. & Doumbo, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**, 673-9 (2002).
7. Frevert, U. *et al.* Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med* **177**, 1287-98 (1993).
8. Roques, M., Bindschedler, A., Beyeler, R. & Heussler, V.T. Same, same but different: Exploring Plasmodium cell division during liver stage development. *PLoS Pathog* **19**, e1011210 (2023).
9. Stanway, R.R. *et al.* Organelle segregation into Plasmodium liver stage merozoites. *Cell Microbiol* **13**, 1768-82 (2011).
10. Cowman, A.F. & Crabb, B.S. The Plasmodium falciparum genome--a blueprint for erythrocyte invasion. *Science* **298**, 126-8 (2002).
11. Cowman, A.F., Healer, J., Marapana, D. & Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **167**, 610-624 (2016).
12. Tham, W.H., Healer, J. & Cowman, A.F. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol* **28**, 23-30 (2012).
13. Singh, S., Alam, M.M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J.A. & Chitnis, C.E. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathog* **6**, e1000746 (2010).
14. Riglar, D.T. *et al.* Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe* **9**, 9-20 (2011).
15. Craig, A. & Scherf, A. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol* **115**, 129-43 (2001).
16. Kirk, K. Channels and transporters as drug targets in the Plasmodium-infected erythrocyte. *Acta Trop* **89**, 285-98 (2004).
17. 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. *Int J Parasitol* **36**, 23-36 (2006).
18. Baruch, D.I. *et al.* Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* **82**, 77-87 (1995).
19. Newbold, C. *et al.* Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* **29**, 927-37 (1999).
20. Lazarus, M.D., Schneider, T.G. & Taraschi, T.F. A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Cell Sci* **121**, 1937-49 (2008).
21. Henshall, I.G. & Spielmann, T. Critical interdependencies between Plasmodium nutrient flux and drugs. *Trends Parasitol* **39**, 936-944 (2023).
22. Ginsburg, H., Kutner, S., Krugliak, M. & Cabantchik, Z.I. Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of Plasmodium falciparum infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol* **14**, 313-22 (1985).
23. Beck, J.R. & Ho, C.M. Transport mechanisms at the malaria parasite-host cell interface. *PLoS Pathog* **17**, e1009394 (2021).

24. Garten, M. *et al.* EXP2 is a nutrient-permeable channel in the vacuolar membrane of Plasmodium and is essential for protein export via PTEX. *Nat Microbiol* **3**, 1090-1098 (2018).
25. Desia, S.A., Krogstad, D.J. & McCleskey, E.W. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* **362**, 643-6 (1993).
26. Martin, R.E. The transportome of the malaria parasite. *Biol Rev Camb Philos Soc* **95**, 305-332 (2020).
27. Spielmann, T., Gras, S., Sabitzki, R. & Meissner, M. Endocytosis in Plasmodium and Toxoplasma Parasites. *Trends Parasitol* **36**, 520-532 (2020).
28. Yayon, A., Cabantchik, Z.I. & Ginsburg, H. Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J* **3**, 2695-700 (1984).
29. Krugliak, M., Zhang, J. & Ginsburg, H. Intraerythrocytic Plasmodium falciparum utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol* **119**, 249-56 (2002).
30. Hanssen, E. *et al.* Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum. *J Struct Biol* **177**, 224-32 (2012).
31. 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. *Parasitol Today* **16**, 427-33 (2000).
32. Organization, W.H. World malaria report 2024. (2024).
33. Organization, W.H. World malaria report 2023. (2023).
34. Accrombessi, M. *et al.* Efficacy of pyriproxyfen-pyrethroid long-lasting insecticidal nets (LLINs) and chlorfenapyr-pyrethroid LLINs compared with pyrethroid-only LLINs for malaria control in Benin: a cluster-randomised, superiority trial. *Lancet* **401**, 435-446 (2023).
35. Rts, S.C.T.P. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **386**, 31-45 (2015).
36. Dattoo, M.S. *et al.* 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* **397**, 1809-1818 (2021).
37. Sies, H., Mailloux, R.J. & Jakob, U. Fundamentals of redox regulation in biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **25**, 701-719 (2024).
38. Lennicke, C. & Cocheme, H.M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell* **81**, 3691-3707 (2021).
39. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* **86**, 715-748 (2017).
40. Murphy, M.P. *et al.* Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab* **4**, 651-662 (2022).
41. Halliwell, B. Reflections of an aging free radical. *Free Radic Biol Med* **161**, 234-245 (2020).
42. Holmstrom, K.M. & Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 411-21 (2014).
43. D'Autreaux, B. & Toledano, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 813-24 (2007).
44. Sies, H. *et al.* Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 499-515 (2022).
45. Brigelius-Flohe, R. & Flohe, L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal* **15**, 2335-81 (2011).
46. Marinho, H.S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H. & Antunes, F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol* **2**, 535-62 (2014).
