

**Polyamine in *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897):
Einfluss von Inhibitoren der Syntheseeenzyme auf
Polyamingehalt und Wachstum**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Robin Das Gupta
aus
Hannover

Hamburg 2005

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. D. WALTER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. S. MÜLLER
Tag der Disputation: 03. Februar 2006

Hamburg, den 19. Januar 2006



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Malaria	1
1.2	<i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.2.1	Systematische Stellung von <i>P. falciparum</i>	2
1.2.2	Entwicklungszyklus von <i>P. falciparum</i>	3
1.2.3	Klinisches Bild der Malaria	6
1.2.4	Bekämpfung der Malaria	7
1.2.5	Medikamente gegen Malaria	8
1.3	Polyamine	10
1.3.1	Funktion der Polyamine	11
1.4	Polyaminstoffwechsel	14
1.4.1	Biosynthese von Polyaminen in Säugetieren	14
1.4.2	Interkonversion von Polyaminen	16
1.4.3	Transport von Polyaminen	17
1.4.4	Regulation des Polyaminstoffwechsels bei Säugetieren	18
1.4.4.1	ODC	19
1.4.4.1.1	Inhibitoren der ODC	20
1.4.4.2	AdoMet-Synthetase	22
1.4.4.2.1	Inhibitoren der AdoMet-Synthetase	23
1.4.4.3	AdoMetDC	24
1.4.4.3.1	Inhibitoren der AdoMetDC	25
1.4.5	Polyaminstoffwechsel von <i>P. falciparum</i>	27
1.5	Zielsetzung	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Chemikalien und Bioreagenzien	33
2.2	Puffer und Stammlösungen	35
2.3	Vektoren und Bakterienstämme	37
2.3.1	Vektoren	37
2.3.2	Bakterienstämme	37
2.4	Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	37
2.4.1	Herstellung des RPMI 1640-Mediums	37
2.4.2	Kulturführung	38
2.4.3	Synchronisation von <i>P. falciparum</i> mit Sorbitol	38
2.4.4	Trennung der Parasitenstadien mittels eines diskontinuierlichen Percoll-L-Alanin-Gradienten	39
2.4.5	Isolierung der Parasiten durch Verwendung von Streptolysin O	40
2.4.6	Isolierung der Parasiten durch Saponinlyse	41

2.5	Automatische Bestimmung der Zellzahl.....	42
2.6	Markierung der Polyamine durch Dansylierung der Aminogruppen	42
2.7	Dansylierung der Polyaminstandards	43
2.8	Bestimmung der Polyaminkonzentrationen mittels reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	43
2.9	Bestimmung der AdoMet- und Methylthioadenosin (MTA)-Konzentrationen mittels HPLC	45
2.10	Bestimmung der Polyaminkonzentrationen nach Behandlung mit Inhibitoren der ODC und der AdoMetDC.....	46
2.11	IC ₅₀ -Bestimmungen.....	46
2.12	Präparation genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i>	46
2.13	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	47
2.14	Midi- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA	47
2.15	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	48
2.16	Enzymatische DNA-Restriktion	48
2.17	DNA-Auftrennung über Agarosegel-Elektrophorese.....	49
2.18	Elution und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	49
2.19	Aufreinigung von DNA über DNA-Affinitätssäulen	49
2.20	DNA-Sequenzierungen	49
2.21	Radioaktive Markierung von DNA.....	50
2.22	Transfer von DNA (Southern Blot)	50
2.23	Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierter DNA.....	51
2.24	Herstellung kompetenter Zellen	52
2.25	Transformation	52
2.26	Expression und Aufreinigung der rekombinanten AdoMetDC/ODC	53
2.27	Klonierung der rekombinanten AdoMet-Synthetase	53
2.28	Expression und Aufreinigung der rekombinanten AdoMet-Synthetase	54
2.29	Dialyse.....	55
2.30	Mutation der Bindungsstellen für Methionin und Mg ²⁺	55
2.31	Gelfiltration	57
2.32	Proteinbestimmung	57
2.33	SDS-Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese	57
2.34	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	58
2.35	Aktivitätsbestimmungen der AdoMetDC/ODC und der AdoMet-Synthetase	59
2.35.1	ODC-Aktivitätstest	59
2.35.2	AdoMetDC-Aktivitätstest	59
2.35.3	Bestimmung der K _m -Werte für die ODC und die AdoMetDC	60
2.35.4	Bestimmung der K _i -Werte für die ODC-Inhibitoren	60
2.35.5	Bestimmung der K _i -Werte für die AdoMetDC-Inhibitoren.....	60
2.35.6	AdoMet-Synthetase-Aktivitätstest	61
2.35.7	Bestimmung der Abhängigkeit der AdoMet-Synthetase von KCl.....	61

2.35.8	Bestimmung des pH-Optimums der AdoMet-Synthetase	62
2.35.9	Auswertung der Ergebnisse der Enzymtests	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	Bestimmung der Polyaminkonzentrationen während des erythrozytären Zyklus von <i>P. falciparum</i>	63
3.2	Bestimmung der Polyaminverteilung in den Kompartimenten infizierter Erythrozyten	64
3.3	Effekt von APA-Derivaten und bis(Guanosylhydrazon)-Derivaten auf die AdoMetDC/ODC von <i>P. falciparum</i>	64
3.4	Effekt von ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren auf <i>P. falciparum</i> in Kultur	71
3.5	Einfluss von Inhibitoren der Polyamin-Synthese auf das Polyaminmuster von <i>P. falciparum</i> in Kultur	74
3.6	Klonierung und Expression der rekombinanten AdoMet-Synthetase von <i>P. falciparum</i>	77
3.6.1	Bestimmung des pH-Optimums der AdoMet-Synthetase.....	79
3.6.2	Abhängigkeit der AdoMet-Synthetase von KCl	80
3.6.2.1	Bestimmung des K_m -Wertes der AdoMet-Synthetase für Methionin	80
3.6.2.2	Bestimmung des K_m -Wertes der AdoMet-Synthetase für ATP	81
3.7	Einfluss des AdoMet-Synthetase-Inhibitors Selenomethionin und des AdoMetDC-Inhibitors CGP 40215A auf die Enzymaktivität der <i>PfAdoMet</i> -Synthetase	82
3.7.1	Bestimmung der IC_{50} -Werte für Selenomethionin und CGP 40215A.....	82
3.7.2	Bestimmung des K_i -Werts für Selenomethionin	83
3.8	Mutation konservierter Aminosäurereste der AdoMet-Synthetase in <i>P. falciparum</i>	83
3.8.1	Die Mutanten $D^{127}N$ und $D^{238}N$	85
3.8.2	Die Mutanten $D^{24}N$ und $D^{271}N$	86
3.8.3	Die Mutante $E^{50}Q$	86
3.9	Effekt der <i>PfAdoMet</i> -Synthetase-Inhibitoren Selenomethionin und Cycloleucin auf <i>P. falciparum</i> in Kultur.....	87
3.10	Polyaminmuster von <i>P. falciparum</i> in Kultur nach Behandlung mit Selenomethionin	88
3.11	Konzentrationen von AdoMet in <i>P. falciparum</i> in Kultur nach Behandlung mit Selenomethionin.....	88
3.12	Konzentrationen von AdoMet/MTA in <i>P. falciparum</i> in Kultur nach Behandlung mit CGP 40215A	89
4	DISKUSSION.....	90
4.1	AdoMet-Synthetase.....	90
4.2	Analyse der biochemischen Eigenschaften der AdoMet-Synthetase	91
4.3	Effekt der AdoMet-Synthetase-Inhibitoren Selenomethionin und Cycloleucin	95
4.4	Mutation konservierter Aminosäurereste der AdoMet-Synthetase in <i>P. falciparum</i>	98
4.5	Bestimmung der Polyaminkonzentrationen während des erythrozytären Zyklus von <i>P. falciparum</i>	102
4.6	Effekt von ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren	104
4.6.1	Effekt der ODC-Inhibitoren auf Enzymaktivität, Wachstumsrate und Polyaminlevel	104

4.6.2	Effekt der AdoMetDC-Inhibitoren auf die Enzymaktivität, Wachstumsrate und Polyaminlevel.....	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	119

ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine Serum Albumine
cDNA	copy DNA
Da	Dalton
DFMO	Difluoromethylornithin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHFR-TS	Dihydrofolat Reduktase-Thymidylat Synthase
DTT	Dithiothreitol
EBBS	Earle's balanced buffer solution
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die zu einer 50%igen Wachstumshemmung führt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K _i	Inhibitorkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MG	Molekulargewicht
MGBG	Methylglyoxal bis(guanylhydrazon)
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTA	Methylthioadenosin

mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N	Normal
nCi	Nanocurie
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Put	Putrescin
rpm	Rotationen pro Minute
RBC	Erythrozyt
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SAMDC	S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylaidgel
SLO	Streptolysin O
Spd	Spermidin
Spm	Spermin
SSAT	Spermidin/Spermin- <i>N</i> ¹ -Acetyltransferase
SSC	Standard Saline-Citrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRBC	Trophozoiteninfizierter Erythrozyt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ÜN	Über Nacht
v	Volumen
V	Volt
WHO	World Health Organisation
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid

1 EINLEITUNG

1.1 Malaria

Die durch den parasitischen Protozoen der Gattung *Plasmodium* hervorgerufene Malaria ist eine der am weitesten verbreiteten Infektionserkrankungen und stellt mit jährlich 500 Millionen erkrankten Menschen die bedeutendste humanpathogene Parasitenerkrankung dar. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge sterben jedes Jahr zwischen 1,4 und 2,6 Millionen Menschen an dieser Krankheit, wobei vor allem Kinder im Alter bis zu fünf Jahren betroffen sind. Somit gehört Malaria - zusammen mit AIDS und Tuberkulose - zu den Krankheiten mit den weltweit meisten Todesfällen (White, 1996; Butler 1997). Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung lebt in Gebieten, in denen diese Krankheit endemisch vorkommt, wobei besonders die Regionen der Tropen und Subtropen betroffen sind (Abb. 1). Mehr als 90% der Krankheits- und Todesfälle an Malaria treten in Afrika auf. Ausgedehnte Malariagebiete gibt es des Weiteren in Brasilien und den angrenzenden Ländern Südamerikas, seltener in Mittelamerika sowie in Haiti und den benachbarten Gebieten der Dominikanischen Republik in der ansonsten malariefreien Karibik. Im vorderen Orient findet sich die Malaria nur vereinzelt; Malariagebiete erstrecken sich aber von Pakistan über China und Südostasien bis in den pazifischen Raum hinein (WHO 2004; www.who.int/en/). Gegenüber den weltweit hohen Malariazahlen nehmen sich die etwa 1000 Fälle, die jährlich in Deutschland gemeldet werden, gering aus (WHO 2002).

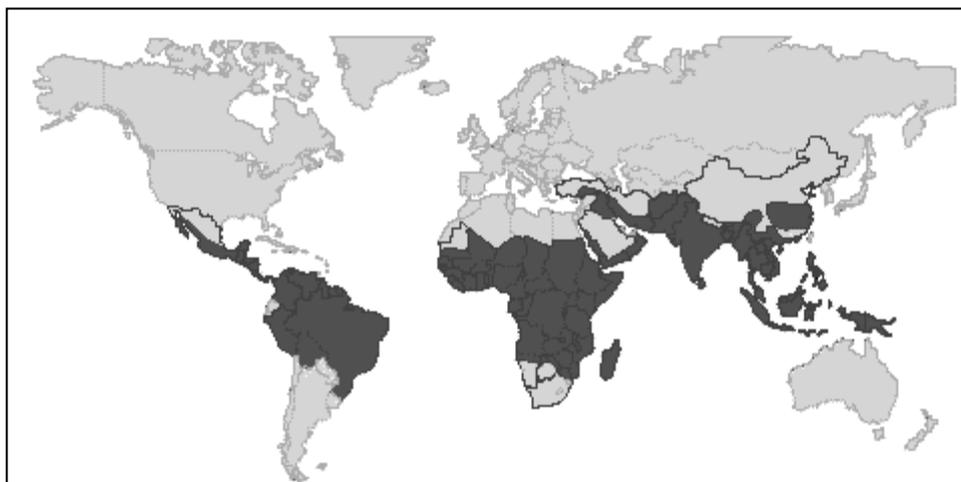


Abb. 1: Verbreitung der Malaria (Quelle: WHO, "World Resources 1998-1999")

1.2 *Plasmodium falciparum*

1.2.1 Systematische Stellung von *P. falciparum*

P. falciparum gehört zum Unterreich der Protozoen (Einzeller). Dieser Begriff umfasst keine natürliche Gruppe, sondern stellt eine willkürlich aus der Vielfalt der einzelligen Eukaryoten herausgehobene Ansammlung von Einzellern dar, die sich heterotroph ernähren. In dem Unterstamm der Apicomplexa, dem auch *P. falciparum* zugerechnet wird, sind ausschließlich Endoparasiten vertreten; neben *P. falciparum* werden den Apicomplexa unter anderem auch *Toxoplasma gondii*, als Erreger der Toxoplasmose ein bedeutender Parasit von Mensch und Wirbeltieren, sowie *Eimeria tenella*, Verursacher einer letalen Darminfektion bei Hühnervögeln, zugerechnet. Der Begriff „Apikomplexa“ leitet sich von dem Vorhandensein eines apikal liegenden Invasionskomplexes ab, der aus Rhoptrien, Mikronemen, Conoid, Dense granules und weiteren verschiedenen Organellen besteht.

Ihrem Entwicklungszyklus liegt ein haplo-homophasischer Generationswechsel mit ungeschlechtlicher Schizogonie, geschlechtlicher Gamogonie und ungeschlechtlicher Sporogonie zugrunde. In diesem Entwicklungszyklus stellt die Zygote das einzige diploide Stadium dar; der Generationswechsel ist an einen Wirtswechsel gebunden. Die weitere systematische Einteilung von *P. falciparum* ergibt sich aus der Zugehörigkeit zur Familie der Plasmodiidae und der Gattung Plasmodium. Etwa 160 Arten sind beschrieben worden, von denen vier humanpathogen sind, nämlich neben *P. falciparum* als Erreger der Malaria tropica noch *P. vivax* (Malaria tertiana), *P. ovale* (Malaria tertiana) und *P. malariae* (Malaria quartana) (Lucius und Loos-Frank, 1997). *P. vivax* verursacht etwa 40% aller Malariafälle, *P. falciparum* ist für weitere 50% und auch den größten Teil der Todesfälle verantwortlich.

Stamm:	Alveolata
Unterstamm:	Apikomplexa
Klasse:	Haematozoa (Aconoidasida)
Ordnung:	Haemosporida
Familie:	Plasmodiidae

Abb. 2: Systematische Einordnung der Gattung *Plasmodium* (Westheide und Rieger, 1996).

1.2.2 **Entwicklungszyklus von *P. falciparum***

Der Entwicklungszyklus von *P. falciparum* verläuft als sexueller Prozess in der Mücke der Gattung *Anopheles*, die asexuellen Vermehrungsschritte erfolgen im Menschen (Abb. 3). Mit dem Stich einer weiblichen Mücke werden die infektiösen Stadien der Plasmodien, die Sporozoiten, in die Kapillaren des Menschen übertragen. Pro Blutmahlzeit gelangen 8-15, in einigen Fällen bis zu 100 Sporozoiten in den Kreislauf des Wirtes. Die Sporozoiten sind 10-15 µm lang und haben eine schlanke, langgestreckte Erscheinungsform. Ihr Weitertransport erfolgt über das Blut oder die Lymphe. Nach etwa 45 Minuten müssen die Sporozoiten die Leberparenchymzellen erreicht haben, um nicht vom Immunsystem des Wirtes aus dem Kreislauf entfernt zu werden. Nach der Invasion der Parenchymzellen sind die Sporozoiten in einer sogenannten parasitophoren Vakuole eingeschlossen. Sie runden sich nach dem Eindringen in die Leberzellen zu etwa 3 µm großen Formen ab, wachsen zu einkernigen Trophozoiten heran, durchlaufen eine Vielzahl von Mitosen und bilden so vielkernige 30-70 µm großen Leberschizonten (präerythrozytäres Stadium). Diese Schizonten können bei *P. vivax* und *P. ovale* als Hypnozoiten Monate bis Jahre in ihrer Entwicklung ruhen und erst dann in die Vermehrungsphase eintreten. Der reife Schizont zerfällt zu Merozoiten, wobei pro Schizont 10000-30000 ca. 1 µm große Merozoiten gebildet werden können. Die Merozoiten gelangen ins Blut und heften sich über spezifische Rezeptoren an Erythrozyten, dringen in diese ein und werden dort wiederum in eine parasitophore Vakuole eingeschlossen. Nach der Invasion der Erythrozyten durch die Merozoiten besteht der Parasit zunächst aus einer Plasmablaste mit zentraler Nahrungsvakuole und einem randständigen Kern. Dem mikroskopischen Eindruck Giemsa-gefärbter Präparate entsprechend wird dieses Stadium als Ringstadium bezeichnet. (Abb. 4). Während der erythrozytären Schizogonie entwickeln sie sich über diese einkernige Ringform (0-16 h post infection (p.i.)) und einen einkernigen, runden oder bandförmigen amöboiden Trophozoiten (16-32 h p.i.) zum mehrkernigen, reifen Schizonten (32-48 h p.i.). Er ist im Regelfall 8- bis 16-kernig. Nach dem Platzen des Schizonten werden neue Merozoiten frei, die erneut Erythrozyten befallen. In den Nahrungsvakuolen der Parasiten bleibt als unlösliches Abbauprodukt des Hämoglobins das Malariapigment Hämozoin zurück, ein mit Proteinen assoziiertes Polymer des Häms.

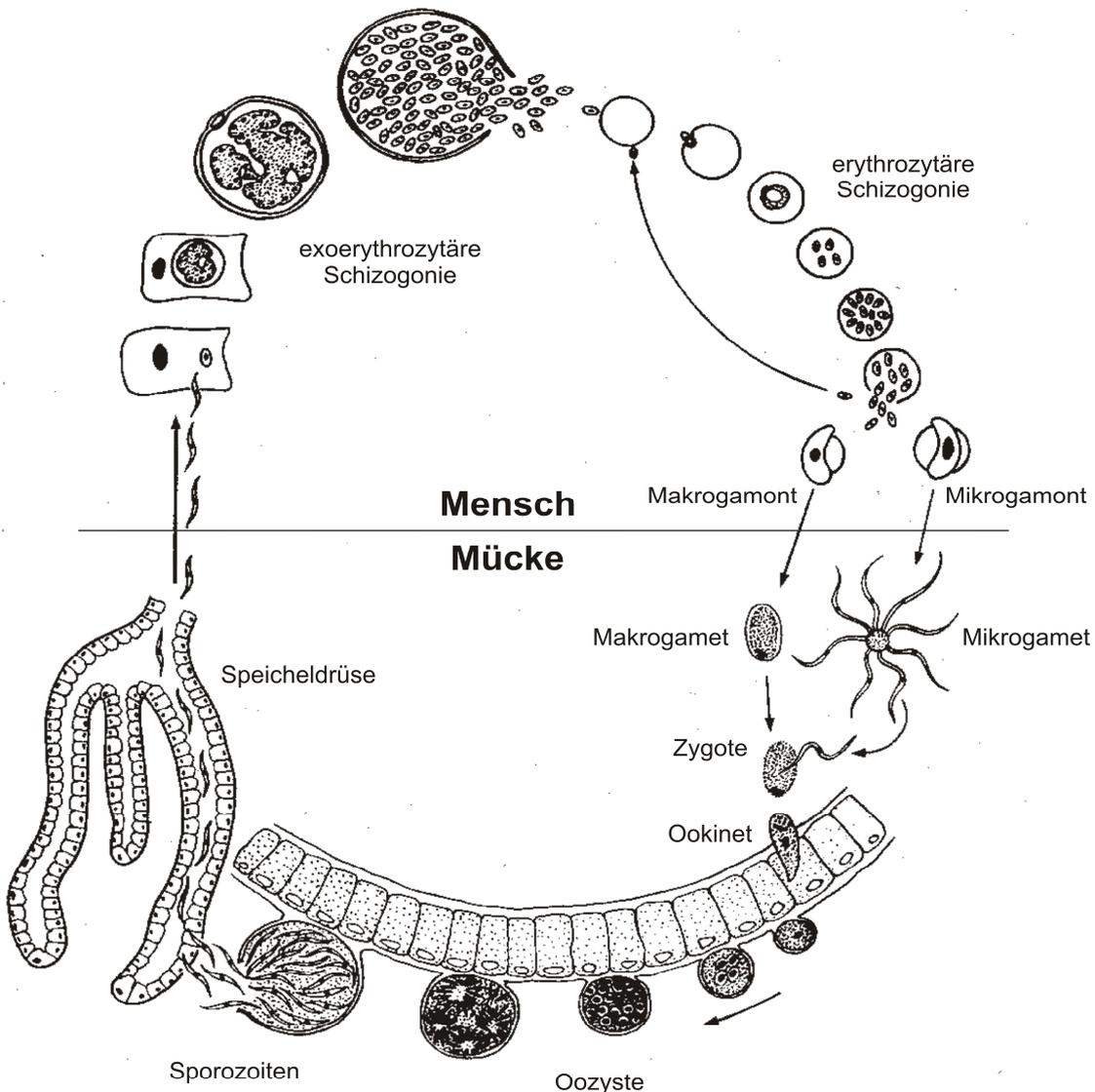


Abb. 3: Lebenszyklus von *P. falciparum*. Nach Übertragung der infektiösen Sporozoiten erfolgt in den humanen Leberparenchymzellen die exoerythrozytäre Schizogonie. Merozoiten gelangen ins Blut, dringen in Erythrozyten ein und durchlaufen dort die erythrozytäre Schizogonie. Nach einigen Zyklen differenzieren sich Mikro- und Makrogametozyten, die von *Anopheles* aufgenommen werden. Im Mückendarm entwickeln sich die Gametozyten zu Mikro- und Makrogameten, die sich zu einer Zygote vereinigen. Als Ookinete durchwandert sie die Darmzellen und entwickelt sich an der Außenseite zwischen Basallamina und Zellwand zur Oozyste. Nach der Sporogonie werden mit dem Platzen der Oozyste Sporozoiten frei, die über die Hämolymphe zur Speicheldrüse wandern. Dort sammeln sie sich in Sekretvakuolen und können bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke wieder übertragen werden (nach Vickerman und Cox, 1967).