47. Suzuki, T. & Yamamoto, M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *J Biol Chem* **292**, 16817-16824 (2017).
48. Yamamoto, M., Kensler, T.W. & Motohashi, H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev* **98**, 1169-1203 (2018).

49. Cuadrado, A. *et al.* Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 295-317 (2019).
50. Lambeth, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**, 181-9 (2004).
51. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1-13 (2009).
52. Zelko, I.N., Mariani, T.J. & Folz, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**, 337-49 (2002).
53. Nisimoto, Y., Diebold, B.A., Cosentino-Gomes, D. & Lambeth, J.D. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry* **53**, 5111-20 (2014).
54. Kelley, E.E. *et al.* Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med* **48**, 493-8 (2010).
55. Brigelius-Flohe, R. & Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3289-303 (2013).
56. Lang, L. *et al.* Substrate Promiscuity and Hyperoxidation Susceptibility as Potential Driving Forces for the Co-evolution of Prx5-Type and Prx6-Type 1-Cys Peroxiredoxin Mechanisms. *ACS Catalysis* **13**, 3627-3643 (2023).
57. Sies, H. & Jones, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 363-383 (2020).
58. Walton, P.A. & Pizzitelli, M. Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Front Physiol* **3**, 108 (2012).
59. Becker, K. *et al.* Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* **34**, 163-89 (2004).
60. Rahlfs, S., Schirmer, R.H. & Becker, K. The thioredoxin system of Plasmodium falciparum and other parasites. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1024-41 (2002).
61. Jortzik, E. & Becker, K. Thioredoxin and glutathione systems in Plasmodium falciparum. *Int J Med Microbiol* **302**, 187-94 (2012).
62. Rahlfs, S., Nickel, C., Deponte, M., Schirmer, R.H. & Becker, K. Plasmodium falciparum thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Rep* **8**, 246-50 (2003).
63. Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C. & Schirmer, R.H. Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Biol Chem* **384**, 551-66 (2003).
64. Sztajer, H. *et al.* The putative glutathione peroxidase gene of Plasmodium falciparum codes for a thioredoxin peroxidase. *J Biol Chem* **276**, 7397-403 (2001).
65. Johnson, R.M., Goyette, G., Jr., Ravindranath, Y. & Ho, Y.S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* **39**, 1407-17 (2005).
66. Wezena, C.A., Krafczyk, J., Staudacher, V. & Deponte, M. Growth inhibitory effects of standard pro- and antioxidants on the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Exp Parasitol* **180**, 64-70 (2017).
67. Yano, K. *et al.* 2-Cys Peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development in Plasmodium berghei. *Mol Biochem Parasitol* **148**, 44-51 (2006).
68. Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S. & Kano, S. Disruption of the Plasmodium falciparum 2-Cys peroxiredoxin gene renders parasites hypersensitive to reactive oxygen and nitrogen species. *FEBS Lett* **547**, 140-4 (2003).
69. Kimura, R., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S. & Kano, S. 2-Cys peroxiredoxin of Plasmodium falciparum is involved in resistance to heat stress of the parasite. *Parasitol Int* **62**, 137-43 (2013).
70. Djuika, C.F. *et al.* Prokaryotic ancestry and gene fusion of a dual localized peroxiredoxin in malaria parasites. *Microb Cell* **2**, 5-13 (2015).
71. 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. *Sci Rep* **7**, 4410 (2017).

72. Krungkrai, S.R. & Yuthavong, Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**, 710-4 (1987).
73. Gorka, A.P., de Dios, A. & Roepe, P.D. Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities. *J Med Chem* **56**, 5231-46 (2013).
74. Ke, F. *et al.* The anti-malarial atovaquone selectively increases chemosensitivity in retinoblastoma via mitochondrial dysfunction-dependent oxidative damage and Akt/AMPK/mTOR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **504**, 374-379 (2018).
75. Klayman, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **228**, 1049-55 (1985).
76. Meunier, B. & Robert, A. Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. *Acc Chem Res* **43**, 1444-51 (2010).
77. Bridgford, J.L. *et al.* Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat Commun* **9**, 3801 (2018).
78. Ismail, H.M. *et al.* Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 2080-5 (2016).
79. Shaw, P.J. *et al.* *Plasmodium* parasites mount an arrest response to dihydroartemisinin, as revealed by whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-seq) and microarray study. *BMC Genomics* **16**, 830 (2015).
80. Wang, J. *et al.* Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* **6**, 10111 (2015).
81. Wicht, K.J., Mok, S. & Fidock, D.A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Annu Rev Microbiol* **74**, 431-454 (2020).
82. Dondorp, A.M. *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* **361**, 455-67 (2009).
83. Noedl, H. *et al.* Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* **359**, 2619-20 (2008).
84. White, N.J. The parasite clearance curve. *Malar J* **10**, 278 (2011).
85. Menard, D. & Dondorp, A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**(2017).
86. Witkowski, B. *et al.* Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis* **13**, 1043-9 (2013).
87. Coppee, R., Jeffares, D.C., Miteva, M.A., Sabbagh, A. & Clain, J. Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13. *Sci Rep* **9**, 10675 (2019).
88. Schumann, R. *et al.* Protein abundance and folding rather than the redox state of Kelch13 determine the artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum*. *Redox Biol* **48**, 102177 (2021).
89. Ashley, E.A. *et al.* Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* **371**, 411-23 (2014).
90. Ariey, F. *et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **505**, 50-5 (2014).
91. Straimer, J. *et al.* Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* **347**, 428-31 (2015).
92. Birnbaum, J. *et al.* A genetic system to study *Plasmodium falciparum* protein function. *Nat Methods* **14**, 450-456 (2017).
93. Birnbaum, J. *et al.* A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science* **367**, 51-59 (2020).
94. Yang, T. *et al.* Decreased K13 Abundance Reduces Hemoglobin Catabolism and Proteotoxic Stress, Underpinning Artemisinin Resistance. *Cell Rep* **29**, 2917-2928 e5 (2019).

95. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13**, 76-86 (1999).
96. Wellems, T.E. & Plowe, C.V. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* **184**, 770-6 (2001).
97. Spiller, D.G., Bray, P.G., Hughes, R.H., Ward, S.A. & White, M.R. The pH of the Plasmodium falciparum digestive vacuole: holy grail or dead-end trail? *Trends Parasitol* **18**, 441-4 (2002).
98. Dorn, A. *et al.* An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochem Pharmacol* **55**, 727-36 (1998).
99. Leed, A. *et al.* Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. *Biochemistry* **41**, 10245-55 (2002).
100. Olafson, K.N., Ketchum, M.A., Rimer, J.D. & Vekilov, P.G. Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 4946-51 (2015).
101. Combrinck, J.M. *et al.* Optimization of a multi-well colorimetric assay to determine haem species in Plasmodium falciparum in the presence of anti-malarials. *Malar J* **14**, 253 (2015).
102. Dhingra, S.K. *et al.* A Variant PfCRT Isoform Can Contribute to Plasmodium falciparum Resistance to the First-Line Partner Drug Piperaquine. *mBio* **8**(2017).
103. Bray, P.G. *et al.* PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. *Mol Microbiol* **62**, 238-51 (2006).
104. Sullivan, D.J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol* **32**, 1645-53 (2002).
105. Atamna, H. & Ginsburg, H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **61**, 231-41 (1993).
106. Loria, P., Miller, S., Foley, M. & Tilley, L. Inhibition of the peroxidative degradation of heme as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J* **339**, 363-70 (1999).
107. Lehane, A.M., Hayward, R., Saliba, K.J. & Kirk, K. A verapamil-sensitive chloroquine-associated H<sup>+</sup> leak from the digestive vacuole in chloroquine-resistant malaria parasites. *J Cell Sci* **121**, 1624-32 (2008).
108. Fidock, D.A. *et al.* Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* **6**, 861-71 (2000).
109. Cooper, R.A. *et al.* Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in Plasmodium falciparum. *Mol Pharmacol* **61**, 35-42 (2002).
110. Martin, R.E. *et al.* Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science* **325**, 1680-2 (2009).
111. Ross, L.S. & Fidock, D.A. Elucidating Mechanisms of Drug-Resistant Plasmodium falciparum. *Cell Host Microbe* **26**, 35-47 (2019).
112. Shafik, S.H. *et al.* The natural function of the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Nat Commun* **11**, 3922 (2020).
113. Reed, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K. & Cowman, A.F. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum. *Nature* **403**, 906-9 (2000).
114. Valderramos, S.G. *et al.* Identification of a mutant PfCRT-mediated chloroquine tolerance phenotype in Plasmodium falciparum. *PLoS Pathog* **6**, e1000887 (2010).
115. Sidhu, A.B. *et al.* Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* **194**, 528-35 (2006).
116. Veiga, M.I. *et al.* Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate Plasmodium falciparum susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat Commun* **7**, 11553 (2016).
117. Rohrbach, P. *et al.* Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in Plasmodium falciparum. *EMBO J* **25**, 3000-11 (2006).
118. Jacobsen, L., Husen, P. & Solov'yov, I.A. Inhibition Mechanism of Antimalarial Drugs Targeting the Cytochrome bc(1) Complex. *J Chem Inf Model* **61**, 1334-1345 (2021).

119. Nixon, G.L. *et al.* Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother* **68**, 977-85 (2013).
120. Olszewska, A. & Szewczyk, A. Mitochondria as a pharmacological target: magnum overview. *IUBMB Life* **65**, 273-81 (2013).