Nach mehreren Tagen oder Wochen differenzieren sich einige Merozoiten zu Mikro- und Makrogametozyten, die von *Anopheles* während der Blutmahlzeit aufgenommen werden. Diese Gametozyten sind bei *P. falciparum* halbmondförmig, haben bei den meisten anderen Arten jedoch eine runde Gestalt. Im Mückendarm entwickeln sich die Gametozyten zu Mikro- und Makrogameten. Während hierbei nur je ein Makrogamet entsteht, bildet ein Mikrogametozyt durch die sogenannte Exflagellation bis zu 8 begeißelte Mikrogameten. Die Mikro- und Makrogameten vereinigen sich im Magen der Mücke zu einer eiförmigen motilen Zygote (Ookinete) mit einer Länge von 18-24 μm . Der Ookinete durchwandert die Darmzellen und entwickelt sich an der Außenseite zwischen Basallamina und Zellwand zur Oozyste. Die Oozysten schließlich wachsen bis zu einer Größe von 80 μm heran und sind von einer dünnen Schicht fibrillären Materials umgeben. Im Anschluss erfolgt die Sporogonie; nach einer Meiose und aufeinanderfolgenden Mitosen entstehen etwa 1000 Sporozoiten. Anschließend folgt die Differenzierung der Sporozoiten, die beim Platzen der Oozyste freierwerden und über die Hämolymphe zur Speicheldrüse wandern. Sie sammeln sich in den Sekretvakuolen und können bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke wieder übertragen werden (Lucius und Loos-Frank, 1997).

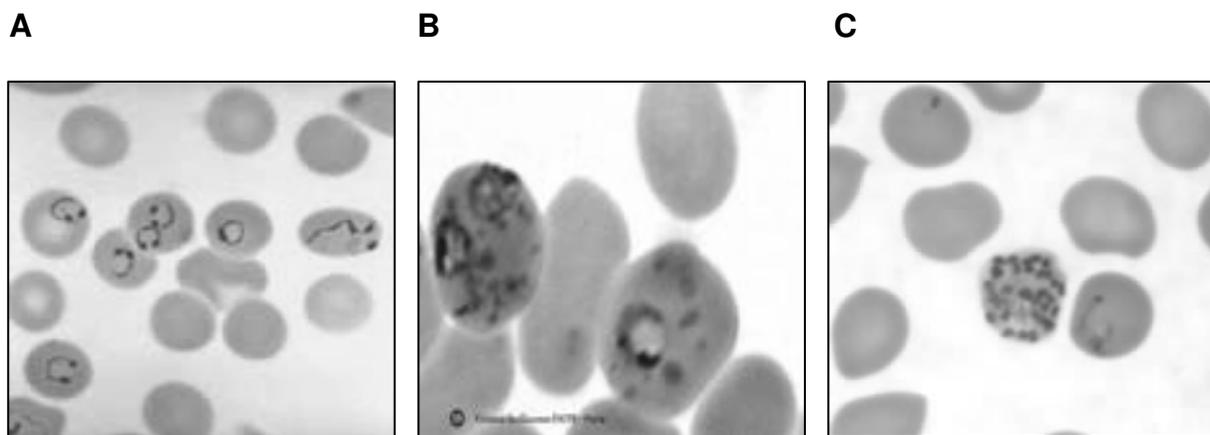


Abb. 4: Entwicklungsstadien von *P. falciparum*. **A)** Ringstadien, **B)** Trophozoiten, **C)** Schizonten

1.2.3 Klinisches Bild der Malaria

Die klinischen Zeichen der Malaria sind oft unspezifisch; beim Freisetzen der Merozoiten aus den Erythrozyten treten Fieber, Schüttelfrost sowie Kopf- und Gliederschmerzen auf. Diese Symptome werden durch ein Toxin verursacht, welches die Makrophagen zu der Sekretion von Cytokinen (tumor necrosis factor- α , TNF- α) und Interleukin-1 induziert (Kern et al., 1992; Day et al., 1999; Maitland und Marsh, 2004). Weitere für eine *P. falciparum*-Infektion spezifische Komplikationen sind Anämie, zerebrale Malaria, Nierenversagen, akuter Blutzucker-Abfall und Lungenödeme (Miller et al., 1994). Eine gravierende Ursache für die hohe Zahl an Todesfällen bei Infektionen mit *P. falciparum* ist die Eigenschaft des Parasiten, bestimmte Proteine an die Oberfläche ihrer Wirtserythrozyten zu transportieren, die zum einen eine Agglutinierung der Erythrozyten, zum anderen eine Adhäsion an Endothelzellen bewirken. Letzteres resultiert daraus, dass *P. falciparum* an der Oberfläche befallener Erythrozyten die Bildung kleiner, in der Erythrozytenmembran liegender Höcker induziert, die nur elektronenmikroskopisch sichtbar sind. Diese sogenannten „knobs“ bilden ein Parasiten-Antigen - das „erythrocyte membrane protein“ (PEMP1) - aus und enthalten vom Parasiten produzierte Adhäsionsproteine, mit deren Hilfe befallene Erythrozyten an die Endothelien von Kapillaren (Cytoadhärenz) und an andere Erythrozyten (Rosettenbildung) binden. Zum einen befinden sich dadurch ältere Trophozoiten und Schizonten nicht mehr frei im Blut, zum anderen bilden sich an den Kapillaren oft Klumpen von Blutkörperchen; dieser Rückzug aus dem zirkulierenden Blut bewirkt, dass befallene Erythrozyten nicht die Milz passieren, wo sie wahrscheinlich aussortiert und zerstört werden würden (Lucius und Loos-Frank, 1997). Das Festsetzen der Erythrozyten an den Kapillarwänden führt zu einer Sequestration von roten Blutkörperchen in den Mikrokapillaren, die Erythrozyten verklumpen und die Gefäße verstopfen. Hieraus folgen wiederum die Mikrozirkulationsstörungen und die hypoxischen Schäden im Gewebe; die Verstopfung kleiner Kapillaren unter anderem in Lunge und Gehirn kann Symptome wie Ödembildungen oder zerebrale Malaria verursachen (White, 1996).

Während das Fieber bei der Malaria tropica in unregelmäßigen Abständen auftritt, können die Fieberschübe durch eine strenge Synchronisation des Parasitenzyklus bei der Malaria tertiana alle 48 Stunden und bei der Malaria quartana alle 72 Stunden auftreten. Die Merozoiten von *P. falciparum* befallen Erythrozyten aller Altersstufen;

P. vivax hingegen bevorzugt Reticulozyten, so dass maximal etwa 2% der Blutkörperchen befallen sind. Die Merozoiten von *P. malariae* schließlich befallen nur reife Erythrozyten; meist sind weniger als 1% der Blutkörperchen befallen.

1.2.4 Bekämpfung der Malaria

Hinsichtlich der Malariabekämpfung sind zwei Ansätze von Bedeutung: zum einen das Vorgehen gegen den Parasiten im Endwirt, zum anderen die Vektorkontrolle in den Gebieten, in denen die Krankheit verbreitet ist. Für die medikamentöse Behandlung der Malaria stehen verschiedene, aus Naturstoffen gewonnene Verbindungen oder synthetische Chemotherapeutika zur Verfügung. Ein großes Problem der chemotherapeutischen Behandlung der Malaria ist jedoch, dass die Plasmodien gegen alle Medikamente Resistenzen entwickelt haben.

Bestimmte Charakteristika eines Medikaments führen bevorzugt zu der Entwicklung von Resistenzen; wesentliche Gründe sind eine lange Halbwertszeit und eine schlechte Relation von eingesetzter Konzentration und erzieltm Effekt. Mutationen im Genom des Parasiten vermitteln darüber hinaus eine Reduzierung der Sensitivität. Resistenzen werden am häufigsten in *P. falciparum* beobachtet; auch in *P. vivax* sind sporadische Fälle von Resistenz bekannt.

Die Malariabekämpfung im Rahmen der Vektorkontrolle beschränkte sich zunächst hauptsächlich auf den Einsatz von Insektiziden; auch hier schränken Resistenzentwicklungen der Mücken gegen die Insektizide die Einsatzmöglichkeiten ein. Biologische Kontrollmethoden wie etwa der Einsatz Mückenlarven-fressender Fische der Gattung *Gambusia* (Storch und Welsch, 1991) oder der larvenabtötenden Bakterien *Bacillus thuringiensis israelensis* oder *B. sphaericus* (Mittal, 2003; Frederici et al., 2003) zeigten bisher nur in begrenzten Gebieten Erfolg. Eine effektivere Methode stellt die massive Verwendung von Moskitonetzen dar (WHO, 2005). Aktuelle Forschungsansätze auf dem Gebiet der molekularen Entomologie zielen darauf ab, den Vektororganismus genetisch so zu manipulieren, dass sich keine Plasmodien mehr in ihm entwickeln können.

1.2.5 Medikamente gegen Malaria

Quinin, ein Alkaloid aus der Rinde des in Peru heimischen Cinchona-Baumes, wird bereits seit Jahrhunderten zur Behandlung von Malaria eingesetzt; es wirkt auf die erythrozytären Formen aller Plasmodien. Da es auf die exoerythrozytären Formen wenig Einfluss hat, ist seine Wirkung als Prophylaktikum nur ungenügend (Lang, 1993). Quinin bleibt sogar nach umfangreichem Gebrauch relativ effektiv; Berichte über eine Resistenz gegen Quinin sind selten, obwohl Fälle aus Thailand und Ostafrika bekannt sind (Brockman *et al.*, 2000; Ndong *et al.*, 2003). Der Mechanismus der Resistenzentwicklung ist noch unklar (Le Bras und Durand, 2003). Das 1937 entwickelte Chloroquin, ein Quinolinderivat (4-Aminoquinolin), akkumuliert in der parasitophoren Vakuole (Yayon *et al.*, 1984; Fitch, 2004) und hemmt dort die Häm-Polymerisation (Chou und Fitch, 1980; Dorn *et al.*, 1998; Leed *et al.*, 2002; De Dios, 2003). Das Resultat ist eine Anhäufung von freiem Häm, welches die Membran zerstört, die Enzyme des Hämoglobinabbaus inaktiviert und zum Tod des Parasiten führt (Fitch *et al.*, 1982; Fitch *et al.*, 1983; Olliaro und Goldberg, 1995). Seit den frühen sechziger Jahren nimmt die Sensitivität der Parasiten gegenüber Chloroquin jedoch ab; die Resistenz breitete sich Ende der fünfziger bzw. anfangs der sechziger Jahren ausgehend von den beiden Zentren Kolumbien und Thailand aus (Payne, 1987). Seitdem hat sich die Resistenz gegen dieses Medikament weltweit etabliert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird die Resistenz durch Mutationen der Gene *Pfmdr1* (multidrug resistance gene) und *Pfcr1* (chloroquine resistance locus) vermittelt (Le Bras, 1999; Le Bras und Durand, 2003; Sanchez *et al.*, 2005); diese Mutationen korrelieren mit einem Phänotyp, der eine starke Beeinträchtigung der Chloroquinaufnahme durch die parasitäre Vakuole aufweist. Der genaue Mechanismus, mit dem diese herabgesetzte Akkumulation des Chloroquins bewirkt wird, ist nach wie vor nicht vollständig bekannt; diskutiert werden zum einen ein energieabhängiger Efflux des Chloroquins über eine transmembrane Proteinpumpe, zum anderen ein Anstieg des pH-Werts in der parasitophoren Vakuole (Slater, 1993).

Wie Chloroquin gehört Amodiaquin zu den 4-Aminoquinolinen, ist im Vergleich aber effektiver und wirkt in einigen Fällen sogar gegen chloroquinresistente Parasiten (Ringwald *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1998). Jedoch sind auch hier Resistenzen und z. T. auch Kreuzresistenzen mit Chloroquin entstanden (Bray *et al.*, 1996).

Die Wirkung des 1952 entwickelten Inhibitors Pyrimethamin beruht auf der Tatsache, dass es weitaus stärker an die DHFR des Parasiten bindet als an das entsprechende Enzym im Säugetier-Wirt. Durch die Bindung an die DHFR wird die DNA-Synthese des Parasiten blockiert (Hyde, 1989). Weitere Dihydrofolatanaloga sind Aminopterin, Methotrexat und Proguanil. Die Resistenz gegen diese Medikamente hat sich während der letzten dreißig Jahre entwickelt und ist mittlerweile ebenfalls weit verbreitet. Sie ist mit einer Punktmutation im Codon 108 der DHFR von *P. falciparum* assoziiert (Cowman et al., 1988; Peterson et al., 1988; Snewin et al., 1989; Zolg et al., 1989). Gleichzeitige Punktmutationen in den Codons 16 und 108 resultieren in einer Resistenz gegen Cycloguanil, dem biologisch aktiven Metaboliten der „pro drug“ Proguanil (Foote et al., 1990; Peterson et al., 1990). Weitere Punktmutationen an den Positionen 51, 59 und 164 sind in sowohl gegen Pyrimethamin als auch gegen Cycloguanil hochresistenten Klonen gefunden worden (Snewin et al., 1989; Foote et al., 1990; Peterson et al., 1990; Hyde 1990).

Die fiebersenkenden Eigenschaften des einjährigen Beifusses (*Artemisia annua*, chinesisch Qinghausu) werden schon seit Jahrhunderten genutzt. Der Wirkstoff Artemisinin, welcher auch gegenwärtig Gegenstand klinischer Studien und Untersuchungen ist, wurde jedoch erst 1972 isoliert (Van Geldre et al., 1997; Haynes, 2001). Artemisinin und dessen drei Derivate Artesunat, ein wasserlösliches Hemisuccinat, Artemether und Arteether (fettlösliche Ether) werden alle zu dem biologisch aktiven Metabolit Dihydroartemisinin metabolisiert. Es wirkt im nanomolaren Bereich sowohl gegen chloroquinsensitive als auch gegen -resistente Stämme und zeigt keine signifikanten Nebenwirkungen (Newton und White, 1999; Price et al., 1999; Van Vugt et al., 2000). Damit stellen Artemisinin und seine Derivate gegenwärtig eine nützliche Alternative in Gebieten mit einer hohen Resistenz gegen die herkömmlichen Medikamente dar (Wilairatana et al., 1998; Dhingra et al., 2000). Bisher sind noch keine Resistenzen gegen diese endoperoxidhaltigen Verbindungen aufgetreten (White, 1998). Artemisinin-Derivate unterbinden die Entwicklung der Gametozyten und verhindern somit die Übertragung (Price et al., 1996). Nachteil der Artemisinin-Derivate ist andererseits ihre kurze Halbwertszeit (3-5 h); aus diesem Grund werden sie bevorzugt mit anderen Malariamitteln wie Sulfadoxin/Pyrimethamin (Doherty et al., 1999), Benflumetol (van Vugt et al., 1998; van Vugt et al., 2000) oder Mefloquin (Price et al., 1997; Price et al., 1998) verabreicht. Dadurch wird die Heilungsrate verbessert und die Behandlungsdauer

minimiert, was wiederum das Risiko der Resistenzentwicklung senkt (White, 1998). Ein weiterer Nachteil ist, dass Artemisinin-Präparate relativ kostspielig sind, was die Entwicklung synthetischer und günstigerer auf Endoperoxiden basierender Antimalariamedikamente notwendig macht. Der Wirkungsmechanismus der Artemisininverbindungen ist noch nicht vollständig untersucht; Klayman (1985) konnte jedoch zeigen, dass Artemisininderivate, denen die Endoperoxidbrücke fehlt (Desoxyartemisinin), keine antiplasmodiale Wirkung zeigen. Infolgedessen beruht die pharmakologische Aktivität wahrscheinlich auf der Reaktivität des Peroxids, wobei freie Radikale freigesetzt werden, wenn die Verbindungen in Kontakt mit Häm kommen. Hong et al. (1994) postulierten, dass die durch das Häm katalysierte Spaltung der Peroxidbrücke für die Alkylierung des Häms verantwortlich ist. Infizierte Erythrozyten häufen (³H)-Dihydroartemisinin und (¹⁴C)-Artemisinin in 100fach höherer Konzentration an als nichtinfizierte Erythrozyten (Meshnik et al., 1996).

1.3 Polyamine

Die Polyamine Putrescin (1,4-Butandiamin), Spermidin (N-(3-Aminopropyl)-1,4-Butandiamin) und Spermin (N¹,N⁴-bis(3-Aminopropyl)-1,4-Butandiamin) stellen in der Natur sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten weit verbreitete Verbindungen dar (Bachrach, 1973). Es handelt sich um aliphatische Kohlenwasserstoffe, die eine Vielzahl biologischer Effekte hervorrufen (Tabor und Tabor, 1984; Marton und Morris, 1987; Seiler 1994).

Die Erforschung der Polyamine begann bereits 1678, als Anthon van Leeuwenhoek Sperminphosphatkristalle im menschlichen Sperma beobachtete. Die chemische Struktur von Spermin wurde 1924 von Rosenheim, die von Spermidin ebenfalls 1924 von Dudley et al. aufgeklärt (Cohen, 1998). Trotz der frühen Kenntnisse über die chemische Struktur der Polyamine wurde die Biosynthese von Spermidin erst 1956 von Tabor et al. und die von Spermin 1968 von Pegg und Williams-Ashman beschrieben. Abb. 5 zeigt die chemische Struktur der Di- und Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin. Die Polyamine besitzen endständige Amino- und intramolekulare Iminogruppen, die stark basisch wirken und unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) zu mehr als 95% protoniert vorliegen (Tabor und Tabor, 1984a; Seiler 1987; Seiler und Heby, 1988; Seiler, 1994).

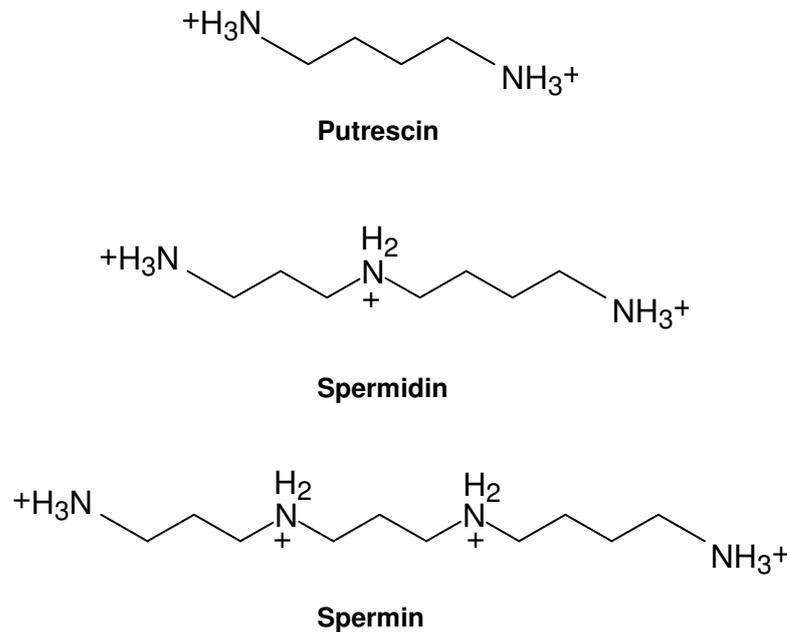


Abb. 5: Struktur der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin.