121. Adam-Vizi, V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1140-9 (2005).
122. Crofts, A.R. *et al.* Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* **38**, 15807-26 (1999).
123. Husen, P. & Solov'yov, I.A. Mutations at the Q(o) Site of the Cytochrome bc(1) Complex Strongly Affect Oxygen Binding. *J Phys Chem B* **121**, 3308-3317 (2017).
124. Vaidya, A.B., Painter, H.J., Morrisey, J.M. & Mather, M.W. The validity of mitochondrial dehydrogenases as antimalarial drug targets. *Trends Parasitol* **24**, 8-9 (2008).
125. MacRae, J.I. *et al.* Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Biol* **11**, 67 (2013).
126. Gutteridge, W.E., Dave, D. & Richards, W.H. Conversion of dihydroorotate to orotate in parasitic protozoa. *Biochim Biophys Acta* **582**, 390-401 (1979).
127. Painter, H.J., Morrisey, J.M., Mather, M.W. & Vaidya, A.B. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* **446**, 88-91 (2007).
128. Painter, H.J. *et al.* Atypical Molecular Basis for Drug Resistance to Mitochondrial Function Inhibitors in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* **65**(2021).
129. Alharbi, Y. Atovaquone exerts its anticancer effect by inhibiting Na(+)/K(+)-ATPase ion transport in canine cancer cells. *Vet World* **16**, 1185-1192 (2023).
130. Kaasch, A.J. & Joiner, K.A. Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase. Identification of peroxisomes in an apicomplexan parasite. *J Biol Chem* **275**, 1112-8 (2000).
131. Henkle-Duhrsen, K. & Kampkotter, A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* **114**, 129-42 (2001).
132. McGonigle, S., Dalton, J.P. & James, E.R. Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitol Today* **14**, 139-45 (1998).
133. Kwok, L.Y., Schluter, D., Clayton, C. & Soldati, D. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Mol Microbiol* **51**, 47-61 (2004).
134. Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.S., Jeong, W. & Kim, K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* **52**, 35-41 (2001).
135. Diaz, A., Loewen, P.C., Fita, I. & Carpena, X. Thirty years of heme catalases structural biology. *Arch Biochem Biophys* **525**, 102-10 (2012).
136. Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E. & Obinger, C. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *J Inorg Biochem* **100**, 568-85 (2006).
137. Loewen, P. Probing the structure of catalase HPII of *Escherichia coli*--a review. *Gene* **179**, 39-44 (1996).
138. Ghiladi, R.A., Knudsen, G.M., Medzihradzky, K.F. & Ortiz de Montellano, P.R. The Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG): autocatalytic formation and effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties. *J Biol Chem* **280**, 22651-63 (2005).
139. Carpena, X. *et al.* Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7Å resolution. *J Mol Biol* **327**, 475-89 (2003).
140. Heck, D.E., Shakarjian, M., Kim, H.D., Laskin, J.D. & Vetrano, A.M. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci* **1203**, 120-5 (2010).
141. Glorieux, C. & Buc Calderon, P. Targeting catalase in cancer. *Redox Biol* **77**, 103404 (2024).
142. Sepasi Tehrani, H. & Moosavi-Movahedi, A.A. Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol* **140**, 5-12 (2018).
143. Ding, M., Clayton, C. & Soldati, D. *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in toxoplasma? *J Cell Sci* **113 ( Pt 13)**, 2409-19 (2000).

144. Odberg-Ferragut, C. *et al.* Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterisation of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **106**, 121-9 (2000).
145. Son, E.S., Song, K.J., Shin, J.C. & Nam, H.W. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* **39**, 133-41 (2001).
146. Rocha, E.R., Selby, T., Coleman, J.P. & Smith, C.J. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **178**, 6895-903 (1996).
147. Wysong, D.R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W. & Diamond, R.D. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* **66**, 1953-61 (1998).
148. Ramarao, N., Gray-Owen, S.D. & Meyer, T.F. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol Microbiol* **38**, 103-13 (2000).
149. Pollegioni, L. *et al.* Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. *J Mol Biol* **324**, 535-46 (2002).
150. Takahashi, S., Abe, K. & Kera, Y. Bacterial d-amino acid oxidases: Recent findings and future perspectives. *Bioengineered* **6**, 237-41 (2015).
151. Pollegioni, L. *et al.* Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 1-16 (2008).
152. Matlashov, M.E., Belousov, V.V. & Enikolopov, G. How much H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? *Antioxid Redox Signal* **20**, 1039-44 (2014).
153. Umhau, S. *et al.* The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12463-8 (2000).
154. Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M.S. & Molla, G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1373-94 (2007).
155. Pollegioni, L., Landkau, B., Tischer, W., Ghisla, S. & Pilone, M.S. Kinetic mechanism of D-amino acid oxidases from *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*. *J Biol Chem* **268**, 13850-7 (1993).
156. Porter, D.J., Voet, J.G. & Bright, H.J. Mechanistic features of the D-amino acid oxidase reaction studied by double stopped flow spectrophotometry. *J Biol Chem* **252**, 4464-73 (1977).
157. Haskew-Layton, R.E. *et al.* Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17385-90 (2010).
158. Pilone, M.S. D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1732-47 (2000).
159. Molla, G., Vegezzi, C., Pilone, M.S. & Pollegioni, L. Overexpression in *Escherichia coli* of a recombinant chimeric *Rhodotorula gracilis* d-amino acid oxidase. *Protein Expr Purif* **14**, 289-94 (1998).
160. Mattevi, A. *et al.* Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7496-501 (1996).
161. Mizutani, H. *et al.* Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution. *J Biochem* **120**, 14-7 (1996).
162. Rossmann, M.G., Moras, D. & Olsen, K.W. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-9 (1974).
163. Wierenga, R.K., Drenth, J. & Schulz, G.E. Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of p-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD- as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. *J Mol Biol* **167**, 725-39 (1983).
164. Schulz, G.E. Binding of nucleotides by proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **2**, 61-67 (1992).

165. Dym, O. & Eisenberg, D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* **10**, 1712-28 (2001).
166. Fraaije, M.W. & Mattevi, A. Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem Sci* **25**, 126-32 (2000).
167. Pollegioni, L. *et al.* Contribution of the dimeric state to the thermal stability of the flavoprotein D-amino acid oxidase. *Protein Sci* **12**, 1018-29 (2003).
168. Krebs, H.A. Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids. *Biochem J* **29**, 1620-44 (1935).
169. Pilone Simonetta, M., Pollegioni, L., Casalin, P., Curti, B. & Ronchi, S. Properties of D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Eur J Biochem* **180**, 199-204 (1989).
170. Todone, F. *et al.* Active site plasticity in D-amino acid oxidase: a crystallographic analysis. *Biochemistry* **36**, 5853-60 (1997).
171. Molla, G. *et al.* Role of arginine 285 in the active site of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. A site-directed mutagenesis study. *J Biol Chem* **275**, 24715-21 (2000).
172. 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. *J Biol Chem* **274**, 36233-40 (1999).
173. Johansson, C., Lillig, C.H. & Holmgren, A. Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **279**, 7537-43 (2004).
174. Liedgens, L. *et al.* Quantitative assessment of the determinant structural differences between redox-active and inactive glutaredoxins. *Nat Commun* **11**, 1725 (2020).
175. Martin, J.L. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245-50 (1995).
176. Hofmann, B., Hecht, H.J. & Flohe, L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* **383**, 347-64 (2002).
177. Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J. & Poole, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**, 32-40 (2003).
178. Deponte, M., Becker, K. & Rahlfs, S. Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins. *Biol Chem* **386**, 33-40 (2005).
179. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3217-66 (2013).
180. Mieyal, J.J., Gallogly, M.M., Qanungo, S., Sabens, E.A. & Shelton, M.D. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1941-88 (2008).
181. Holmgren, A. Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **254**, 3664-71 (1979).
182. Herrero, E. & de la Torre-Ruiz, M.A. Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1518-30 (2007).
183. Outten, C.E. & Albetel, A.N. Iron sensing and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing out the mechanistic details. *Curr Opin Microbiol* **16**, 662-8 (2013).
184. Couturier, J., Przybyla-Toscano, J., Roret, T., Didierjean, C. & Rouhier, N. The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions? *Biochim Biophys Acta* **1853**, 1513-27 (2015).
185. Lillig, C.H., Berndt, C. & Holmgren, A. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1304-17 (2008).
186. Eckers, E., Bien, M., Stroobant, V., Herrmann, J.M. & Deponte, M. Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: the catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry* **48**, 1410-23 (2009).
187. Trnka, D. *et al.* Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins. *Nat Commun* **11**, 3445 (2020).
188. Deponte, M. *et al.* Wherever I may roam: protein and membrane trafficking in *P. falciparum*-infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol* **186**, 95-116 (2012).
189. Mesecke, N., Spang, A., Deponte, M. & Herrmann, J.M. A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol Biol Cell* **19**, 2673-80 (2008).

190. Luo, M. *et al.* Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. *J Mol Biol* **398**, 614-22 (2010).
191. Lillig, C.H. *et al.* Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8168-73 (2005).
192. Begas, P., Liedgens, L., Moseler, A., Meyer, A.J. & Deponte, M. Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites. *Nat Commun* **8**, 14835 (2017).
193. Fladvad, M. *et al.* Molecular mapping of functionalities in the solution structure of reduced Grx4, a monothiol glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 24553-61 (2005).