1.3.1 Funktion der Polyamine

Neben der Tatsache, dass die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten verbreitet sind, weist auch ihre elementare Beteiligung an der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung (Pegg und McCann, 1982; Heby und Persson, 1990; Bachrach, 2004) auf ihre Bedeutung hin. In den Stadien der Zellproliferation lassen sich hohe intrazelluläre Polyaminlevel beobachten, während die Konzentration der Polyamine in differenzierten Zellen niedrig ist (Piancentini et al., 1988; Seiler und Heby, 1988). Heby et al. (1982) konnten demonstrieren, dass der Gehalt an zellulärem Putrescin, Spermidin und Spermin stark ansteigt, wenn im Zellzyklus das Stadium von der G1-Phase zur Mitose durchlaufen wird. Diese Zunahme ließ sich zuerst für Putrescin, dann für Spermidin und schließlich für Spermin beobachten; diese Reihenfolge spiegelt sich in der Reihenfolge der Polyaminbiosynthese wieder. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass der Spermidingehalt der Zellen eine Korrelation mit der spezifischen Wachstumsrate aufwies, was darauf hinweist, dass die Spermidinanhäufung mit dem

Prozess der Zellteilung verbunden ist. Ein hohes Putrescin- und Spermidin-aufkommen scheint die Wachstumsrate zu erhöhen, ein niedriger Gehalt die Wachstumsrate zu verringern (Heby und Andersson, 1980; Heby, 1981; Heby et al., 1982; Tavares et al., 2005).

Durch Versuche mit polyaminauxotrophen Mutanten ließ sich sowohl bei Prokaryoten als auch bei niederen und höheren Eukaryoten zeigen, dass Polyamine essentiell für das Wachstum der Zellen sind (Tabor und Tabor, 1969; Whitney und Morris, 1978; Höllta und Pohjanpelto, 1982; Herrero et al., 1999; Jimenez-Bremont et al., 2001). Steglich und Scheffler (1981) demonstrierten anhand putrescinauxotropher Mutanten von „chinese hamster ovary“ (CHO)-Zellen, dass diese für eine normale Wachstumsrate eine Mindestkonzentration des Diamins von 10^{-5} M im Medium benötigen. Auch Pohjanpelto et al. (1981) konnten eine polyaminabhängige CHO-Zellmutante isolieren, deren Putrescin-Bedarf im Medium bei 5×10^{-7} M lag. Diese Versuche unterstreichen die Bedeutung der Polyamine für das Wachstum der Zellen ebenso wie Untersuchungen mit Inhibitoren der Polyaminsynthese, die eine Abnahme der intrazellulären Polyaminkonzentration bewirken, was zu einer Inhibierung der Zellproliferation führt. Die externe Zugabe von Polyaminen hebt diesen Effekt wieder auf (Heby, 1981; Löwkrist et al., 1987; Marton und Pegg, 1995; Herrero et al., 1999). Polyamine besitzen bei physiologischem pH-Wert einen polykationischen Charakter; dieser verleiht ihnen ähnliche Eigenschaften wie den anorganischen Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} (Tabor und Tabor, 1984), jedoch mit dem Unterschied, dass die Ladung bei den Polyaminen entlang des Moleküls verteilt und nicht wie bei anorganischen Kationen auf einen Punkt konzentriert ist (Schuber, 1989). Dieser polykationische Charakter ermöglicht eine Interaktion mit Nukleinsäuren, Membranphospholipidsäuren und Proteinen und befähigt die Polyamine, zwischen negativ geladenen Membranteilen und den ebenfalls negativ geladenen Zellpartikeln klammerartige Komplexe zu bilden, im Gegensatz zu anorganischen Kationen, die eine solche Funktion aufgrund ihrer punktuellen Ladung nicht erfüllen können (Tabor und Tabor, 1984; Cohen, 1998; Terui et al., 2005).

Aufgrund ihrer polykationischen Eigenschaften können Polyamine doppelsträngige Strukturen wie DNA und RNA stabilisieren, indem sie eine starke Bindung mit jedem der beiden Stränge eingehen und diese so zusammenhalten (Feuerstein und Marton, 1989; Ouameur und Tajmir-Riahi, 2004); Tabor und Tabor (1976) berichteten in diesem Zusammenhang von einer Stabilisierung der Doppelhelix durch Polyamine

gegen Hitzedenaturierung. Des Weiteren konnte eine Schutzfunktion der Polyamine gegen strahlungsbedingte Doppelstrangbrüche der DNA und DNA-Protein-Crosslinks nachgewiesen werden (Chiu und Oleinick, 1998; Warters et al., 1999).

Auch die Konformation der DNA, die in den meisten Fällen in der B-Form vorliegt, kann durch Polyamine beeinflusst werden. So wurde z.B. gezeigt, dass mikromolekulare Konzentrationen von Spermidin und Spermin eine *in vitro*-Transition der B-Form in die Z-Form induzieren (Behe und Felsenfeld, 1981; Behe et al., 1981; Varnado et al., 2000; Ouameur und Tajmir-Riahi, 2004). Darüber hinaus sind die Polyamine auch im Rahmen der Chromatinkondensation während der Mitose an die DNA gebunden und stabilisieren so die Chromatinstruktur (Makarov et al., 1987; Morgan et al., 1987; Hougaard et al., 1987; Childs et al., 2003). Pohjanpelto (1981) zeigte, dass bei polyaminauxotrophen Mutanten ohne externen Zusatz von Polyaminen die DNA-Synthese und die Zellteilung nach 3-4 Tagen zum Stillstand kommt; diese Zellen zeigen eine äußerst geringe Anhäufung von Mikrotubuli und ihnen fehlen 90% der Aktinfilamentbündel, Vorgänge, die im Normalfall während der Mitose parallel zur Chromatinkondensation ablaufen und essentiell für den Vorgang der Zellteilung sind. Auch die Tatsache, dass Spermidin und Spermin im Zellkern in höheren Konzentrationen vorliegen als im Cytoplasma, weist auf einen *in vivo*-Einfluss dieser Polyamine auf die DNA hin (Sarhan und Seiler, 1989).

Nachgewiesen sind auch Polyamine in Assoziation mit Proteinen, z. B. bei der Bildung von bis(γ -Glutamyl)spermidin (Heby und Persson, 1990); hier wird zwischen γ -Glutamylresten und den Aminogruppen eines Polyamins eine Amidbindung durch Transglutaminasen ausgebildet (Piacentini et al., 1990).

Trypanothion [N^1 , N^8 -bis(Glutathionyl)spermidin] ist ein ausschließlich in Trypanosomatiden vorkommendes Molekül; es übernimmt in diesen Organismen die Funktion des Glutathions. Spermidin ist ein Bestandteil des Trypanothions, es wird zusammen mit Glutathion zur Synthese dieser Verbindung genutzt (Fairlamb et al., 1986; Oza et al., 2003).

1.4 Polyaminstoffwechsel

1.4.1 Biosynthese von Polyaminen in Säugetieren

Die Synthese der Polyamine geht von der Aminosäure L-Arginin aus, die durch die Arginase entweder im Harnstoffzyklus der Leber in Ornithin umgewandelt wird (Liappis, 1972), welches dann im Plasma frei verfügbar ist, oder aber auch intrazellulär in Ornithin überführt werden kann (Pegg und McCann, 1982).

Die erste Stufe der Polyaminbiosynthese besteht in der Decarboxylierung von L-Ornithin durch die Ornithin-Decarboxylase (ODC) zu Putrescin (Heby, 1981; Pegg und McCann, 1982; Seiler und Heby, 1988). Viele Mikroorganismen (Tabor und Tabor, 1985) und auch einige höhere Pflanzen (Slocum *et al.*, 1984; Smith, 1985) sind darüber hinaus in der Lage, Putrescin alternativ aus Agmatin, das aus Arginin mittels einer Decarboxylierung gebildet wird, zu synthetisieren. Für diese Schritte werden die Enzyme Arginin-Decarboxylase (ADC) und Agmatinase benötigt. Aus Putrescin wird durch die Addition einer Aminopropylgruppe Spermidin gebildet (Pegg *et al.*, 1981), welches durch das Hinzufügen einer weiteren Aminopropylgruppe in Spermin überführt wird (Pegg *et al.*, 1981; Pegg und McCann, 1982; Seiler und Heby, 1988). Die Übertragung der Aminopropylgruppe auf Putrescin bzw. Spermidin wird durch die Aminopropyltransferasen Spermidin-Synthase (SpdSyn) und Spermin-Synthase (SpmSyn) katalysiert (Pegg *et al.*, 1981).

Die Aminopropylgruppen stammen aus der Aminosäure L-Methionin, welches unter Beteiligung von ATP zunächst zu S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) umgewandelt und im Anschluss daran durch die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (AdoMetDC) decarboxyliert wird (Abb. 6). Die Bildung des AdoMet aus Methionin wird durch die S-Adenosylmethionin-Synthetase (AdoMet-Synthetase) katalysiert.

Neben den erwähnten Verbindungen entsteht bei den Synthese-Reaktionen als zweites Produkt das 5-Methylthioadenosin (MTA); dieses wird durch die MTA-Phosphorylase in Adenin und 5-Methylthioribose-1-Phosphat umgewandelt (Williams-Ashman und Pegg, 1981). Dadurch wird Adenin dem Purinstoffwechsel zugeführt und aus 5-Methylthioribose-1-Phosphat entsteht wieder Methionin (Pegg und McCann, 1982).

Des Weiteren ist in eukaryotischen Zellen das Spermidin eine wichtige Verbindung für die Synthese von Hypusin und Homospermidin.

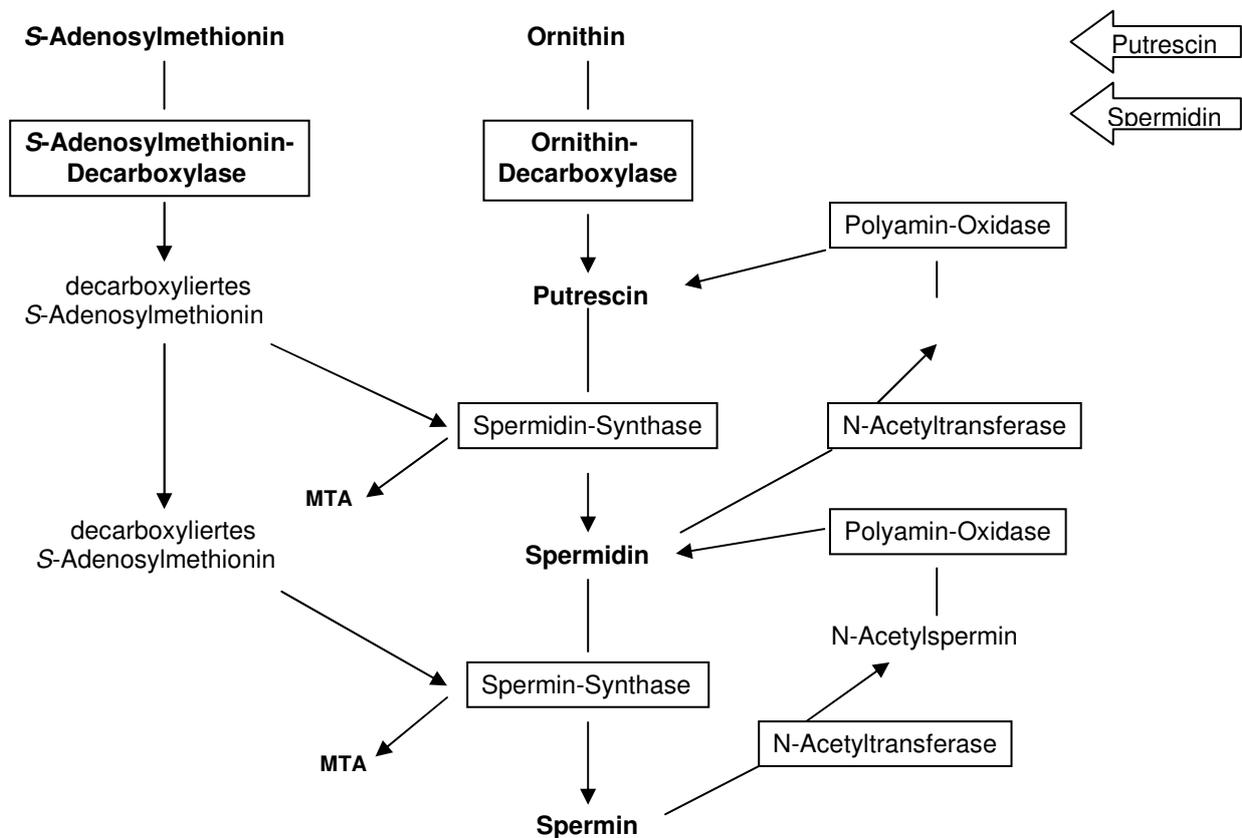


Abb. 6: Polyaminstoffwechsel in Säugetieren.

Die Hypusinbiosynthese findet in dem Vorläufer des eukaryotischen Translations-initiations-Faktors eIF-5A durch eine zweistufige posttranslationale Modifikation statt. In der ersten Stufe katalysiert die Deoxyhypusin-Synthase (DHS) den NAD^+ -abhängigen Transfer der Butylamin-Gruppe des Spermidins auf die Aminogruppe eines spezifischen Lysinrests des eIF-5A-Precursors, um den Deoxyhypusinrest zu bilden (Wolff et al., 1999). Danach wird durch die Hydroxylierung dieses Intermediats mittels der Deoxyhypusin-Hydroxylase die Hypusin-Biosynthese komplettiert. Während Hypusin wie erwähnt an der Aktivierung des eukaryotischen Translationsinitiations-Faktors eIF5A beteiligt ist, ist die biologische Funktion des Homospermidins bisher nicht bekannt.

Die Homospermidinbildung wird durch die Homospermidin-Synthase (HSS) aus Putrescin und Spermidin katalysiert, kann aber auch alternativ durch die

Deoxyhypusin-Synthase aufgrund ihrer ausgedehnten Substrataffinität gebildet werden (Ober und Hartmann, 1999). Beide Enzyme ähneln sich darin, dass sie den NAD⁺-abhängigen Transfer des Aminobutyls aus Spermidin auf verschiedene Aminobutylakzeptoren wie z.B. eIF 5A (durch die DHS) und Putrescin (durch die HSS) katalysieren können.

1.4.2 Interkonversion von Polyaminen

Trotz der Tatsache, dass die durch die SpdSyn und die SpmSyn katalysierten Reaktionen irreversibel sind, besteht die Möglichkeit einer Rückwandlung von Spermin zu Spermidin und schließlich zu Putrescin (Seiler et al., 1981; Pegg et al., 1981; Seiler, 2004). An diesem als Interkonversion bezeichneten Prozess (Abb. 4) sind zwei Enzyme beteiligt, die Polyamin-N-Acetyltransferase (SSAT) und die Polyamin-Oxidase (PAO). Erstere katalysiert die Acetylierung von Spermin und Spermidin, die jeweilige Acetylgruppe stammt aus Acetyl-CoA. Die acetylierten Polyamine werden anschließend von der PAO unter Abspaltung von Acetamidopropanal in das jeweilige Vorläuferpolyamin oxidiert (Pegg et al., 1981). Die SSAT stellt das regulatorische Enzym des Polyamin-Interkonversionswegs dar; deren Induktion, herbeigeführt u.a. durch Spermidin und besonders Spermin, führt zu einer erhöhten Translation der SSAT-mRNA, was wiederum in einem Anstieg der Enzymmenge resultiert (Seiler und Heby, 1988). Eine solche Induktion der SSAT hat einen verstärkten Abbau der Polyamine zur Folge.

Darüber hinaus können überschüssige Polyamine durch einen Exportmechanismus aus der Zelle befördert werden (Pastorian und Byus, 1997; Xie et al., 1997), auch in Zellen, in denen keine SSAT und kein Interkonversionsweg gefunden werden konnte wie z.B. in Oozyten von *Xenopus laevis* (Fukumoto und Byus, 1997). Auch für humane Erythrozyten sind Exportmechanismen für Polyamine beschrieben worden (Fukumoto und Byus, 1996). Die Interkonversion und/oder der Export besonders von Spermin ist nötig, da eine starke Anhäufung dieses Polyamins einen toxischen Effekt auf die Zellen hat (Seiler, 2004).

1.4.3 Transport von Polyaminen

Transportsysteme zur Aufnahme und zum Ausscheiden von Polyaminen stellen eine Ergänzung zur Biosynthese und dem Abbau dieser Verbindungen dar. Die Polyaminaufnahme erfolgt über aktive Na^+ -abhängige Transportsysteme (Morgan, 1990; Seiler, 1990).

Ein intrazellulärer Abfall der Polyaminkonzentration, hervorgerufen durch den Einsatz von Inhibitoren der Polyaminsynthese, führte zu einer erhöhten Aufnahme externer Polyamine, so dass die Abnahme der Polyaminlevel mittels dieses Aufnahmesystems ausgeglichen werden konnte (Alhonen-Hongisto et al., 1980; Seppänen et al., 1981; Rinehart und Chen, 1984; Byers und Pegg, 1989; Pegg et al., 1990). Demzufolge kann die *de novo*-Synthese der Polyamine durch die Aufnahme externer Polyamine unterstützt werden (Rinehart und Chen, 1984; Byers und Pegg, 1989). Allgemein geht das Zellwachstum nicht nur mit einer erhöhten Polyaminbiosynthese, sondern auch mit einer verstärkten Polyaminaufnahme einher (Pohjanpelto, 1976).

Bezüglich der Ausscheidung von Polyaminen wurde festgestellt, dass dieser Vorgang im Gegensatz zur Polyaminaufnahme nicht energieabhängig ist (Seiler, 1990). Kashiwagi et al. (1992) beschrieben die Ausscheidung von Polyaminen und ihrer acetylierten Derivate bei *Escherichia coli*, Pegg et al. (1988, 1989, 1990) bei verschiedenen Säugetierzellen. Die Derivate werden als Transportformen angesehen, da die Acetylierung die Ladung von Polyaminen herabsetzt und damit die elektrostatischen Wechselwirkungen sinken; acetylierte Polyamine stellen einen Hauptbestandteil der Polyamine im Urin von Säugern dar (Seiler, 1987).

In *E. coli* sind die Gene für drei verschiedene Polyamintransportsysteme kloniert und charakterisiert worden. Zwei dieser Aufnahmesysteme (eines putrescin-, das andere spermidinspezifisch) sind „ATP binding cassette“ (ABC)-Transporter (Higgins, 1992; Kashiwagi et al., 2000; Igarashi und Kashiwagi, 2001), jedes bestehend aus einem periplasmatischen substratbindenden Protein (PotD und PotF), zwei Transmembranproteinen und einer membranassoziierten ATPase. Das dritte Transportsystem (PotE) vermittelt sowohl Aufnahme als auch Exkretion von Putrescin. Die Aufnahme von Putrescin ist abhängig vom Membranpotential, während die Exkretion eine Austauschreaktion zwischen Putrescin und Ornithin beinhaltet (Igarashi und Kashiwagi, 1999). In *E. coli* ist die Polyaminaufnahme somit energieabhängig; das Transportsystem für Putrescin unterscheidet sich von jenem für den Spermidin- und

Spermintransport (Tabor und Tabor, 1966; Kashiwagi et al., 1986). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde ebenfalls ein Gen für ein Polyamintransportprotein (TPO1) identifiziert. Dessen Eigenschaften gleichen jenen von PotE (Igarashi und Kashiwagi, 1999).