194. Iwema, T. *et al.* Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry* **48**, 6041-3 (2009).
195. Ye, H. *et al.* Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J Clin Invest* **120**, 1749-61 (2010).
196. Rodriguez-Manzaneque, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. & Herrero, E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**, 1109-21 (2002).
197. Zinskie, J.A. *et al.* Iron-dependent cleavage of ribosomal RNA during oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **293**, 14237-14248 (2018).
198. Daniel, T., Faruq, H.M., Laura Magdalena, J., Manuela, G. & Christopher Horst, L. Role of GSH and Iron-Sulfur Glutaredoxins in Iron Metabolism-Review. *Molecules* **25**(2020).
199. Kim, K.D., Chung, W.H., Kim, H.J., Lee, K.C. & Roe, J.H. Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 467-72 (2010).
200. Muhlenhoff, U. *et al.* Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* **12**, 373-385 (2010).
201. Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A. & de la Torre-Ruiz, M.A. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **119**, 4554-64 (2006).
202. Harwaldt, P., Rahlfs, S. & Becker, K. Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. *Biol Chem* **383**, 821-30 (2002).
203. Nickel, C., Rahlfs, S., Deponte, M., Koncarevic, S. & Becker, K. Thioredoxin networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1227-39 (2006).
204. Sturm, N. *et al.* Identification of proteins targeted by the thioredoxin superfamily in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* **5**, e1000383 (2009).
205. Rahlfs, S. & Becker, K. Thioredoxin peroxidases of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* **268**, 1404-9 (2001).
206. Kehr, S., Sturm, N., Rahlfs, S., Przyborski, J.M. & Becker, K. Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLoS Pathog* **6**, e1001242 (2010).
207. Banning, C. *et al.* A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS One* **5**, e9344 (2010).
208. Sultana, A. & Lee, J.E. Measuring protein-protein and protein-nucleic Acid interactions by biolayer interferometry. *Curr Protoc Protein Sci* **79**, 19 25 1-19 25 26 (2015).
209. Michnick, S.W., Remy, I., Campbell-Valois, F.X., Vallee-Belisle, A. & Pelletier, J.N. *Detection of protein-protein interactions by protein fragment complementation strategies*, 208-30 (2000).
210. Remy, I., Campbell-Valois, F.X. & Michnick, S.W. Detection of protein-protein interactions using a simple survival protein-fragment complementation assay based on the enzyme dihydrofolate reductase. *Nat Protoc* **2**, 2120-5 (2007).
211. Morell, M., Ventura, S. & Aviles, F.X. Protein complementation assays: approaches for the in vivo analysis of protein interactions. *FEBS Lett* **583**, 1684-91 (2009).
212. Taniuchi, H. & Anfinsen, C.B. Simultaneous formation of two alternative enzymology active structures by complementation of two overlapping fragments of staphylococcal nuclease. *J Biol Chem* **246**, 2291-301 (1971).

213. Ladurner, A.G., Itzhaki, L.S., de Prat Gay, G. & Fersht, A.R. Complementation of peptide fragments of the single domain protein chymotrypsin inhibitor 2. *J Mol Biol* **273**, 317-29 (1997).
214. Villalobos, V., Naik, S. & Piwnica-Worms, D. Current state of imaging protein-protein interactions in vivo with genetically encoded reporters. *Annu Rev Biomed Eng* **9**, 321-49 (2007).
215. Pelletier, J.N., Campbell-Valois, F.X. & Michnick, S.W. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12141-6 (1998).
216. Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L.E. & Michnick, S.W. Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions. *Nat Biotechnol* **20**, 619-22 (2002).
217. Hu, C.-D. & Kerppola, T.K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology* **21**, 539-545 (2003).
218. Kerppola, T.K. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 449-56 (2006).
219. Paulmurugan, R., Umezawa, Y. & Gambhir, S.S. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15608-13 (2002).
220. Schweitzer, B.I., Dicker, A.P. & Bertino, J.R. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J* **4**, 2441-52 (1990).
221. Goodsell, D.S. The molecular perspective: methotrexate. *Stem Cells* **17**, 314-5 (1999).
222. Hawser, S., Lociuro, S. & Islam, K. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. *Biochem Pharmacol* **71**, 941-8 (2006).
223. Remy, I. & Michnick, S.W. Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5394-9 (1999).
224. Levray, Y.S., Berhe, A.D. & Osborne, A.R. Use of split-dihydrofolate reductase for the detection of protein-protein interactions and simultaneous selection of multiple plasmids in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **238**, 111292 (2020).
225. Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 655-67 (2010).
226. Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**, 314-8 (2006).
227. Neupert, W. & Herrmann, J.M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 723-49 (2007).
228. Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628-44 (2009).