Aouida et al. (2005) charakterisierten kürzlich eine Polyamin-Permease in *S. cerevisiae*, die identisch zu AGP2 ist, einem Mitglied der „yeast amino acid transporter family“. Die Deletion dieses Gens reduzierte die Aufnahmegeschwindigkeit für Putrescin und Spermidin und vermittelt eine hohe Resistenz gegen die Toxizität exogener Polyamine; des Weiteren erhöhte die Zerstörung von end3, einem Gen, das für die Endozytose benötigt wird, die Menge an agp2p, ein Effekt, der von einer Hochregulierung der Spermidinaufnahmegeschwindigkeit begleitet wurde. Somit codiert agp2 für die erste eukaryotische Permease, die Spermidin gegenüber Putrescin als Substrat vorzieht und eine zentrale Rolle in der Polyaminaufnahme spielt.

Viele der Proteine, die am Polyamintransport beteiligt sind, gehören zu der Aminosäure/Polyamin/Kation (APC)-Superfamilie; die meisten dieser Proteine weisen zwölf sogenannte transmembrane spanners (TMS) in einem einzelnen Polypeptid auf. Zu dieser APC-Superfamilie gehört auch ein kürzlich von Hasne und Ullman (2005) identifizierter Polyamintransporter bei *Leishmania major*, der aus 9-12 Transmembrandomänen besteht. Damit konnte zum ersten Mal ein Polyamintransportsystem in eukaryotischen Zellen identifiziert und charakterisiert werden. Dieser Polyamintransporter, LmPOT1, erkennt sowohl Putrescin als auch Spermidin mit hoher Affinität und scheint keine Aminosäuren zu transportieren. Hinsichtlich des Aufnahmemechanismus scheint LmPOT1 ein Protonensymporter zu sein, da der Transport durch Protonenentkoppler inhibiert werden kann.

1.4.4 Regulation des Polyaminstoffwechsels bei Säugetieren

Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin stellen wesentliche Faktoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung dar. Infolgedessen ist eine strikte Regulation der Synthese dieser Polyamine notwendig, die in Abhängigkeit des jeweiligen physiologischen Bedarfs der Zelle eine Anpassung der Polyaminkonzentrationen erlaubt (Seiler, 1987). Die Regulation des Polyaminstoffwechsels

wird über die Aktivität der drei Schlüsselenzyme ODC, AdoMetDC und SSAT erzielt. Die restlichen Enzyme des Polyamin-Biosyntheseweges und der Interkonversion, SpdSyn, SpmSyn und PAO, liegen intrazellulär im Überschuss vor; ihre Regulation erfolgt durch das limitierende Substrat, decarboxyliertes S-Adenosylmethionin (Heby und Persson, 1990; Seiler, 1994). Generell unterliegen die Polyamine einer effizienten Feedback-Kontrolle ihrer eigenen Synthese auf der Transkriptions-, der Translations- und der Proteinebene (Heby und Persson, 1990; Nasizadeh et al., 2003). In Säugetierzellen wird die Aktivität der AdoMetDC durch Putrescin stimuliert und durch Spermidin inhibiert; dadurch wird die Konzentration an decarboxyliertem AdoMet dem Bedarf an Spermidin angepasst (Pegg und McCann, 1982).

1.4.4.1 ODC

Die ODC katalysiert den ersten regulatorischen Schritt der Polyaminbiosynthese; ihre Aktivität wird gewöhnlich durch die Änderung der Menge des Enzyms reguliert (Seely und Pegg, 1983; Seiler und Heby, 1988). Die zelluläre ODC-Aktivität und -Menge kann sowohl durch Änderungen in der Syntheserate auf den Ebenen der Transkription und der Translation als auch in der Degradation des Enzyms durch Änderungen von dessen Halbwertszeit reguliert werden (Hayashi, 1989), so dass z.B. verstärkte ODC-Aktivität zum einen durch eine Zunahme der Syntheserate und zum anderen einer Abnahme der Degradationsrate resultiert (Seely et al., 1982; Isomaa et al., 1983; Seely und Pegg, 1983).

Eine Induktion durch Wachstumshormone erfolgt in erster Linie auf dem Level der Transkription (Seiler und Heby, 1988). Für die Translationsrate der ODC scheint der 5'-nicht-translatierte Bereich von Bedeutung zu sein (Gupta und Coffino, 1985; Kahana und Nathans, 1985a); Kahana und Nathans (1985b) konnten zeigen, dass ohne diese Region eine 40-fache Erhöhung der *in vitro*-Translation festzustellen ist. Ursache ist die Ausbildung von Sekundärstrukturen im 5'-nicht-translatierten Bereich, die eine niedrige Translationsrate bedingen (Kameji und Pegg, 1987a). Da bei geringen intrazellulären Polyaminkonzentrationen eine verstärkte Translation stattfindet (Kameji und Pegg, 1987a), ist anzunehmen, dass die Polyamine die Sekundärstrukturen der mRNA stabilisieren (Persson et al., 1988). Folglich lägen bei geringen Polyaminkonzentrationen weniger stabile Sekundärstrukturen vor, wodurch

eine erhöhte Translationsrate gewährleistet wäre. Liegen die Polyamine intrazellulär in hohen Konzentrationen vor, so resultiert dies in einer reduzierten Synthese und einer verstärkten Degradation des Enzyms (Hayashi, 1989).

Der Abbau der ODC wird durch das ODC-Antizym beschleunigt (Heller et al., 1976), einem nichtkompetitiven Inhibitor der ODC, dessen Synthese durch hohe intrazelluläre Polyaminkonzentrationen induziert wird (Hayashi und Murakami, 1995). Das Antizym bindet an die ODC und beschleunigt dadurch deren Abbau durch das Proteasom 26S (Heller et al., 1976; Fong et al., 1976; Hayashi et al., 1996). Ihre kurze Halbwertszeit ist eine besondere Eigenschaft regulatorischer Proteine (Seiler, 1990). Die ODC bildet diesbezüglich keine Ausnahme; sie besitzt eine Halbwertszeit von maximal 1 h (Jänne et al., 1978; McCann, 1980; Pegg und Williams-Ashman, 1981).

Die ODC teilt mit anderen Proteinen, bei denen eine kurze Halbwertszeit nachgewiesen wurde, das Charakteristikum, sich durch eine regionale Häufung der Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D), Serin (S) und Threonin (T) auszuzeichnen. Diese nach den erwähnten Aminosäuren benannte PEST-Region vermittelt eine Proteininstabilität und scheint den Proteinen ihre kurze Halbwertszeit zu verleihen (Rogers et al., 1986; Rechsteiner et al., 1987; Olmo et al., 1999, 2000).

1.4.4.1.1 Inhibitoren der ODC

Das Ornithinderivat DL- α -Difluoromethylornithin (DFMO), der bedeutendste Inhibitor der Polyaminsynthese, wurde 1978 als Mittel gegen Krebs entwickelt (Metcalf et al., 1978; Bey et al., 1978; Mamont et al., 1978). Es wird bei der Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt, die durch *Trypanosoma brucei gambiense* hervorgerufen wird (Sjoerdsma und Schechter, 1984; Sjoerdsma et al., 1984). DFMO wirkt als enzymaktivierter irreversibler Inhibitor der ODC (McCann et al., 1987), d.h. erst durch die katalytische Reaktion im aktiven Zentrum wird er von einer „pro-drug“ in das chemisch reaktive Produkt umgewandelt. Als Substratanalogon des ODC-Substrats Ornithin beruht der inhibitorische Effekt von DFMO auf der Bildung eines hochreaktiven elektrophilen Intermediats durch die Decarboxylierung des DFMO, welches durch eine nukleophile Reaktion im aktiven Zentrum des Enzyms eine

kovalente Bindung ausbildet und das Enzym irreversibel inhibiert (McCann, Pegg und Sjoerdsma, 1987). DFMO wirkt nicht cytotoxisch, sondern cytostatisch (Pegg, 1988) und der inhibitorische Effekt auf das Zellwachstum kann durch die Zugabe externer Polyamine aufgehoben werden (Assaraf et al., 1984, 1987). Der Einfluss auf den Polyaminstoffwechsel der Zellen besteht in einer starken Abnahme des Putrescinlevels, gefolgt von einer Abnahme der Spermidinkonzentration; daraus resultiert eine Abnahme der Zellteilungsrate, die mit einer Verlängerung der G1-Phase des Zellzyklus zusammenhängt. Sinkt die Spermidinkonzentration unter einen kritischen Wert, kommt der Prozess der Zellteilung trotz nahezu normaler Spermidinkonzentrationen zum Stillstand.

1-Aminoxy-3-Aminopropan (APA), ein Putrescin-Analogon aus der Gruppe der O-substituierten Hydroxylamine, inhibiert die ODC von Säugerzellen sehr effektiv; in geringerem Maße werden auch die AdoMetDC und die SpdSyn gehemmt (Khomutov et al., 1985; Eloranta et al., 1990; Haider et al., 2005). Bei der Entwicklung der APA-Derivate CGP 54169A und CGP 52622A wurde in das APA-Gerüst zum einen eine weitere Methylgruppe, zum anderen eine Ringstruktur eingebaut. Kürzlich sind darüber hinaus auch isosterische Analoga von Agmatin wie H₂NO-Agmatin (AO-Agmatin) und H₂N-Agmatin (GAPA bzw. bis-GAPA) synthetisiert worden, von denen auf Grund ihrer chemischen Struktur erwartet werden kann, dass sie in Form von „pro-drugs“ in die Zelle aufgenommen werden und nach Modifikation die ODC und/oder die AdoMetDC inhibieren. Von guanidinenthaltenden Diaminderivaten wie z.B. MGBG (Methylglyoxal-bis(guanyl-hydrazon)) ist bekannt, dass sie aktiv in die Zelle transportiert werden. So wird postuliert, dass ähnliche Verbindungen wie GAPA oder bis-GAPA mittels eines Putrescin-Transporters in die Zelle aufgenommen und dort - vermutlich durch eine Urease - weiter zu APA umgewandelt werden. Im Falle von GAPA würde dies zur Bildung des ODC-Inhibitors APA führen. bis-GAPA könnte auf Grund seiner strukturellen Nähe zu MGBG die AdoMetDC inhibieren und dann zu AO-Agmatin und APA umgewandelt werden, was wiederum zu einer Inhibierung der ODC führen würde. Das AO-Agmatin bildet wie andere O-substituierte Hydroxylamine stabile Oxime mit Ketonen und Aldehyden, einschließlich des Pyridoxal-5'-Phosphats (PLP) (Simonian et al., unveröffentlicht).

1.4.4.2 AdoMet-Synthetase

Die AdoMet-Synthetase katalysiert die Bildung von AdoMet aus Methionin und ATP (Chiang und Cantoni, 1977; Tabor und Tabor, 1984; Kotb und Geller, 1993). Diese Synthesereaktion besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Im ersten Schritt wird AdoMet aus Methionin, ATP und H₂O gebildet, im zweiten erfolgt die Hydrolyse des Tripolyphosphats (PPP_i) zu Pyrophosphat (PP_i) und Orthophosphat (P_i) in Gegenwart von Mg²⁺ und K⁺, wobei letzteres vor dem Freisetzen des Produkts AdoMet aus dem katalytischen Zentrum abläuft (Mudd und Cantoni, 1958). AdoMet stellt den wichtigsten Donor von Methylgruppen für Methylierungsreaktionen dar und ist Quelle von Propylamino-Gruppen für die Polyaminbiosynthese (Corrales et al., 2002). Eine Störung der Methylierungsreaktionen kann zu Unterbrechungen verschiedener wichtiger biochemischer und biologischer Funktionen führen (Lombardini und Talalay, 1973; Tabor und Tabor, 1984; Chiang et al., 1996; Chiang, 1998). Diese Tatsache macht die AdoMet-Synthetase ebenfalls zu einem interessanten Kandidaten für die Entwicklung von Inhibitoren.

In vielen Fällen sind mindestens zwei Gene vorhanden, die für Isoenzyme oder homologe Untereinheiten der AdoMet-Synthetase codieren. In der Hefe sind dies *sam1* und *sam2* (Thomas und Surdin-Kerjan, 1997), in *E. coli* *metK* und *metX* (Sathishchandran et al., 1993). Die entsprechenden Gene im Menschen sind *mat1A* und *mat2A*, die die α 1- und die α 2-Untereinheiten von MATI/III und MATII codieren (Kotb et al., 1996).

Bei der *E. coli*-AdoMet-Synthetase liegt das aktive Zentrum zwischen zwei Untereinheiten, so dass Aminosäurereste beider Untereinheiten beteiligt sind. Jedes aktive Zentrum bindet zwei divalente Metallionen (z. B. Mg²⁺) und ein K⁺-Ion, welche für die maximale enzymatische Aktivität der AdoMet-Synthetase benötigt werden (Markham et al, 1980; Markham, 1981; Markham, 1984; Zhang et al, 1993; McQueney und Markham, 1995). Damit gehört die AdoMet-Synthetase zu einer diversen Gruppe von Enzymen, die zwei oder mehr Metallionen verwenden, um den Phosphorylgruppen-transfer zu erleichtern (Sträter et al., 1996). Im aktiven Zentrum befinden sich des Weiteren vier Aspartatreste, zwei an jeder Untereinheit. Kristallographische Daten zeigen, dass die Seitenketten Asp¹⁶ und Asp²⁷¹ die Proteinliganden für eines der zwei Mg²⁺-Ionen darstellen; beide Mg²⁺-Ionen sind auch an drei Phosphorylgruppen des ATP-Substrats gebunden (Takusagawa et al., 1996a; Fu et al., 1996;

Takusagawa et al., 1996b). Diese zweibindige Koordination von Mg^{2+} an ein Carboxylat unterstützt die präzise Positionierung des Kations. Die Aspartatreste 118 und 238 scheinen für die Bindung der Methioningruppe verantwortlich zu sein. Asp¹¹⁸ interagiert mit dem Schwefel und Asp²³⁸ mit der α -Aminogruppe (Schalk-Hihi und Markham, 1999). Zusätzlich katalysiert die AdoMet-Synthetase die Mg^{2+} -abhängige Hydrolyse von PPP_i zu PP_i und P_i (Mudd, 1963; Chiang und Cantoni, 1977; Markham et al., 1980). Die Hydrolyserate des PPP_i wird in hohem Maße durch AdoMet stimuliert (Markham et al., 1980).

Neben der Synthese von AdoMet durch die AdoMet-Synthetase kann ersteres auch aufgenommen werden; für *S. cerevisiae* wurden Transporter sowohl für AdoMet als auch für S-Methylmethionin gefunden (Rouillon et al., 1999). Ein Transportmechanismus für AdoMet wurde auch für Trypanosomen beschrieben (Goldberg et al., 1997).

1.4.4.2.1 Inhibitoren der AdoMet-Synthetase

Verschiedene Inhibitoren der AdoMet-Synthetase sind bereits untersucht worden; größtenteils handelt es sich hierbei um die Charakterisierung von Methioninanaloga als potentielle Antikrebsmittel (Sufrin und Lombardini, 1982; Lombardini und Sufrin, 1983; Porter und Sufrin, 1986). Kramer et al. (1988) zeigten, dass das Methionin-analogon L-2-Amino-4-Methoxy-*cis*-but-enoic acid (L-*cis*AMB) die zellulären AdoMet-Konzentrationen in L1210-Zellen innerhalb kurzer Zeit (4 h) fast vollständig herabsetzt, während Putrescin sich akkumuliert. Gleichzeitig ließ sich eine Zunahme der ODC- und der AdoMetDC-Aktivität beobachten. Weitere Derivate des L-*cis*AMB wie das Schwefelanalogon L-2-Amino-4-Methylthio-*cis*-but-3-enoic acid (L-*cis*AMTB) und L-2-Amino-4-Methylthio-*trans*-but-3-enoic acid (L-*trans*-AMBT) wurden im Folgenden ebenfalls getestet (Sufrin et al., 1993). Eine Reihe von Methioninanaloga (D-Methionin, Seleno-L-Methionin, DL-Ethionin, *cis*AMB, S-Adenosyl-L-Homocystein, Cycloleucin, α -Methyl-DL-Methionin) wurde gegen das Enzym von *T. brucei* getestet. Dabei zeigte sich, dass das natürliche Reaktionsprodukt, AdoMet, der effektivste Inhibitor war (Yarlett et al., 1993). Lavrador et al. (1998a, b) untersuchten eine Reihe von Epithio- und Epoxy-Analoga von L-Methionin und L-Methoxinin auf ihre Eigenschaft als Inhibitoren der AdoMet-Synthetase, deren inhibitorische Konstanten

im mikromolaren Bereich lagen. Einen interessanten Ansatz verfolgten auch Reczkowski und Markham (1999), die Analoga des ATP auf ihre inhibitorischen Eigenschaften hin testeten. Entsprechende Analoga wie Diimidotriphosphat (PNPNP) und Imidotriphosphat (PNP) inhibieren die AdoMet-Synthetase ebenfalls im mikromolaren Bereich.

1.4.4.3 AdoMetDC

Der zweite regulatorische Schritt der Polyaminbiosynthese wird durch die AdoMetDC katalysiert; wie für die ODC beschrieben, erfolgt die Regulation der AdoMetDC auf den Ebenen der Transkription, der Translation und der Proteinebene (Seiler und Heby, 1988; Pegg et al., 1988). Auch hier ist eine Feedback-Regulation über die intrazelluläre Polyaminmenge zu erkennen (Law et al., 2001).

Generell steigert ein Abfall der Polyaminkonzentration die Stabilität der AdoMetDC (Seiler und Heby, 1988); dies führt zu einem Anstieg der AdoMetDC-Proteinmenge und der Enzymaktivität (Pegg et al., 1987; Seiler und Heby, 1988).

Die Transkriptionsrate der AdoMetDC wird abgesehen von Hormonen (Tabor und Tabor, 1984) und Wachstumsfaktoren (Pegg et al., 1988) auch durch niedrige Spermidinkonzentrationen erhöht (Persson et al., 1988; Shantz und Pegg, 1999). Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an Spermin oder Spermidin führen zu einem Abfall der Translationsrate der AdoMetDC (Kameji und Pegg, 1987a; Shantz und Pegg, 1999). Auch diese Regulation erfolgt entsprechend der Translationskontrolle bei der ODC über die Bildung von Sekundärstrukturen im 5'-nicht-translatierten Bereich der mRNA (Kameji und Pegg, 1987a).

Die AdoMetDC wird zunächst als inaktives Proenzym translatiert (Kashiwagi et al., 1990; Tolbert et al., 2003). Posttranslationell erfolgt dann die Spaltung in eine kleine β -Untereinheit und eine große α -Untereinheit (Xiong und Pegg, 1999). Bei dieser Modifizierung wird ein katalytisch wirksamer Pyruvatrest aus der N-terminal liegenden Aminosäure Serin der α -Untereinheit gebildet (Kashiwagi et al., 1990). Die Untereinheiten bilden schließlich das aktive heterotetramere $\alpha_2\beta_2$ -Enzym. Dieser Modifikationsvorgang wird durch Putrescin stimuliert (Pegg et al., 1987) und durch erhöhte Spermidin- und Sperminkonzentrationen inhibiert (Kameji und Pegg, 1987b).

Neben der Stimulierung der Aktivität der eukaryotischen AdoMetDC durch Spermidin und Spermin kann auch Putrescin die Aktivität erhöhen (Kashiwagi et al., 1990; Clyne et al., 2002); bei der bakteriellen AdoMetDC wurde dagegen eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch Mg^{2+} beschrieben (Anton und Kutny, 1987).

Wie die ODC liegt die AdoMetDC intrazellulär nur in sehr geringen Mengen vor und besitzt eine kurze Halbwertszeit von maximal einer Stunde (Heby und Persson, 1990). Für die AdoMetDC der Sojabohne ist eine PEST-Region in der α -Untereinheit beschrieben worden (Tian et al., 2004) und auch für das Enzym der Nelke berichten Lee et al. (1997) von einer putativen PEST-Region. Das Vorhandensein einer solchen Sequenz stellt eine weitere Parallele zur ODC dar und von einer Beteiligung dieser Regionen - soweit vorhanden - an den Abbauprozessen der AdoMetDC kann ausgegangen werden.

Auch die Polyaminkonzentration beeinflusst den Abbau der AdoMetDC (Heby und Persson, 1990); Spermidin und - in noch höherem Maße - Spermin stimulieren diesen Abbauvorgang. Da Putrescin wie erwähnt das Enzym aktiviert und hohe Spermidinkonzentrationen eine inhibitorische Wirkung ausüben, hängt die AdoMetDC-Aktivität von dem Bedarf an Spermidin und der Verfügbarkeit von Putrescin ab (Pegg und McCann, 1982).