229. Endo, T. & Yamano, K. Multiple pathways for mitochondrial protein traffic. *Biol Chem* **390**, 723-30 (2009).
230. Eckers, E., Cyrklaff, M., Simpson, L. & Deponte, M. Mitochondrial protein import pathways are functionally conserved among eukaryotes despite compositional diversity of the import machineries. *Biol Chem* **393**, 513-24 (2012).
231. Palmer, C.S., Anderson, A.J. & Stojanovski, D. Mitochondrial protein import dysfunction: mitochondrial disease, neurodegenerative disease and cancer. *FEBS Lett* **595**, 1107-1131 (2021).
232. Adl, S.M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 399-451 (2005).
233. Cavalier-Smith, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett* **6**, 342-5 (2010).
234. Lithgow, T. & Schneider, A. Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 799-817 (2010).
235. Deponte, M. *Mitochondrial Protein Import in Malaria Parasites*, (Springer Science+Business Media New York, 2013).

236. Dudek, J., Rehling, P. & van der Laan, M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 274-85 (2013).
237. Bender, A., van Dooren, G.G., Ralph, S.A., McFadden, G.I. & Schneider, G. Properties and prediction of mitochondrial transit peptides from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **132**, 59-66 (2003).
238. Rehling, P. *et al.* Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* **299**, 1747-51 (2003).
239. Webb, C.T., Gorman, M.A., Lazarou, M., Ryan, M.T. & Gulbis, J.M. Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell* **21**, 123-33 (2006).
240. Koehler, C.M. New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 309-35 (2004).
241. Wiedemann, N. & Pfanner, N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem* **86**, 685-714 (2017).
242. Wiedemann, N. *et al.* Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* **424**, 565-71 (2003).
243. Kozjak, V. *et al.* An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **278**, 48520-3 (2003).
244. Paschen, S.A. *et al.* Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862-6 (2003).
245. Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. & Lithgow, T. The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* **164**, 19-24 (2004).
246. Deponte, M. & Hell, K. Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria. *J Biochem* **146**, 599-608 (2009).
247. Sideris, D.P. & Tokatlidis, K. Oxidative protein folding in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxid Redox Signal* **13**, 1189-204 (2010).
248. Jensen, R.E. & Dunn, C.D. Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 25-34 (2002).
249. Koehler, C.M. *et al.* Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* **279**, 369-73 (1998).
250. Koehler, C.M. *et al.* Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J* **17**, 6477-86 (1998).
251. Adam, A. *et al.* Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J* **18**, 313-9 (1999).
252. Davis, A.J., Alder, N.N., Jensen, R.E. & Johnson, A.E. The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell* **18**, 475-86 (2007).
253. Allen, S., Lu, H., Thornton, D. & Tokatlidis, K. Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem* **278**, 38505-13 (2003).
254. Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. & Koehler, C.M. The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J* **21**, 942-53 (2002).
255. Curran, S.P., Leuenberger, D., Schmidt, E. & Koehler, C.M. The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol* **158**, 1017-27 (2002).
256. Luciano, P. *et al.* Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex. *EMBO J* **20**, 4099-106 (2001).
257. Trager, W. & Jensen, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673-5 (1976).
258. Lambros, C. & Vanderberg, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65**, 418-20 (1979).

259. Deitsch, K., Driskill, C. & Wellems, T. Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res* **29**, 850-3 (2001).
260. Hasenkamp, S., Russell, K.T. & Horrocks, P. Comparison of the absolute and relative efficiencies of electroporation-based transfection protocols for *Plasmodium falciparum*. *Malar J* **11**, 210 (2012).
261. Barrand, M.A. *et al.* Glutathione export from human erythrocytes and *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Biochem J* **448**, 389-400 (2012).
262. Stein, K.T., Moon, S.J. & Sikes, H.D. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation Using a Tunable Chemogenetic Tool To Perturb Redox Homeostasis in Human Cells and Induce Cell Death. *ACS Synth Biol* **7**, 2037-2044 (2018).
263. Kuhn, Y., Rohrbach, P. & Lanzer, M. Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin. *Cell Microbiol* **9**, 1004-13 (2007).
264. Gutscher, M. *et al.* Proximity-based protein thiol oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging peroxidases. *J Biol Chem* **284**, 31532-40 (2009).
265. Collins, J.A., Irnov, I., Baker, S. & Winkler, W.C. Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme. *Genes Dev* **21**, 3356-68 (2007).
266. Prommana, P. *et al.* Inducible knockdown of *Plasmodium* gene expression using the glmS ribozyme. *PLoS One* **8**, e73783 (2013).
267. Epp, C., Raskolnikov, D. & Deitsch, K.W. A regulatable transgene expression system for cultured *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar J* **7**, 86 (2008).
268. Bischoff, E. Kritische Analyse der Eignung von Dimedon zur Sulfensäuredetektion und der Relevanz von Wasserstoffperoxid für die Wirkung von Antimalariamitteln, RPTU Kaiserslautern (2024).
269. Bus, J.S. & Gibson, J.E. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* **55**, 37-46 (1984).
270. Farber, P.M., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Becker, K. & Schirmer, R.H. Recombinant *Plasmodium falciparum* glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Lett* **422**, 311-4 (1998).
271. Kelner, M.J. & Alexander, N.M. Methylene-Blue Directly Oxidizes Glutathione without the Intermediate Formation of Hydrogen-Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 5168-5171 (1985).
272. Muller, O., Lu, G., Jahn, A. & Mockenhaupt, F.P. How worthwhile is methylene blue as a treatment of malaria? *Expert Rev Anti Infect Ther* **17**, 471-473 (2019).
273. Przyborski, J.M. *et al.* Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *EMBO J* **24**, 2306-17 (2005).
274. Kumar, A. *et al.* Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as gamma-glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep* **13**, 1095-101 (2012).
275. Zuckerman, A., Spira, D. & Hamburger, J. A procedure for the harvesting of mammalian plasmodia. *Bull World Health Organ* **37**, 431-6 (1967).
276. Husemann, B. Etablierung des Split-DHFR Systems zur Untersuchung mitochondrialer Protein-Protein Interaktionen in *Plasmodium falciparum*, TU Kaiserslautern (2021).
277. Rahbari, M. *et al.* Hydrogen peroxide dynamics in subcellular compartments of malaria parasites using genetically encoded redox probes. *Sci Rep* **7**, 10449 (2017).
278. Sedlak, E. & Musatov, A. Inner mechanism of protection of mitochondrial electron-transfer proteins against oxidative damage. Focus on hydrogen peroxide decomposition. *Biochimie* **142**, 152-157 (2017).
279. Bihlmaier, K., Mesecke, N., Kloeppe, C. & Herrmann, J.M. The disulfide relay of the intermembrane space of mitochondria: an oxygen-sensing system? *Ann N Y Acad Sci* **1147**, 293-302 (2008).
280. Tiwari, S., Sharma, N., Sharma, G.P. & Mishra, N. Redox interactome in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* **120**, 423-434 (2021).

281. Sienkiewicz, N. *et al.* Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **137**, 121-32 (2004).
282. Patterson, H.C. *et al.* A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5679-88 (2015).
283. Hetz, C., Zhang, K. & Kaufman, R.J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 421-438 (2020).
284. Gallo, V. *et al.* Inherited glutathione reductase deficiency and *Plasmodium falciparum* malaria—a case study. *PLoS One* **4**, e7303 (2009).
285. Jang, H.H. *et al.* Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**, 625-35 (2004).
286. Reiter, C. *et al.* Highly potent artemisinin-derived dimers and trimers: Synthesis and evaluation of their antimalarial, antileukemia and antiviral activities. *Bioorg Med Chem* **23**, 5452-8 (2015).
287. Gould, S.B., Waller, R.F. & McFadden, G.I. Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 491-517 (2008).
288. Moore, R.B. *et al.* A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* **451**, 959-63 (2008).
289. Janouskovec, J., Horak, A., Obornik, M., Lukes, J. & Keeling, P.J. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10949-54 (2010).
290. Porrás-Domínguez, 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 Environ* **47**, 1503-1512 (2024).
291. Okada, M. *et al.* Critical role for isoprenoids in apicoplast biogenesis by malaria parasites. *Elife* **11**(2022).
292. Agarwal, P., Anvikar, A.R., Pillai, C.R. & Srivastava, K. In vitro susceptibility of Indian *Plasmodium falciparum* isolates to different antimalarial drugs & antibiotics. *Indian J Med Res* **146**, 622-628 (2017).
293. van Schalkwyk, D.A., Saliba, K.J., Biagini, G.A., Bray, P.G. & Kirk, K. Loss of pH control in *Plasmodium falciparum* parasites subjected to oxidative stress. *PLoS One* **8**, e58933 (2013).
294. Chen, Y., Miller, C.J. & Waite, T.D. pH Dependence of Hydroxyl Radical, Ferryl, and/or Ferric Peroxo Species Generation in the Heterogeneous Fenton Process. *Environ Sci Technol* **56**, 1278-1288 (2022).
295. Zhao, Z. Hydroxyl radical generations form the physiologically relevant Fenton-like reactions. *Free Radic Biol Med* **208**, 510-515 (2023).
296. Calabrese, G., Morgan, B. & Riemer, J. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxid Redox Signal* **27**, 1162-1177 (2017).
297. Toenhake, C.G. *et al.* Chromatin Accessibility-Based Characterization of the Gene Regulatory Network Underlying *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Development. *Cell Host Microbe* **23**, 557-569 e9 (2018).