1.4.4.3.1 Inhibitoren der AdoMetDC

MGBG ist ein kompetitiver Inhibitor der AdoMetDC (Williams-Ashman und Schenone, 1972), der über das Polyamin-Transportsystem aufgenommen wird (Jänne *et al.*, 1978; Alhonen-Hongisto et al., 1980; Heby, 1981; Williams-Ashman und Seidenfeld, 1986). In Kombination mit DFMO zeigte MGBG einen deutlichen Effekt auf Leukämie bei Kindern (Siimes et al., 1981). MGBG besitzt jedoch eine hohe Toxizität hinsichtlich der Mitochondrien (Williams-Ashman und Seidenfeld, 1986), weshalb es nicht mehr als Therapeutikum eingesetzt wird.

Durch das Einfügen von Ringstrukturen in das MGBG-Skelett wurden MGBG-Analoga mit starrer Struktur erzeugt (Regenass et al., 1992; Stanek et al., 1993). Aus dieser Reihe von Inhibitoren erwies sich das 1992 entwickelte CGP 48664A (4-Amidinoindan-1-on-2'-amidinohydrazon) als sehr potenter und selektiver kompetitiver Inhibitor der AdoMetDC. Im Vergleich zu MGBG ist dessen Toxizität gegen die

Mitochondrien gering (Regenass et al., 1994). Auch CGP 40215A (bis((3-(Aminoiminomethyl)-phenyl)methylen)carbonimidhydrazidtri-hydrochlorid), ein bicyclisches MGBG-Derivat, zeigte bei *L. donovani* (Mukhopadhyay et al., 1996) und bei *T. brucei* (Bacchi et al., 1996) eine starke Wachstumsinhibierung. Neben diesen kompetitiven Inhibitoren (MGBG, CGP 48664A, CGP 40215A) war MDL 73811 (5'-((4-Amino-2-butenyl)methylamino)-5'-deoxy-adenosin) einer der ersten enzymaktivierten irreversiblen Inhibitoren der AdoMetDC (Danzin et al., 1990). Wie die anderen gegen das aktive Zentrum gerichteten Inhibitoren ist es ein Struktur analogon von dcAdoMet. MDL 73811 inaktiviert die AdoMetDC durch eine irreversible Aminierung der prosthetischen Pyruvoylgruppe (Shantz et al., 1992). Im folgenden wurden weitere AdoMetDC-Inhibitoren hergestellt, die der Struktur von dcAdoMet ähneln; auf diese Weise wurde die Tatsache genutzt, dass der Pyruvoyl-Rest der AdoMetDC in der Lage ist, Oxime und Hydrazone zu bilden. Auch das 1991 entwickelte AMA (S-(5'-Desoxy-5'-adenosyl)[(methylthio)-ethyl]hydroxylamin) bildet kovalente Bindungen mit der α -Untereinheit des Enzyms aus (Shantz et al., 1992). Erwartungsgemäß besitzen alle selektiven AdoMetDC-Inhibitoren die Eigenschaft, die Spermidin- und Sperminkonzentrationen in behandelten Zellen und Geweben herabzusetzen; eine Induktion der ODC und eine Zunahme der Putrescinkonzentrationen folgen. Trotz der starken Abnahme von Spermidin und Spermin zeigte eine kurzzeitige Behandlung von Zellen mit dcAdoMet-Analoga-Inhibitoren (AMA und MDL 73811) nur einen überraschend geringen Effekt auf das Zellwachstum (Pegg et al., 1988; Kramer et al., 1989; Stjernborg et al., 1993).

1.4.5 Polyaminstoffwechsel von *P. falciparum*

Der Polyaminstoffwechsel in *P. falciparum* ist im Vergleich zu dem der Säugetiere weitaus weniger komplex (Abb. 7). Die Enzyme zur Interkonversion von Spermin und Spermidin fehlen und eine SpmSyn ist ebenfalls nicht vorhanden. Trotz der fehlenden SpmSyn lassen sich in *P. falciparum* dennoch geringe, aber detektierbare Mengen an Spermin nachweisen, was damit zusammenhängt, dass die SpdSyn neben der Bildung von Spermidin auch die Umsetzung von Spermidin zu Spermin katalysiert, wenn auch nur in geringem Maße (Haider et al., 2005).

Wie in dem Polyaminstoffwechsel der Säugetiere wird auch bei *P. falciparum* zunächst Arginin durch die - kürzlich charakterisierte - Arginase (Müller et al., 2005) in Ornithin überführt, welches dann durch die ODC zu Putrescin decarboxyliert wird. Durch die Addition einer Aminopropylgruppe wird aus Putrescin dann Spermidin gebildet. Übereinstimmend mit dem Polyaminstoffwechsel bei Säugetieren stammen die Aminopropylgruppen aus dem AdoMet, das von der AdoMet-Synthetase aus Methionin synthetisiert und anschließend durch die AdoMetDC decarboxyliert wird.

Hinsichtlich einer möglichen Hypusinbiosynthese konnten Kaiser et al. (2001) in zwei untersuchten *P. falciparum*-Stämmen Homospermidin nachweisen. Darüber hinaus klonierten und exprimierten Molitor et al. (2004) ein plasmodiales eIF-5A- Gen. Dies weist darauf hin, dass zumindest eines der im Polyaminmetabolismus der Säugetiere vorhandenen spermidinmetabolisierenden Enzyme auch im Parasiten vorhanden sein könnte; basierend auf diesen Daten wird das Vorhandensein einer Hypusinbiosynthese im Polyaminstoffwechsel von *P. falciparum* postuliert (Kaiser et al., 2001).

Wie zuvor beschrieben, werden sowohl ODC als auch AdoMetDC in allen zuvor untersuchten Organismen durch zwei verschiedene Genorte repräsentiert und infolgedessen individuell transkribiert und exprimiert. Für die Regulation der Polyaminbiosynthese sind beide Enzyme essentiell; die Kontrolle dieser beiden Schlüsselenzyme wiederum unterliegt einer Regulation sowohl auf transkriptioneller, translationeller als auch posttranslationeller Ebene. Im Falle von *P. falciparum* werden ODC und AdoMetDC von einem einzigen RNA-Transkript codiert; das entsprechende Protein zeigt sowohl ODC- als auch AdoMetDC-Aktivität (Müller et al., 2000).

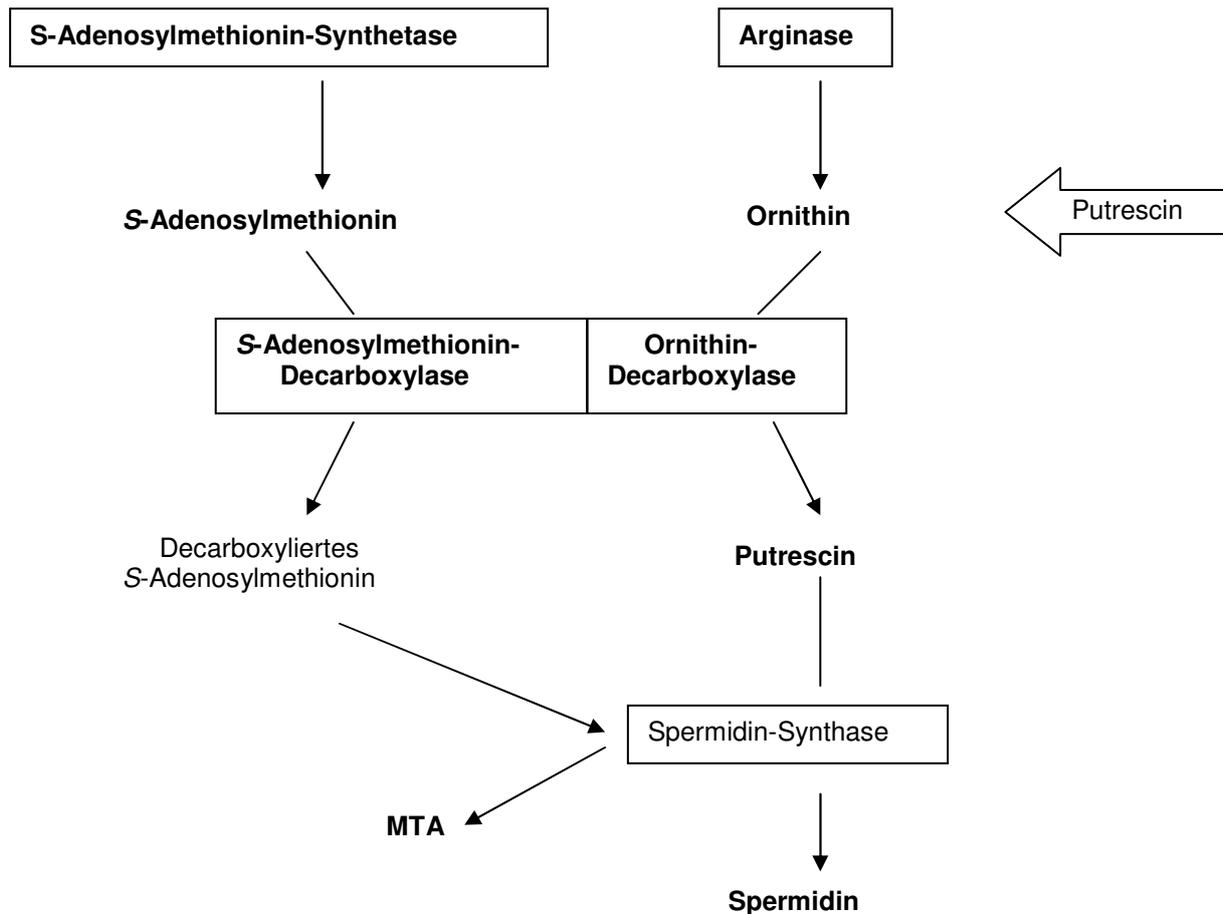


Abb. 7: Polyaminstoffwechsel von *P. falciparum*.

Derartige Proteine mit vergleichbaren bifunktionellen Eigenschaften sind in *P. falciparum* nicht ungewöhnlich und konnten bereits zuvor identifiziert werden, wobei neben der Dihydropteroat-Synthetase/Dihydro-6-Hydroxymethylpterin-Pyrophosphokinase (Triglia und Cowman, 1994) besonders die Thymidylat-Synthase/Dihydrofolat-Reduktase (DHFR/TS) ein gründlich charakterisiertes bifunktionelles Protein darstellt. Die Organisation beider Domänen ist mit der der AdoMetDC/ODC von *P. falciparum* vergleichbar. Die DHFR bzw. AdoMetDC ist N-terminal, die TS bzw. ODC C-terminal lokalisiert, die beiden Domänen sind durch eine sogenannte Hinge-Region miteinander verbunden (Grumont et al., 1986; Bzik et al., 1987; Hughes et al., 1989). Bezüglich des biologischen Sinns und der möglichen Vorteile solcher bifunktionalen Proteine liegt die Vermutung nahe, dass durch eine derartig koordinierte Synthese von Enzymen eines Reaktionswegs eine einfachere und effizientere Expressionskoordination realisiert werden kann. Eine individuelle und aufeinander abgestimmte Regulation wird dadurch unnötig (Ivanetich und Santi, 1990).

Ein wesentlicher Kontrollmechanismus der Polyaminsynthese wird durch die zelluläre Polyaminkonzentration ausgeübt; Putrescin verursacht in Säugetieren sowohl eine vermehrte Prozessierung als auch eine gesteigerte Aktivität der AdoMetDC (Kameji und Pegg, 1987b). Im Gegensatz dazu ist bei der plasmodialen AdoMetDC keine Stimulierung zu erkennen. Putrescin wirkt aufgrund der Tatsache, dass der K_i -Wert (68 μM) niedriger ist als die *in vivo* Konzentration von Putrescin (81 μM) - was auf eine Feedback-Inhibierung der ODC durch Putrescin hinweist - sogar eher als physiologischer Inhibitor der ODC von *P. falciparum* (Wrenger et al., 2001).

Die Konzentrationen der Substrate für beide Enzyme unterscheiden sich in *P. falciparum* erheblich; die Ornithin-Konzentration beträgt 29 μM , die von AdoMet nur 4,5 μM . Da die ODC und die AdoMetDC des bifunktionellen Proteins von *P. falciparum* vergleichbare spezifische Aktivitäten und ähnliche K_m -Werte aufweisen (58 μM für AdoMet, 41 μM für Ornithin), liegt die Vermutung nahe, dass im Vergleich zu dcAdoMet weitaus mehr Putrescin synthetisiert wird. Infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation von Putrescin, was wiederum eine verstärkte Feedback-Inhibierung der ODC bewirkt. Limitierender Faktor bei der Spermidin-Synthese ist demnach dcAdoMet; dies wurde bereits für Säugetierzellen diskutiert (Pegg, 1986).

Darüber hinaus erfolgt eine Regulation aufgrund der kurzen Halbwertszeiten der ODC und AdoMetDC. Bei Säugetieren werden diese Halbwertszeiten der ODC (maximal 1 h) durch das Antizym und die PEST-Region vermittelt; die für eine PEST-Region charakteristische Häufung der Aminosäuren Prolin, Glutamat und Serin ist auch in der AdoMetDC/ODC von *P. falciparum* vorhanden. Ein für das Antizym codierendes Gen ist jedoch bei *P. falciparum* nicht gefunden worden, was die - im Vergleich zu den Säugetierenzymen - längere Halbwertszeit des bifunktionellen Enzyms von über zwei Stunden erklärt.

Bemerkenswert an der plasmodialen AdoMetDC/ODC ist darüber hinaus die ungewöhnliche Größe des Proteins, zum einen bedingt durch die bifunktionellen Eigenschaften des Proteins, zum anderen durch die 275 Aminosäuren lange Hinge-Region sowie durch Insertionen in ODC und AdoMetDC. Homologien zu ODC und AdoMetDC anderer Organismen werden durch diese Insertionen unterbrochen; sie sind jedoch in *P. falciparum* nicht ungewöhnlich und kommen unter anderem im Heat shock-Protein HSP 90, in Proteinkinasen, RNA-Polymerasen und in der γ -Glutamyl-cystein-Synthetase vor (Perryman et al., 1986; Giesecke et al., 1991; Bonnefoy et al., 1994; Lüersen et al., 1999). Hinsichtlich der Funktionen solcher Insertionen wird

vermutet, dass sie zur Ausbildung der Proteinstruktur beitragen und darüber hinaus aufgrund ihres besonderen Aufbaus an der Abwehr der Immunantwort des Wirtes beteiligt sind. Auch eine Interaktion mit regulatorischen Proteinen ist vermutet worden (Kemp et al., 1987; Schofield, 1991; Reeder und Brown, 1996). Diese parasitenspezifischen Insertionen, die typischerweise hydrophile Regionen enthalten, stellen Domänen dar, die aus dem Kern des Proteins herausragen (Pizzi und Frontali, 2001). Verschiedene Deletions-Mutagenesen der parasitenspezifischen Inserts der bifunktionalen *PfAdoMetDC/ODC* und den monofunktionalen Domänen zeigen, dass die Insertionen für die Aktivität essentiell sind. Die größte dieser Insertionen ist für beide Decarboxylase-Aktivitäten in der bifunktionalen *PfAdoMetDC/ODC* wichtig; ihre Entfernung resultiert in Konformationsänderungen, die zu einem Verlust der katalytischen Aktivität führen, was darauf hinweist, dass auch hier Interdomänen-Interaktionen unterbrochen werden (Birkholtz et al., 2004). In beiden Domänen der plasmodialen *AdoMetDC/ODC* sind konservierte Bereiche vorhanden, verantwortlich für die katalytische Aktivität, die Dimerisierung sowie die Prozessierung (Wrenger et al., 2001). So ist die Prozessierungsstelle in der *AdoMetDC* eine hochkonservierte Region, an der die autokatalytische Spaltung in eine große α -Untereinheit mit der enzymatisch aktiven Pyruvoylgruppe und eine kleine β -Untereinheit stattfindet (Stanley, 1989). Ebenfalls hochkonserviert sind in der *ODC*-Domäne die Bindungsstellen für die prosthetische Gruppe Pyridoxalphosphat (PLP) sowie die am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren (Kern et al., 1999).

Transportmechanismen zur Aufnahme von Polyaminen konnten bisher bei *P. falciparum* nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde für das intraerythrozytäre Stadium von *P. knowlesi* ein Putrescin-Transporter beschrieben. Hier zeigten die Trophozoiten einen zeit- und temperaturabhängigen Putrescin-Influx, der weder durch andere Aminosäuren noch durch Spermidin oder Spermin beeinflusst werden konnte, was ein deutlicher Hinweis auf einen spezifischen Transport für Putrescin zu sein scheint (Singh et al., 1997). Die Tatsache, dass die Zugabe externen Putrescins die cytostatische Wirkung von *ODC*-Inhibitoren aufheben kann (Assaraf et al., 1984, 1987) zeigt jedoch deutlich, dass ein Aufnahmesystem zumindest für dieses Polyamin vorhanden sein muss.

1.5 Zielsetzung

Ein zentrales Problem bei der Malariabekämpfung ist die Tatsache, dass *P. falciparum* in zunehmendem Maße Resistenzmechanismen gegen die herkömmlichen Malariamedikamente entwickelt. Deshalb besteht eine dringende Notwendigkeit, die Stoffwechselwege des Parasiten hinsichtlich möglicher Angriffspunkte für Chemotherapeutika zu analysieren sowie neue Verbindungen zu entwickeln und zu untersuchen, die essentielle Schlüsselenzyme inhibieren und die entsprechenden Stoffwechselwege blockieren.

Polyamine sind weit verbreitet und für die Zellproliferation und Differenzierungsprozesse essentiell. Wie Tumorzellen weisen auch die erythrozytären Stadien von *P. falciparum* eine hohe Proliferationsrate auf. Da diese Vermehrungsprozesse große Mengen an Polyaminen benötigen, scheint die Polyaminbiosynthese von *P. falciparum* ein viel versprechender Angriffspunkt zu sein, um in Entwicklung, Wachstum und Vermehrung dieses Parasiten einzugreifen. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Konzentrationen der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin im Verlauf der erythrozytären Schizogonie des Parasiten. Da Parasit und Wirtszelle auf Grund der endoparasitischen Lebensweise eine Einheit bilden, sollte darüber hinaus die Polyaminverteilung in den Parasiten- und Erythrozytenkompartimenten der Parasit-Wirtszellen-Einheit untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten die Voraussetzungen dafür liefern, die Wirkung von Inhibitoren des Polyaminstoffwechsels zu analysieren.

Die AdoMet-Synthetase katalysiert die Bildung von AdoMet aus Methionin und ATP und stellt damit das Vorläufermolekül für das decarboxylierte AdoMet zur Verfügung, das für die Synthese von Spermidin und Spermin benötigt wird. Daten über die biochemischen Parameter der plasmodialen AdoMet-Synthetase stehen bisher nur in begrenztem Umfang zur Verfügung. Aus diesem Grund sollte dieses Enzym rekombinant exprimiert und biochemisch charakterisiert werden.

Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte ist eine neue Generation von ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren entwickelt worden, deren inhibitorisches Potential z.T. weit über dem ihrer Mutterverbindungen liegt. Um das Wirkungsspektrum dieser Inhibitoren auf die Enzymaktivitäten zu untersuchen, sollte die bifunktionelle AdoMetDC/ODC von *P. falciparum* ebenfalls rekombinant exprimiert werden.

Für die Inhibitoren der ODC (APA, CGP 54169A, CGP 52622A, AO-Agmatin, GAPA, bis-GAPA), der AdoMetDC (MDL 73811, CGP 40215A, CGP 48664A) und der AdoMet-Synthetase (Selenomethionin, Cycloleucin) sollten zunächst die Inhibitorkonstanten der jeweiligen Inhibitoren auf die Enzymaktivität bestimmt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern sich die Inhibition des Enzyms auf das Wachstum der Plasmodienzellen in Kultur auswirkt und in welchem Maße die Polyamin- bzw. die AdoMet-Konzentrationen nach Behandlung der Parasiten betroffen sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Amersham Biosciences

[α -³²P]dATP (3000 Ci mmol⁻¹), [α -³⁵S]dATP (1000 Ci mmol⁻¹), L-[1-¹⁴C]-Ornithin (50 mCi mmol⁻¹), S-Adenosyl-L-[Carboxy¹⁴CO₂]-Methionin (56mCi mmol⁻¹), L-[methyl-³H]Methionin, Percoll, Sequenase

Becton Dickinson

BBL Agar, BBL Hefeextrakt, BBL Trypticase Pepton

Biomol

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-Gal), Ethylendiamintetraessigsäure-Na₂-Salz (EDTA), Lysozym, Dithiothreitol (DTT)

Bio-Rad Laboratories

Elektrophoresemarker für SDS-PAGE

Boehringer

Tetracyclin

Ciba Geigy

CGP 40215A, CGP 48664A, CGP 52622A, CGP 54169A

Deltaselect

Gentamycinsulfat (Gencin)

Eurogentec

Agarose, dNTPs

Fluka

Diaminohexan, 1-Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat, Putrescin, Spermidin, Spermin, Toluol

Gibco

Albumax, RPMI 1640-Medium

Institut für Bioanalytik (IBA)

Anhydrotetracyclin

Invitrogen

Blunt II-TOPO Cloning Kit, Trizol-Reagenz, Taq-DNA-Polymerase

MBI Fermentas

Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)

Merck

Aceton, Brij 35, Calciumchlorid-Dihydrat, Chloroform, Coomassie Brilliant Blue G-250, Essigsäure, Ethanol, Giemsa-Lösung, Hayems Reagenz, D-Glucose-Monohydrat, Immersionsöl, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, *di*-Kaliumhydrogenphosphat Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Methanol, LiChrosolv Methanol (HPLC grade), Natriumchlorid, *di*-Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxyd, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Phosphorsäure, Perchlorsäure, Triethylamin, Salzsäure

New England Biolabs

Proteinase K, Restriktionsenzyme

Omnilab Life Sciences

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Packard Bioscience

ULTIMA Gold Szintillationsflüssigkeit

Promega

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl (Tris-HCl), *Pfu*-DNA-Polymerase

Ratiopharm

Gentamycin

Roche

Rinderserumalbumin (BSA), RNase, Hi-Fi-DNA-Polymerase

Roth

Acrylamid/Bisacrylamid, Ampicillin, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Glaswolle

Serva

Alanin, Dansylchlorid, Dialyseschläuche, Saponin

Sigma

Adenosin-5-Triphosphat (ATP), S-(5'-Adenosyl)-L-Methioninchlorid, Acetonitril, Chloramphenicol, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethidiumbromid, Glycerin, Hypoxanthin, Kanamycin, Kodak Biomax MR, Seleno-L-Methionin, 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin, Mineralöl, Natriumbicarbonat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Protease-Inhibitoren-Cocktail, D-Sorbitol

2.2 Puffer und Stammlösungen

Agarose-Gelelektrophorese-Puffer

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 0,3 M Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

TBE-Puffer : 90 mM Tris/90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0

6-fach Probenpuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% Glycerol

Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)

116 mM NaCl, 1,3 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM CaCl₂, 5,4 mM KCl, 0,64 mM MgSO₄, 26,2 mM NaHCO₃, 5 mM Glucose

Coomassie-Färbung

Fixierlösung:	20% Trichloressigsäure
Färbelösung:	Färbelösung A: 0,2% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 96% Ethanol
Färbelösung B:	20% Eisessig in dH ₂ O Färbelösungen A und B im Verhältnis 1:1
Entfärbelösung:	20% Ethanol, 10% Eisessig

Hybridisierungslösungen

20 x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
100 x Denhardt's:	2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% BSA
SM-Puffer:	100 mM NaCl, 10 mM MgSO ₄ ·7 H ₂ O, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,01% Gelatine

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

1,0% Trypticase-Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1,0% NaCl
(bei Ansetzen von LB-Agar + 1,5% Agar)

Lösungen für DNA-Präparationen

STET-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 5% (v/v) Triton X- 100, 8% Sucrose
New Wash:	50% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,05 mM EDTA, pH 8,0, 50 mM NaCl
Glasmilch:	12% Siliziumoxid, 0,12% HCl in dH ₂ O

Proteinbestimmungen

Bradford-Reagenz:	0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% Ethanol, 8% H ₃ PO ₄
-------------------	--

SDS-Gelelektrophorese

2 x SDS-Probenpuffer:	70 mM Natriumdodecylsulfat (SDS), 5% β-Mercapto- ethanol, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 mg/ml Brom- phenolblau
-----------------------	---

PBS-Puffer

10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM K₂HPO₄, 2,6 mM KCl, 136,9 mM NaCl, pH 7,4

HT (human tonicity)-PBS-Puffer

16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 126,6 mM NaCl, pH 7,2

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

2.3 Vektoren und Bakterienstämme**2.3.1 Vektoren**

pJC 20	(Clos und Brandau, 1994)
pJC 40	(Clos und Brandau, 1994)
pASK-IBA3	(IBA)

2.3.2 Bakterienstämme

E. coli-Zellen

DH5α	(Stratogene)
EWH 331	(Hafner <i>et al.</i> , 1979)
Rosetta gami B	(Stratogene)
BLR DE3 pLys S	(Invitrogen)
One-Shot TOP10	(Invitrogen)

2.4 Kultivierung von *P. falciparum***2.4.1 Herstellung des RPMI 1640 - Mediums**

Ein Liter RPMI 1640-Medium enthielt 15,6 g RPMI 1640, 1 g Natriumbicarbonat, 2 g D-Glucose, 5 g Albumax sowie 0,028 g Hypoxanthin (gelöst in 2 ml 1N NaOH). Der pH-Wert wurde mit 10 N NaOH auf 7,4 eingestellt; nach Hinzufügen von 500 µl Gentamycin wurde das Medium sterilfiltriert.

2.4.2 Kulturführung

Für die Kulturführung der Plasmodien (Stamm 3D7, Niederlande) wurden humane Erythrozyten der Blutgruppe A⁺ verwendet. Die Plasmodienkultur wurde zum einen in Petrischalen (Durchmesser 9,2 cm; Greiner), zum anderen in Kulturflaschen (150 cm², Nerbe) geführt. Der Hämatokritanteil betrug jeweils 4% (v/v).

Das RPMI 1640-Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und mit einem Gasgemisch aus 90% N₂, 5% O₂, 5% CO₂ begast und dann bei 37°C gehalten (Trager und Jensen, 1976; Jensen und Trager, 1977).

Zur Bestimmung der Parasitämie wurden der Kultur Erythrozyten entnommen, auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Nach einer Fixierung in Methanol für etwa 30 sec folgte für 15 min ein Färbeprozess in einer 10%igen (v/v) Giemsa-Lösung in Giemsa-Puffer (0,49 g KH₂PO₄ und 1,09 g Na₂HPO₄). Schließlich wurde der Objektträger mit Leitungswasser abgespült, luftgetrocknet und bei einer 1000-fachen Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) analysiert. Die Parasitämie wurde durch das Zählen der infizierten Zellen pro 500-1000 Erythrozyten bestimmt und dann prozentual dargestellt.

2.4.3 Synchronisation von *P. falciparum* mit Sorbitol

Für eine Synchronisation der Plasmodienkulturen wurde eine vorwiegend aus Ringstadien bestehende Kultur in 50 ml-Falcontubes zentrifugiert (1500 rpm, RT, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 Pelletvolumen einer auf 37°C vorgewärmten, 5%igen (w/v) Sorbitollösung resuspendiert und bei 37°C für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm und bei RT für 5 min. Für die weitere Kultivierung wurde das Erythrozytenpellet zweimal mit RPMI 1640-Medium gewaschen und wieder in RPMI-Medium aufgenommen.

Die eingesetzte Sorbitollösung führt zu einer Lyse der mit den späten Parasitenstadien - Trophozoiten und Schizonten - infizierten Erythrozyten; die mit frühen Ringstadien infizierten Erythrozyten werden nicht lysiert, weshalb auf diesem Wege eine Synchronisation der Kultur erreicht wird. Ursache für diese differenzielle Lyse ist, dass reifere Plasmodienstadien im Gegensatz zu den jüngeren Stadien in der Plasmamembran der Erythrozyten eine Porenbildung induzieren; der sogenannte

„plasmodial erythrocyte surface anion channel“ (PESAC) liegt in infizierten Erythrozyten in etwa 1000–2000 Kopien pro Zelle vor und ist in nichtinfizierten RBCs nicht nachzuweisen (Desai et al., 2000; Wagner et al., 2003). Von zwei weiteren solchen Anion-Kanälen mit ähnlichen Eigenschaften wie PESAC ist berichtet worden (Huber et al., 2002; Egee et al., 2002). Diese Kanäle ermöglichen eine vermehrte Aufnahme von niedermolekularen Substanzen wie z. B. Sorbitol. Normalerweise ist die Erythrozytenmembran für Sorbitol undurchlässig, aber die durch den Parasiten induzierten Kanäle in der Membran der infizierten Zelle erlauben den Eintritt des Sorbitols. Infolgedessen schwellen die mit späten Plasmodienstadien infizierten Erythrozyten in der verwendeten isoosmotischen Sorbitollösung durch die Aufnahme von Wasser und Sorbitol bis zur Lyse an (Ginsburg et al., 1983; Aley et al., 1986; Braun-Breton, 1990; Go et al., 2004). Die Zellyse findet statt, wenn die durch die Sorbitolaufnahme bedingte Volumenzunahme ein kritisches, hyperosmotisches Volumen erreicht (Oberfläche des Erythrozyten = $137 \mu\text{m}^2$). Um dieses Volumen zu erreichen, akkumulieren die Zellen unter experimentellen Bedingungen eine Sorbitolmenge von etwa 14 fmol (Wagner et al., 2003).

2.4.4 Trennung der Parasitenstadien mittels eines diskontinuierlichen Percoll-L-Alanin-Gradienten

Die Verwendung eines diskontinuierlichen Percoll-L-Alanin-Gradienten ermöglicht die Auftrennung der verschiedenen Stadien einer *P. falciparum*-Kultur aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte (Aley et al., 1986; Kanaani und Ginsburg, 1989). Zu diesem Zweck wurde steriles Percoll mit 10-fach konzentriertem RPMI 1640-Medium auf eine 90%ige (v/v) isotonische Lösung verdünnt und 3% (w/v) L-Alanin hinzugegeben (Lösung A). Ausgehend von dieser 90%igen Lösung wurde der Percoll-Anteil durch Zugabe von Lösung B (3% L-Alanin (w/v) in 0,9% NaCl) zur Lösung A in entsprechenden Mengen auf jeweils 80%, 85%, 70% oder 60% gesenkt. Die hypertonischen Percoll-L-Alanin-Lösungen wurden dann auf 37°C erwärmt und für den Aufbau eines diskontinuierlichen Percoll-L-Alanin-Gradienten verwendet. Dazu wurden in ein Falcontube 6 ml der 90%igen Percoll-L-Alanin-Lösung vorgelegt und nacheinander mit 5 ml der 80%igen, 5 ml der 70%igen und 4 ml der 60%igen Percoll-L-Alanin-Lösung überschichtet. Gleichzeitig wurden die zu untersuchenden

Plasmodien-Kulturen in Falcontubes bei RT für 10 min bei 2000 rpm (BS4402/A-Rotor, Heraeus) abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit RPMI 1640-Medium gewaschen und anschließend in mindestens einem Pelletvolumen Lösung B aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann vorsichtig auf den Percoll-Gradienten gegeben. Die Auftrennung der verschiedenen Parasitenstadien erfolgte durch eine Zentrifugation bei RT in einer Sorvall-Zentrifuge für 20 min bei 10000 rpm in einem Festwinkelrotor (SS 34) oder in einer Heraeus Sepatech-Zentrifuge für 25 min bei 4000 rpm.

Wie erwähnt hängt die Verteilung der Parasitenstadien im Gradienten von ihrer jeweiligen Zelldichte ab; da Erythrozyten, die mit späteren Parasitenstadien infiziert sind, L-Alanin in weitaus größerer Menge aufnehmen (vgl. 2.4.3), schwellen sie in der eingesetzten 3%igen L-Alanin-Lösung an und ihre Dichte nimmt entsprechend ab. Infolgedessen lagern sich mit Schizonten infizierte Erythrozyten zwischen 60% - 70% Percoll, mit Trophozoiten infizierte Erythrozyten dagegen zwischen 70% - 80% Percoll an. Im Gegensatz dazu schrumpfen nichtinfizierte und mit Ringstadien infizierte Erythrozyten in der hypertonischen Percoll-L-Alanin-Lösung und ihre Dichte nimmt zu. Diejenigen Erythrozyten, die mit Ringstadien infiziert sind, lagern sich im oberen Bereich der 90%igen Percoll-Schicht an und sind damit von den nichtinfizierten Erythrozyten, welche sich im unteren Bereich der 90%igen Percoll-Phase befinden, getrennt. Die mit Ring-, Trophozoiten- bzw. Schizontenstadien infizierten RBC wurden anschließend zweimal mit Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) oder 0,9%iger NaCl₂-Lösung gewaschen und nach dem jeweiligen Waschschrift zentrifugiert (10 min, 2000 rpm).

2.4.5 Isolierung der Parasiten durch Verwendung von Streptolysin O

Aufgrund der endoparasitischen Lebensweise bilden *P. falciparum* und Erythrozytenzelle eine Einheit. Um die Verteilung von Metaboliten in dieser Einheit untersuchen zu können, ist eine Trennung von Parasit und Wirtszelle erforderlich; eine solche Trennung kann durch die Verwendung von Streptolysin O (SLO) erreicht werden.

SLO wurde in einer Konzentration von 100 µg/1,2 ml 2,33 mM KH₂PO₄, 8,33 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl und 1 mM DTT gelöst, in 16 µl- bzw. 32 µl- Aliquots auf vorgekühlte 500 µl - Eppendorfgefäße verteilt und bei -70°C gelagert. Die mittels

eines Percoll-Alanin-Gradienten angereicherten infizierten Erythrozyten wurden zunächst zweimal mit 0,9%iger NaCl₂ gewaschen (10 min bei 4°C und 2000 rpm, BS4402/A-Rotor, Heraeus). Je 20 µl Zellpellet wurden dann in 180 µl 0,9% NaCl₂ in 1,5 ml Eppendorfgläsern vorsichtig resuspendiert. An den Rand des Eppendorfgläses wurden dann 16 µl der SLO-Lösung (1,43 µg) pipettiert und der Reaktionsansatz durch kurzes Vortexen gemischt. Nach einer Inkubation für 6 min bei RT, wobei der Ansatz in regelmäßigen Abständen (alle 2 min) vorsichtig gemischt wurde, wurden die Zellen bei 4°C und 1500 rpm für 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert (Rotor F45-24-11) und zweimal mit 0,9% NaCl₂ gewaschen, bevor sie für weitere Analysen verwendet wurden. Sowohl der das Cytosol der Erythrozyten enthaltende Überstand als auch die isolierten Parasiten im Pellet wurden bezüglich des Polyamingehalts untersucht. SLO ist ein porenbildendes Toxin, das an cholesterinhaltige Membranstrukturen bindet und 25-100 nm lange und ca. 7,5 nm breite Poren bildet; durch Penetration der apolaren Domäne des Membran-Bilayers werden unter den beschriebenen Bedingungen selektiv die Plasmamembranen der Erythrozyten durchlöchert. Infolgedessen läuft das Cytoplasma der Erythrozyten aus, während sowohl die parasitophore Vakuole als auch die Plasmamembran des Parasiten intakt bleiben (Bhakti et al., 1985; Ansorge et al., 1997).

2.4.6 Isolierung der Parasiten durch Saponinlyse

Um Plasmodien aus infizierten Erythrozyten zu isolieren, wurde eine *P. falciparum*-Kultur zunächst für 10 min bei 4°C und 2000 rpm (BS4402/A-Rotor, Heraeus) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 2 Pelletvolumen 0,2%igen Saponin, angesetzt in RPMI 1640, resuspendiert und für 10 min unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert. Saponin interagiert mit den Sterolen in der Zellmembran der Erythrozyten, was zur selektiven Lyse der Erythrozyten führt; der Parasit hingegen bleibt intakt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 4°C und 2800 rpm (BS4402/A-Rotor, Heraeus) zentrifugiert und das Parasitenpellet nach zweimaligem Waschen mit eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung für weitere Analysen verwendet bzw. bei 70°C gelagert.

2.5 Automatische Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Erythrozytenzellzahl wurde in einem Cell Counter (Coulter Max M; Coulter Electronics, Krefeld, Germany) durchgeführt. Dazu wurden 20 µl der Erythrozytensuspension in 180 µl Hayem-Lösung fixiert.

Alternativ wurde die Zellzahlbestimmung in einigen Fällen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

2.6 Markierung der Polyamine durch Dansylierung der Aminogruppen

Die Bestimmung der Polyaminmengen in den Erythrozyten und den Parasiten erfolgte nach Seiler und Knödgen (1978). Hierzu wurden die infizierten Erythrozyten nach Auftrennung im diskontinuierlichen Percoll-L-Alanin-Gradienten in dH₂O aufgenommen und die Proteine durch Zugabe von 0,2 M Perchlorsäure über Nacht bei 4°C gefällt. Den Proben wurde 5,74 µg/10 µl 1,6-Diaminohexan als interner Standard beigefügt. Die Samples wurden dann für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und durch Zugabe von NaHCO₃ bis zur Sättigung auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Nach Vortexen wurde das dreifache Volumen Dansylchlorid (2 mg/ml Aceton) hinzugegeben; nach erneutem Vortexen erfolgte die Markierungsreaktion im Dunkeln entweder über Nacht bei RT oder für 30 min bei 37°C. Dansylchlorid reagiert mit primären Aminen und bildet dansylierte Polypeptide. Durch saure Hydrolyse werden die Peptidbindungen gespalten und es entsteht eine N-terminale Dansylaminosäure mit intensiver gelber Färbung, die chromatographisch im pmolaren Bereich identifiziert werden kann. Durch die anschließende Zugabe von 1 ml Toluol wurde die Dansylierungsreaktion gestoppt und die dansylierten Polyamine gingen quantitativ in die organische Phase über. Wenn im HPLC-Chromatogramm der Verlauf der Basislinie einen oder mehrere Polyaminpeaks verdeckte, wurde das Toluolextrakt nach der Methode von Seiler et al. (1978) über eine Kieselgelsäule vorgereinigt. Überschüssiges Dansylchlorid und dansylierte Aminosäuren wurden hierdurch von der Probe abgetrennt. Dafür wurde eine Glassäule (0,7 x 20 cm) mit einer Kieselgel (mesh 70-230)/Toluol-Suspension gefüllt und mit Toluol gewaschen. Anschließend wurden die aus der Dansylierung erhaltenen Toluolphasen aufgetragen und mit 10 ml Toluol/Triethylamin (9:1, v/v)

gewaschen. Die Eluate wurden verworfen. Die auf der Säule verbleibenden dansylierten Polyamine konnten mit 10 ml Ethylacetat eluiert werden, wobei das Eluat gesammelt und auf Eppendorftubes portioniert wurde. Nach der Toluolextraktion wurden die Proben in einer SpeedVac (Savant SVC 100) bis zur Trockne eingedampft. Das Pellet wurde in 100 ml Methanol/Essigsäure (95:5, v/v) aufgenommen und wie unter 2.8 beschrieben analysiert.

2.7 Dansylierung der Polyaminstandards

Für die Eichung der HPLC wurden folgende Polyaminstandards verwendet:

0,493 mM 1,6-Diaminohexan

0,266 mM Putrescin-Dihydrochlorid

0,246 mM Spermidin-Dihydrochlorid

0,274 mM Spermin-Dihydrochlorid

Die Polyaminstandards wurden in 0,01 N HCl gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Für die Dansylierung wurden 10 µl dieser Standardlösungen zu 1 ml dH₂O in ein verschließbares Glasröhrchen gegeben und NaHCO₃ bis zur Sättigung zugesetzt. Nach Vortexen wurde zu jedem Ansatz 1 ml Dansylchlorid (2 mg/ml Aceton) hinzugefügt, erneut gevortext und die Proben dann für 30 min bei 37°C oder über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert. Mit 1 ml Toluol wurden die dansylierten Polyamine anschließend quantitativ extrahiert und die organische Phase in Eppendorftubes überführt. Die Toluolextrakte wurden in der Vakuumzentrifuge evaporiert und das trockene Pellet in 100 µl Methanol/Essigsäure (95:5, v/v) resuspendiert.

2.8 Bestimmung der Polyaminkonzentrationen mittels reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die reversed-phase HPLC-Analyse der Polyaminkonzentrationen wurden 50 µl der dansylierten Derivate auf eine Spherisorb ODS II-Säule (5 µm, 250 x 3 mm, Machery-Nagel, Düren, Germany) aufgetragen. Die Bestimmung der Polyamin-

mengen erfolgte nach zwei Methoden; die erste (modifiziert nach Seiler und Knödgen, 1978) bestand aus Methanol (Phase A) und dH₂O (Phase B) mit folgendem Gradienten:

Zeit [min]	0,0	25,0	37,5	46,25	50,0	52,5	62,5
Phase B [%]	57,5	67,5	82,5	100,0	100,0	57,5	57,5

Die Eichung der Säule erfolgte mit den Verbindungen Putrescin, Diaminohexan, Spermidin und Spermin in folgenden Konzentrationen:

Verbindung	Menge (ng)				
Putrescin - Dihydrochlorid	7,13	10,70	14,27	21,40	35,67
Diamonhexan - Dihydrochlorid	9,57	14,35	19,13	28,70	47,83
Spermidin - Dihydrochlorid	10,43	15,65	20,87	31,30	52,17
Spermin - Dihydrochlorid	15,90	23,85	31,80	47,70	79,50

Alternativ wurde auch eine Acetonitril-Phase (modifiziert nach Hayman und Gray, 1985; Kabra, 1986) verwendet. Die mobile Phase A dieses acetonitrilhaltigen Gradienten bestand aus NaHPO₄ (20 mM), Triethylamin (0,4%) und Acetonitril (30%). Als Phase B wurde nur Acetonitril (100%) eingesetzt. Der Gradient sah hier folgendermaßen aus:

Zeit [min]	0,0	20,0	36,0	42,0	54,0	56,0	64,0
Phase B [%]	0,0	38,5	50,0	82,0	87,0	87,0	0,0

Auch in diesem Fall wurde die Säule zuvor mit den gleichen Verbindungen geeicht:

Verbindung	Menge (ng)				
Putrescin - Dihydrochlorid	42,80	85,60	128,40	171,20	214,00
Diamonhexan - Dihydrochlorid	57,40	114,80	172,20	229,60	287,00
Spermidin - Dihydrochlorid	62,60	125,20	178,80	250,40	313,00
Spermin - Dihydrochlorid	95,50	190,80	286,20	381,60	477,00

Aufgrund des kontinuierlich ansteigenden Anteils an Methanol bzw. Acetonitril werden die verschiedenen Verbindungen mit unterschiedlichen Retentionszeiten von der Säule eluiert und können somit identifiziert werden. Die jeweiligen Mengen an dansylierten Polyaminen wurden dann mittels eines Fluoreszenzspektrometers (Exikation 365 nm, Emission 485 nm; SFM 25, Kontron) gemessen und konnten mit Hilfe des dansylierten Anteils des internen Standards quantifiziert werden.

2.9 Bestimmung der AdoMet- und Methylthioadenosin (MTA)-Konzentrationen mittels HPLC

Für die reversed-phase HPLC-Analyse der AdoMet- und MTA-Konzentrationen wurden 50 µl der Proben auf eine Spherisorb ODS II Säule (5 µm, 250 x 3 mm, Machery-Nagel, Düren, Germany) aufgetragen. Für die Bestimmung der AdoMet- und der MTA-Mengen wurden die Methoden nach Wagner et al. (1981) angewendet; die mobilen Phasen bestanden aus 2% (v/v) Acetonitril und 98% (v/v) NaH₂PO₄ (0,1 M), Oktansulfonsäure (8 mM) und 0,1 mM EDTA (Phase A). Der pH-Wert wurde mit H₃PO₄ auf 2,55 eingestellt. Phase B bestand aus einer 70:30 (v/v)-Mischung aus NaH₂PO₄ (0,2 M) und Acetonitril mit 8 mM Oktansulfonsäure; auch hier wurde für das Einstellen des pH-Werts (3,1) H₃PO₄ verwendet. Der Gradient für die Trennung von AdoMet und MTA gestaltete sich bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 ml min⁻¹ in diesem Falle folgendermaßen:

Zeit [min]	0,0	16,0	28,0	32,0	37,0	42,0
Phase B [%]	15,0	65,0	85,0	85,0	15,0	0,0

Die Eichung der HPLC wurde mit folgenden Standards durchgeführt:

0,8 mM S-(5'-Adenosyl)-L-Methioninchlorid (AdoMet)

0,6 mM 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA)

Verbindung	Menge (ng)				
AdoMet	80,00	40,00	20,00	4,00	2,67
MTA	60,00	30,00	15,00	3,00	2,00

2.10 Bestimmung der Polyaminkonzentrationen nach Behandlung mit Inhibitoren der ODC und der AdoMetDC

Um den Einfluss von Inhibitoren der Polyamin-Synthese auf den Polyamin-Gehalt in den infizierten Erythrozyten zu untersuchen, wurden der Plasmodienkultur die ODC-Inhibitoren APA, CGP 54169A, CGP 52622A, AO-Agmatin, GAPA und bis-GAPA sowie die AdoMetDC-Inhibitoren MDL 73811, CGP 40215A, CGP 48664A und AMA in den jeweils gewünschten Konzentrationen zugegeben.

2.11 IC₅₀-Bestimmungen

Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte der jeweiligen Inhibitoren wurden ebenfalls Plasmodien des 3D7-Stammes verwendet. Testbedingungen in der Plasmodienkultur waren eine 2%ige Parasitämie (vorwiegend Ringstadien) sowie ein Hämatokritwert von 2%. Zu einer 250 µl-Kultur wurden 5 µl des jeweiligen Inhibitors gegeben, angesetzt in 50% Ethanol (EtOH). Dieser Ansatz wurde dann nach 2minütigem Begasen mit 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ für 24 h bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der 24 h erfolgte die Zugabe von 10 µl ³H-Hypoxanthin (10 µCi/ml = 100 nCi); nach nochmaligem Begasen wurde der Testansatz nochmals für 24 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde der Test durch das Abernten und Waschen der Zellen mit dH₂O beendet. Dieser Vorgang wurde mittels eines Zellharvester Systems (Inotech AG, Dottikon, Schweiz) durchgeführt; die Lösung aus den Mikrotiterplatten wird angesaugt, das Probenmaterial haftet auf Filterscheibchen. Die Vertiefungen werden dann nochmals mit einer Waschlösung gewaschen und diese dann ebenfalls abgesaugt. Die Filterpapiere wurden schließlich getrocknet, in Plastiktüten eingeschweißt und nach Zusatz von Scintillatorflüssigkeit in einem automatischen Flüssigszintillationszähler (PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg) gemessen.

2.12 Präparation genomischer DNA aus *P. falciparum*

Im ersten Schritt wurden mittels Saponinlyse isolierte *P. falciparum*-Parasiten in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA und 2% SDS resuspendiert. Nach Zugabe von

100 µg/ml Proteinase K erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Im Anschluss wurde dieser Ansatz für 10 min auf Eis gestellt, gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben ($\frac{1}{4}$ des Endvolumens), gründlich gemischt und für weitere 5 min auf Eis stehen gelassen, bevor der Reaktionsansatz für 15 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde nach Zugabe von 20 µg/ml RNase für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte dann mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v). Nach Ethanolfällung und einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und schließlich in dH₂O resuspendiert.

2.13 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Ein 2 ml-Aliquot einer ÜN-Kultur von *E. coli* wurde für 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl STET-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 8% Sucrose, 50 mM EDTA, 5% Triton-X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µg Lysozym und Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Ansätze für 1,5 min in einem Wasserbad gekocht und dann nochmals bei 10000 rpm zentrifugiert, diesmal für 20 min (Rotor F45-24-11, Eppendorf). Das Pellet wurde verworfen, der Überstand nach Zugabe von 500 µl 6 M Natriumjodid und 7,5 µl Glasmilch zur Bindung der DNA für 5 min auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Glasmilch-Pellet zweimal mit je 400 µl New Wash gewaschen, bevor die Resuspension und Elution in 60-80 µl dH₂O bei 56°C erfolgte. Schließlich wurde die gelöste DNA durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt von der Glasmilch getrennt.

2.14 Midi- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA

Midi- bzw. Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten nach den Angaben des jeweiligen Herstellers (Qiagen Plasmid Midi- bzw. Maxi-Kit, Qiagen; Nucleobond PC 100-Kit, Macherey und Nagel). Im Unterschied zur Mini-Präparation konnten bei der Midi-Präparation 100 ml, bei der Maxi-Präparation bis zu 500 ml einer Bakterien-ÜN-

Kultur zur DNA-Gewinnung verwendet werden. Bei ersterer ließen sich bis zu 150 µg Plasmid-DNA isolieren, bei letzterer bis zu 500 µg.

2.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen (Saiki et al., 1985), basierend auf einer enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Je nach Bedarf lassen sich Länge der Primer und Stringenz der PCR-Bedingungen variieren. Die jeweiligen Reaktionsansätze enthielten neben den Puffern des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 50 µl 200 µM Desoxyribonukleosid 5'-Triphosphat (Eurogenetech), 10 pmol der beiden Oligonukleotidprimer, 1-2 Einheiten der jeweils eingesetzten Polymerase sowie etwa 100 ng DNA. Die PCR-Bedingungen wurden an den jeweiligen Polymerasetyp und das zu erwartende Produkt angepasst. Gemeinsam war den verschiedenen PCR-Bedingungen ein anfänglicher Denaturierungsschritt von 94°C sowie 30 bzw. 35 Amplifizierungszyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase (94°C, 20 sec-1 min), einer Annealing-Phase (48-52°C, 20 sec) und einer Extensions-Phase (72-68°C, 2-6 min). Im Anschluss an die Zyklen folgte ein abschließender Extensionsschritt für 5-8 min. Als Polymerasen wurden *Taq*-Polymerase, *Pfu*-Polymerase sowie HiFi-Polymerase verwendet.

2.16 Enzymatische DNA-Restriktion

Für einen Restriktionsverdau wurden 1-10 µg DNA mit den jeweils gewünschten Restriktionsendonukleasen in dem passenden, vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer für 2-12 h inkubiert. Das Gesamtvolumen lag dabei zwischen 10 µl für analytische und 100 µl für präparative Reaktionsansätze.

2.17 DNA-Auftrennung über Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurde in horizontalen Flachgel-Apparaturen (Gibco BRL) durchgeführt. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wurden die zu charakterisierenden DNA-Proben in 0,8-1,5%igen Agarosegelen in TBE-Puffer aufgetrennt. Den Agarosegelen wurden 5 µl Ethidiumbromid zugesetzt, welches mit der DNA interkaliert und die Eigenschaft besitzt, in ultraviolettem Licht zu fluoreszieren. Auf diese Weise lässt sich die DNA unter UV-Einstrahlung sichtbar machen. Als DNA-Größenstandard wurde ein 1 kb-Marker (Gibco BRL) verwendet.

2.18 Elution und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die aus einem präparativen TAE-Gel isoliert werden sollten, wurden ausgeschnitten, das Agarosestück in 6 M Natriumjodid aufgenommen und bei 56 °C geschmolzen. Nach Zugabe von 8 µl Glasmilch zur Bindung der DNA ließ man den Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur schütteln; nach Zentrifugation (30 sec, 10000 rpm) wurde das Pellet zweimal mit je 1 ml New Wash gewaschen und anschließend bei 56 °C getrocknet. Die DNA wurde - wie bereits beschrieben - mit dH₂O eluiert.

2.19 Aufreinigung von DNA über DNA-Affinitätssäulen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels des PCR-Purification Kits, den Angaben des Herstellers (Amersham) folgend. Mit Hilfe dieser Methode ließen sich Enzyme, Salze, freie Nukleotide und kleine DNA-Fragmente von dem aufzureinigenden DNA-Fragment trennen.

2.20 DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. In diesem Fall erfolgte die Markierung über

eingebautes dATP (α -³⁵S), verwendet wurde der Sequenase Version 2.0 Kit der Firma USB. Die Sequenase ist eine T7-DNA-Polymerase ohne 5'-3'-Exonukleaseaktivität (Klenow-Fragment).

Die DNA wurde zunächst denaturiert, indem sie nach Zugabe von 2 μ l 2 N NaOH für 10 min bei 37°C inkubiert wurde. Nach Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M NaAcetat und dem 2½ fachen Volumen Ethanol (95%) wurde der Ansatz für 30 min bei -70°C oder über Nacht bei -20°C gelagert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 200 μ l Ethanol (75%) gewaschen und nochmals für 5 min zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes konnte das Pellet getrocknet, in 8-15 μ l dH₂O aufgenommen und für die Sequenzierungsreaktion verwendet werden.

Alternativ wurde mit dem „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers sequenziert. Die Sequenzierungsprodukte wurden mit dem Gerät ABI 373 der Firma Applied Biosystems aufgetrennt, die Sequenzanalysen erfolgten mit den Programmen DNASIS bzw. PROSIS (Hitachi). Des Weiteren wurden einige Sequenzierungsreaktionen extern in Auftrag gegeben (AGOWA, Berlin).

2.21 Radioaktive Markierung von DNA

Für die radioaktive Markierung von DNA wurde der „Random Primed Labeling Kit“ (Roche) verwendet; die Markierungsreaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, d.h. 100 ng DNA wurden mit 50 μ Ci α -³²P-dATP für 30 min bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute dNTPs wurden mittels einer MicroSpin™ S-200 HR Säule (Amersham Pharmacia Biotech) von der radioaktiv markierten Sonde abgetrennt, die Sonde dann für die nachfolgende Hybridisierung weiterverwendet.

2.22 Transfer von DNA (Southern Blot)

Der Begriff des "Southern blottings" beschreibt die Übertragung der DNA von einem Elektrophoresegel auf eine Nitrozellulose- oder Nylon-Membran. Die DNA wird dann

mit einer markierten spezifischen DNA-Sonde hybridisiert. So können bestimmte Restriktionsfragmente identifiziert werden.

Zunächst wurden 10 µg genomische DNA mit ausgesuchten Restriktionsenzymen verdaut und in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Im Anschluss daran wurde das Gel zunächst für 15 min bei RT in 0,25 N HCl (bewirkt eine Fragmentierung größerer DNA-Fragmente), dann - nach kurzem Waschen in dH₂O - für 20 min in 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl (führt zur Trennung der DNA in Einzelstränge) und schließlich für 45 min in 10 x SSC inkubiert. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt.

Die DNA wurde dann über Nacht mit 10 x SSC als Laufmittel aus dem Gel auf die Trägermembran (GeneScreenPlus-Membran, Roche) übertragen. Am folgenden Tag wurde die Membran mit 6 x SSC gewaschen, kurz luftgetrocknet und die DNA schließlich mittels einer zweiminütigen UV-Bestrahlung mit einem UV Stratalinker 1800 (Stratagene) auf der Membran fixiert (Sambrook et al., 1989).

2.23 Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierter DNA

Nach der Fixierung der DNA auf einer Nylon- oder Nitrocellulose-Membran wurde diese in einer Prähybridisierungslösung (4 x SSC, 0,1% SDS, 5 x Denhardt's Lösung, 50 µg/ml denaturierte Heringsspermien-DNA, 1% NaPP_i) bei 60 °C für mindestens 4 h prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde für 10 min bei 95 °C denaturiert, bevor sie zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben wurde; anschließend wurde dieser dann bei 60 °C für die eigentliche Hybridisierung über Nacht inkubiert. Im Anschluss daran folgten zwei Waschschrte, der erste für 2 x 20 min in 2 x SSC und 0,1% SDS bei 60 °C, der zweite für 2 x 30 min in 1 x SSC und 0,1% SDS, ebenfalls bei 60 °C. Schließlich wurde die Membran auf einen Film (Kodak BIOMAX) gelegt, für 24 - 96 h in einer Filmkassette bei -80 °C exponiert und die Signale durch Autoradiographie detektiert und ausgewertet.

2.24 Herstellung kompetenter Zellen

Zunächst wurde eine Übernacht-Kultur des jeweils verwendeten Bakterienstammes in 10 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert. Nach einer Verdünnung von 1:100 ließ man die Zellen dann - ebenfalls bei 37°C - bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 wachsen. Bevor sie bei 2000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert wurden, wurden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 50 ml kaltem CaCl₂ (80 mM) resuspendiert. Die Zellen wurden für weitere 20-30 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde schließlich in 5 ml 20% Glycerol/80 mM CaCl₂ aufgenommen, aliquotiert und sofort bei -70°C gelagert. Alle Schritte erfolgten bei 4°C.

2.25 Transformation

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 10 µl Plasmid-DNA und vorsichtigem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sec und einer weiteren Inkubation für 2-5 min auf Eis unterzogen, bevor 800 µl LB-Medium hinzupipettiert und der Ansatz für 30-60 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert wurde. Schließlich konnten die Zellen dann auf LB-Platten, denen die jeweils erforderlichen Selektionsantibiotika (Ampicillin: 50 µg/ml, Kanamycin: 10 µg/ml, Tetracyclin: 10 µg/ml, Chloramphenicol: 25 µg/ml) zugesetzt worden waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Wurden Transformationsvektoren verwendet, mit denen eine Blau-Weiß-Selektion möglich war, wurden jeweils 60 µl 0,1 M IPTG und 20 mg/ml X-Gal in 2% Dimethylformamid auf den Platten ausgestrichen, bevor der Transformationsansatz ausplattiert wurde. Bei einer erfolgreichen Insertion der gewünschten DNA-Fragmente in den Vektor zeigen die Kolonien eine weiße Farbe, während jene, die das Fragment nicht integriert haben, eine Blaufärbung aufweisen.

2.26 Expression und Aufreinigung der rekombinanten AdoMetDC/ODC

Für die Expression der rekombinanten AdoMetDC/ODC stand das entsprechende Expressionskonstrukt bereits zur Verfügung (Müller et al., 2000). Der die *P. falciparum*-AdoMetDC/ODC enthaltende pASK-IBA3-Expressionsvektor wurde zunächst in die AdoMetDC- und ODC-defiziente *E. coli*-Zelllinie EWH331 transformiert. Mit einer einzelnen Kolonie der transformierten Bakterien wurde eine Übernacht-Kultur (25 ml LBamp-Medium) angeimpft, bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag 1:50 in frischem LBamp-Medium (500 ml) verdünnt. Die Bakterien wurden bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ = 0,5 wurde die Proteinexpression mit 1 mM AHT induziert; anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen über Nacht bei RT, bevor sie am nächsten Tag für 20 min bei 4°C und 2500 rpm abzentrifugiert wurden (Megafuge 1.0R oder –3.0R). Das Zellpellet wurde in 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, 1 mM EDTA und 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert. Zum Aufschließen der Zellen wurden die Bakterien dann 12 x für 20 sec in einem Branson Sonifier beschallt und anschließend für 1 h bei 100000 x g abzentrifugiert (TFT 55.38 Rotor, Centricon T-1065, Kontron).

Der 100000 x g Überstand wurde unter Verwendung des Strep-tag purification systems (Institut für Bioanalytik, Göttingen (IBA)) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution des Proteins erfolgte durch den Elutions-Puffer, von dem 5 x 1 ml aufgetragen wurde. Die Fraktionen wurden einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen, die proteinenthaltenden Fraktionen gepoolt und mittels einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-blue-Färbung auf ihre Reinheit überprüft.

2.27 Klonierung der rekombinanten AdoMet-Synthetase

Für die Amplifikation der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* mittels PCR wurden Sense- und Antisense-Oligonukleotide zur Klonierung in den pJC40 - Vektor designt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer sind nachfolgend aufgeführt.

AdoMet-Synthetase	sense	CCGCTCGAGGATGAGTCAGTTGAAAATTAA
	antisense	CGCGCGGGGCCCTTAATAATGCATCG

Als Template diente *P. falciparum*-cDNA. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Apal* und *XhoI* verdaut und in den ebenfalls mit *Apal/XhoI* geschnittenen Vektor pJC40 kloniert. Der die AdoMet-Synthetase enthaltende Vektor wurde dann zunächst in dH5 α -Zellen transformiert. Mittels einer Mini-Präparation, anschließendem Verdau und Auftragen der DNA auf ein Agarosegel wurde dann die richtige Bandengröße überprüft. Schließlich erfolgte die Transformation in die Expressionszellen EWH 331, Rosetta gami B und BLR DE3 plys S.

Die transformierten Bakterien wurden dann auf LB-Platten ausgestrichen, denen die Antibiotika Ampicillin (50 μ g/ml), Tetracyclin (10 μ g/ml), Kanamycin (10 μ g/ml) und Chloramphenicol (25 μ g/ml) zugefügt wurden, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.28 Expression und Aufreinigung der rekombinanten AdoMet-Synthetase

Die Expression der AdoMet-Synthetase erfolgte wie im Falle der rekombinanten AdoMetDC/ODC wie unter 2.26 beschrieben. Allerdings wurden die Zellen in LBamp-Medium mit Zugabe von Chloramphenicol (25 μ g/ml), Kanamycin (10 μ g/ml) und Tetracyclin (10 μ g/ml) inkubiert, die Induktion der Proteinexpression erfolgte statt mit AHT mit IPTG.

Die Aufreinigung des AdoMet-Synthetase-His-tag-Fusionsproteins erfolgte über die Bindung an Ni²⁺-Nitrilotriacetat (NTA)-Agarose. Dazu wurden 5 ml der Ni²⁺-NTA-Agarose für 5 min bei 600 rpm in einer Heraeus-Zentrifuge zentrifugiert und nacheinander mit je 40 ml ddH₂O und Binding Buffer gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 5 ml 1 x Binding Puffer resuspendiert. Die Ni-NTA-Agarose kann - gelagert bei 4°C - ca. 4 Wochen verwendet werden.

Das *E. coli*-Pellet wurde ebenfalls in 5-10 ml 1 x Binding Puffer resuspendiert und 1 mM PMSF dazugegeben. Aufschluss der Zellen und Ultrazentrifugation erfolgten ebenfalls wie unter 2.26 geschildert.

Das Waschen und Eluieren des rekombinanten Proteins wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt; bei einem Verfahren wurden dem Überstand 800 μ l der equilibrierten Ni-NTA-Agarose hinzugefügt und das Gemisch dann für 15-60 min bei 4°C leicht geschüttelt, um das Protein an die Ni-NTA-Agarose zu binden. Nach kurzer Zentrifugation (5 min, 600 rpm, 4°C) und dreimaligem Waschen mit je 25 ml

Wasch-Puffer (Qiagen) zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine erfolgte die Elution durch Zugabe von 2 x 1 ml Elutions-Puffer. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden für 15 min bei 4 °C und unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Im zweiten Verfahren wurde eine Spritze mit Glaswolle (Roth) gefüllt und die equilibrierte Ni-NTA-Agarose daraufgegeben. Auf diese Säule wurde der 100000 x g-Überstand gegeben und 2 x mit 50 ml Wasch-Puffer gewaschen. Das rekombinante Enzym wurde schließlich mit 2 x 1 ml Elutions-Puffer eluiert. Ein Teil des Eluats wurde nach einer Proteinbestimmung nach Bradford einer SDS-PAGE unterzogen, der Rest über Nacht dialysiert.

2.29 Dialyse

Nach der Elution der AdoMet-Synthetase wurde das Eluat, welches das Enzym enthielt, in Dialyseschläuche (Serva) pipettiert und über Nacht gegen 2 l 100 mM Tris-Puffer mit Zusatz von 1 mM DTT, 1 mM PMSF und 0,2% Brij-35 dialysiert. Auf diese Weise ließen sich eventuell noch vorhandene Imidazolreste entfernen, die sich in hohen Konzentrationen im Elutionspuffer befinden und die Enzymaktivität beeinflussen könnten. Im Anschluss wurde das rekombinante Enzym entweder gleich für weitere Untersuchungen eingesetzt oder bei -20 °C weggefroren.

2.30 Mutation der Bindungsstellen für Methionin und Mg²⁺

Die Kristallstruktur der *E. coli*-AdoMet-Synthetase zeigt, dass das aktive Zentrum vier Aspartatreste enthält (Taylor und Markham, 1999). Wie schon bei anderen Organismen wie *E. coli* (McQueney und Markham, 1995; Taylor und Markham, 1999) oder *L. donovani* (Pérez-Pertejo et al., 2003) zuvor untersucht wurde, spielen die Aminosäuren Asp¹⁶, Asp²⁷¹, Asp¹¹⁸, Asp²³⁸ und Glu⁴⁵ eine wichtige Rolle bei der Bindung von Substrat und von Kationen, die essentiell für eine optimale Katalyseaktivität sind.

Um den Einfluss dieser Aminosäurereste auf die Aktivität des Enzyms zu untersuchen, wurden Mutanten hergestellt, in denen die Aspartatreste Asp¹⁶, Asp¹¹⁸, Asp²³⁹ und Asp²⁷¹ gegen Asparagin und das Glutamat Glu⁵⁰ gegen Glutamin

ausgetauscht wurden. Um die entsprechenden Mutationen einzuführen, wurden folgende Oligonukleotid-Primer designt:

Mutante asp¹⁶asn	sense	GAATGAAGGACACCCAAATAAAATATGTGACCAG
	antisense	CTGGTCACATATTTTATTTGGGTGTCCTTCATTC
Mutante asp¹¹⁸asn	sense	GAATTAATAGGAGCAGGAAATCAAGGAATTATGTTTGG
	antisense	CCAAACATAATTCCTTGATTTCTGCTCCTATTAATTC
Mutante asp²³⁸asn	sense	GGAGGACCAGCAGCAAATGCAGGTTTAACAGGAAG
	antisense	CTTCCTGTAAACCTGCATTTGCTGCTGGTCCTCC
Mutante asp²⁷¹asn	sense	GATGCATCAAAAGTCAATCGTTCAGCAGCTTA
	antisense	TAAGCTGCTGAACGATTGACTTTTGATGCATC
Mutante glu⁵⁰gln	sense	ATAGCAAGGTTGCATGTCAAGTATGTGCTAAAAAGAATTA
	antisense	TAATTCTTTTTAGCACATACTTGACATGCAACCTTGCTAT

Die Mutationen wurden unter folgenden PCR-Bedingungen eingeführt:

Denaturierung: 95 °C, 2 min; 95 °C, 30 sec; Annealing: 48 °C, 90 sec; Extension 68 °C, 9 min. Insgesamt wurden 18 Zyklen durchgeführt.

Anschließend wurde ein *DpnI*-Verdau für 2 h bei 37 °C durchgeführt, um die Template-DNA zu eliminieren. Das Restriktionsenzym *DpnI* schneidet die DNA an der palindromischen GATC-site nur dann, wenn die Adeninreste an beiden Strängen methyliert oder hemi-methyliert (G^{m6}ATC) wurden. Die Sequenz muss also die N⁶-Methyl-Form des Adeninrestes besitzen; produziert werden blunt-end Fragmente nach der Spaltung zwischen me-A und T. Deshalb werden die nicht mutierte parentale DNA oder Mutanten-Wildtyp-Heteroduplices durch *DpnI* inaktiviert.

Die PCR-Produkte wurden wie im Falle der Wildtyp-AdoMet-Synthetase zunächst in kompetente DH5 α -Zellen und nach Minipräparation in die entsprechenden Expressionszellen (Rosetta/EWH/BLR) transformiert, auf LBamp-Platten, denen weitere Selektionsantibiotika (Tetracyclin, Kanamycin, Chloramphenicol) zugesetzt wurden, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wie unter 2.28 beschrieben wurden die mutierten Proteine dann exprimiert und aufgereinigt. Um zu überprüfen, ob die Mutagenese auch zu dem jeweils gewünschten Aminosäureaustausch führte, wurden die Mutationsprodukte sequenziert.

2.31 Gelfiltration

Nach Elution der AdoMet-Synthetase von der Ni-NTA-Säule wurde das Eluat auf eine FPLC-Säule geladen; hier konnte eine weitere Aufreinigung mittels einer Trennung der im Eluat vorhandenen Verbindungen nach deren molekularen Masse erreicht werden. Als Laufpuffer diente ebenfalls ein Tris-Puffer (100 mM) mit Zusatz von DTT, PMSF und Brij-35. Die einzelnen Fraktionen wurden in Volumina von 2- bzw. 4 ml aufgefangen, die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Anschließend wurden die Fraktionen, in denen die AdoMet-Synthetase eluierte, mittels einer Bradford-Proteinbestimmung auf ihren Proteingehalt untersucht und auf ein SDS-Gel aufgetragen, um den Reinheitsgrad des Enzyms bestimmen zu können, bevor letzteres für weitere Untersuchungen eingesetzt wurde.

2.32 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen entsprechend der Methode von Bradford (1976) beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue in ethanolhaltiger Phosphorsäurelösung an Proteine, wobei ein blauer Komplex entsteht. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm (Uvikon Spectrometer 930/932, Kontron Instruments). Zur Erstellung einer Eichkurve wurde Rinderserumalbumin als Standardprotein verwendet.

2.33 SDS-Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Bezeichnung dieser Proteinelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) beruht auf der Tatsache, dass zwei bezüglich des pH-Werts, der Gel- und der Pufferzusammensetzung voneinander abweichende (diskontinuierliche) Polyacrylamidgele verwendet werden. Alle Proben wurden nach Zugabe von 2x Probenpuffer (1/2 Volumen) für 5-10 min bei 95°C gekocht. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm wurde das Gel beladen und die Elektrophorese bei 30 mA durchgeführt. Für die Trennung wurden Minigel G41- oder G42-Kammern (Biometra) verwendet. Als Molekulargewichtsstandards dienten die Eichsubstanzen (high molecular weight)

von Gibco BRL. Wie bereits erwähnt wurde im Anschluss an die Elektrophorese eine Coomassie-Blue-Färbung (siehe 2.34) durchgeführt, so dass die einzelnen Banden sichtbar wurden. Die Stammlösungen für die Gele setzen sich wie folgt zusammen:

Monomer-Stock-Lösung:	29,1 g Acrylamid, 0,9 g Bisacrylamid/100 ml
Trenngelpuffer:	36,3 g Tris-HCl/100 ml, pH 8,9 mit 3 M HCl eingestellt
Sammelgelpuffer:	5,7 g Tris-HCl/100 ml, pH 6,7 mit 0,47 M H ₃ PO ₄ eingestellt
Ammoniumpersulfat:	10% in dH ₂ O
1 x SDS-Laufpuffer:	3 g Tris-HCl, 14,4 g Glycin, 10 ml SDS (10%), ad 1 l dH ₂ O
7,5%iges Trenngel:	1,5 ml Trenngelpuffer, 3,0 ml dH ₂ O, 1,5 ml 30%iges Acrylamid, 60 µl einer 10%igen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 5 µl N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), 25 µl Ammoniumpersulfat (APS)
4%iges Sammelgel:	1 ml Sammelgelpuffer, 2,5 ml dH ₂ O, 534 µl 30% Acrylamid, 5 µl TEMED, 60 µl einer 10%igen SDS-Lösung, 25 µl APS

2.34 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden zunächst für mindestens 30 min in der Färbelösung inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Gele so lange mit der Entfärbelösung behandelt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben.

Fixierer:	Trichloressigsäure 20%
Färbelösung:	Je ein Teil von Lösung A und Lösung B; Lösung A: 0,2% Coomassie R-250, gelöst in Ethanol Lösung B: 20% Eisessig in dH ₂ O
Entfärbelösung:	20% Ethanol, 10% Eisessig

2.35 Aktivitätsbestimmungen der AdoMetDC/ODC und der AdoMet-Synthetase

2.35.1 ODC-Aktivitätstest

Um die Aktivität der ODC zu ermitteln, wurde der Aktivitätstest nach Niemann et al. (1996) durchgeführt; dieser beruht auf der Verwendung von radioaktiv markiertem L-[1-¹⁴C]-Ornithin. Die Aktivität der ODC kann nach Zugabe des Enzyms aufgrund der Freisetzung von ¹⁴CO₂ als Folge des katalytischen Prozesses festgestellt werden. Das freigesetzte ¹⁴CO₂ wird von einem Filterpapier, welches zuvor mit Protosol getränkt wurde, aufgefangen und kann nach Zugabe von Scintillatorlösung (Ultima Gold, Packard Bio Science) in einem Scintillator (Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, United Packard) gemessen werden. Der Reaktionsansatz des Standardassays enthielt in einem Gesamtvolumen von 250 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 40 µM PLP, 1 mM Dithioerythritol (DTT), 0,02% Brij-35, 100 µM Ornithin, 8,9 µM L-[1-¹⁴C]-Ornithin (50 nCi), die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Der Aktivitätstest wurde in mit Gummideckeln verschließbaren Glasbehältern durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation in einem Wasserschüttelbad bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Trichloressigsäure (50 mM) beendet. Nach einer anschließenden 15-minütigen Inkubation, der Zugabe von 0,5 ml NaHCO₃ und einer weiteren 15-minütigen Inkubation wurde schließlich - nach Zugabe der Scintillationslösung - der Messvorgang im Scintillationszähler durchgeführt.

2.35.2 AdoMetDC-Aktivitätstest

Die Messmethode der AdoMetDC-Aktivität gleicht jener, die für die ODC verwendet wurde, mit dem Unterschied, dass statt des L-[1-¹⁴C]Ornithins S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴CO₂]Methionin (8,8 µM) verwendet wurde und der Reaktionsansatz sich aus 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, 0,1 mM EDTA, 0,02% Brij 35 und 1 mM DTT zusammensetzte.

2.35.3 Bestimmung der K_m -Werte für die ODC und die AdoMetDC

Um die K_m -Werte der *Pf*ODC und der *Pf*AdoMetDC bestimmen zu können, wurde dem Reaktionsansatz des ODC- bzw. AdoMetDC-Aktivitätstests neben dem radioaktiv markierten Substrat in konstanter Konzentration nichtmarkiertes Substrat in variierenden Mengen (10 μ M - 200 μ M) zugefügt.

2.35.4 Bestimmung der K_i -Werte für die ODC-Inhibitoren

Die Untersuchung der Enzymaktivitäten unter Einfluss der ODC-Inhibitoren wurde unter Standardassay-Bedingungen mit variierenden Konzentrationen des Ornithins und ebenfalls variierenden Mengen des jeweiligen Inhibitors durchgeführt. Dabei wurden die Inhibitorkonzentrationen von APA und dessen Derivaten im nanomolaren Bereich gewählt (APA: 0-6 nM, CGP 54169A: 0-11 n, CGP 52622A: 0-20 nM). Im Falle der Inhibitoren AO-Agmatin und GAPA lagen die Inhibitorkonzentrationen zwischen 0-7,5 bzw. zwischen 0-15 μ M. Die K_i -Werte für die Inhibitoren wurden anhand eines Lineweaver-Burk-Diagramms ermittelt. Bei der Ermittlung der K_i -Werte für APA, CGP 54169A und CGP 52622A wurde die Tatsache berücksichtigt, dass es sich um sogenannte „tight binding“-Inhibitoren handelt; aufgrund dessen wurde für die Berechnung der K_i -Werte die Morrison-Gleichung (Henderson, 1972) verwendet.

2.35.5 Bestimmung der K_i -Werte für die AdoMetDC-Inhibitoren

Auch bei der Ermittlung der K_i -Werte für die AdoMetDC-Inhibitoren MDL 73811, CGP 40215A und AMA wurden unterschiedliche Mengen der Inhibitoren bei verschiedenen Substratkonzentrationen eingesetzt. Da die irreversiblen Inhibitoren MDL 73811 und AMA einen zeitabhängigen Inhibierungstyp aufweisen, wurde die AdoMetDC mit variierenden Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors (MDL 73811: 0-0,6 μ M, AMA: 0-1,0 μ M) für unterschiedliche Zeiten (0-15 min) präinkubiert. Die Präinkubation erfolgte in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, 0,1 mM EDTA, 0,02% Brij 35 und 1 mM DTT. Im Anschluss wurde der Standardassay für 30 min bei 37°C

durchgeführt. Die Auswertung des K_i -Wertes erfolgte nach der Methode von Kitz und Wilson (1962).

2.35.6 AdoMet-Synthetase-Aktivitätstest

Die Aktivitätsbestimmung der AdoMet-Synthetase wurde nach der Methode von Libby (1978) durchgeführt und beruht auf der Reaktion von ATP und Methionin, wobei AdoMet gebildet wird. Die Reaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 30 min durch Zugabe von 10 μ l Trichloressigsäure gestoppt. Nach kurzer Zentrifugation wurden 50 μ l des Überstandes auf P81-Phosphozellulosepapier (2,5 x 2,5 cm²) pipettiert. Das radioaktiv markierte Reaktionsprodukt bindet an einen Ionenaustauscher (P81-Phosphozellulosepapier), das überschüssige Substrat wird dann durch zweimaliges Waschen mit nichtmarkiertem Methionin und einem weiteren Waschschrift mit 100%igem EtOH entfernt. Nach dem Trocknen wurde das P81-Papier in ein Scintillationsgefäß mit 4 ml Scintillationsflüssigkeit überführt und mittels der Bestimmung der Radioaktivität im Scintillator die Aktivität des Enzyms bestimmt. Der Reaktionsansatz des Standardtests setzte sich aus 0,1 M Tris/HCl, pH 8,2, 20 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 10 mM DTT, 10 mM ATP, 100 μ M Methionin und 8,5 μ M (100 nCi) [³H]-Methionin zusammen. Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 100 μ l.

2.35.7 Bestimmung der Abhängigkeit der AdoMet-Synthetase von KCl

Unter Standardtestbedingungen wurde dem Reaktionsansatz KCl in Konzentrationen von 0-250 mM zugegeben. So konnte ermittelt werden, in welchem Maße KCl die Enzymaktivität der AdoMet-Synthetase beeinflusst.

2.35.8 Bestimmung des pH-Optimums der AdoMet-Synthetase

Um zu untersuchen, unter welchen pH-Bedingungen die AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* optimale Katalyseaktivität zeigt, wurde der Standardassay in verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt.

Eingesetzt wurden ein KH_2PO_4 -Puffer, dessen pH-Wert im Test zwischen 6,0 und 8,0 lag, des Weiteren ein Tris-Puffer (pH 7,5-9,0) und schließlich ein Glycin-Puffer (pH 8,5-10,0).

2.35.9 Auswertung der Ergebnisse der Enzymtests

Die Auswertung, graphische Darstellung und Bestimmung der jeweiligen K_m - und K_i -Werte wurde mit Hilfe des GraphPADPrism-Programms Inplot 3,1 (GraphPAD, San Diego) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung der Polyaminkonzentrationen während des erythrozytären Zyklus von *P. falciparum*

Um den Polyamingehalt während der erythrozytären Schizogonie von *P. falciparum* zu bestimmen, wurden infizierte Erythrozyten einer synchronisierten Kultur mittels eines diskontinuierlichen Percoll-L-Alanin-Gradienten an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Invasion von den nichtinfizierten Erythrozyten getrennt. So konnten Ringstadien (4-10 h nach Invasion), Trophozoiten (18-24 h nach Invasion) und Schizonten (36-42 h nach Invasion) erhalten werden. Die Parasitämie der isolierten Zellen betrug mindestens 95%. Wie in Tab. 1 gezeigt, konnte eine Korrelation zwischen den intrazellulären Putrescin-, Spermidin- und Spermin-Konzentrationen und den Entwicklungsstadien der Parasiten beobachtet werden. Die Mengen aller drei Polyamine stiegen vom Ring- zum Schizontenstadium um das 17-, 14- und 22-fache an. In allen Entwicklungsstadien repräsentierte Spermidin das Polyamin mit der höchsten Konzentration, gefolgt von Putrescin und geringen Mengen an Spermin. In den nichtinfizierten Erythrozyten waren die Polyaminkonzentrationen im Vergleich dazu niedrig.

	Polyamine [nmol 10 ¹⁰ Zellen ⁻¹]		
	Putrescin	Spermidin	Spermin
Ringe	35,9 ± 24,2	93,4 ± 62,9	5,1 ± 3,3
Trophozoiten	454,5 ± 195,8	1079,0 ± 185,0	39,8 ± 17,2
Schizonten	624,0 ± 227,7	1295,4 ± 398,9	112,5 ± 53,2
Nichtinfizierte Erythrozyten	23,1 ± 10,3	43,5 ± 19,6	11,9 ± 8,0

Tab. 1: Stadienspezifischer Polyamingehalt von *Pf*-infizierten Erythrozyten. Vor der Polyaminbestimmung wurden die infizierten Erythrozyten durch einen diskontinuierlichen Percoll/L-Alanin-Gradienten von den nichtinfizierten Erythrozyten getrennt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (± Standardabweichung) von acht unabhängigen Versuchen.

3.2 Bestimmung der Polyaminverteilung in den Kompartimenten infizierter Erythrozyten

Zur Untersuchung der Polyaminverteilung in der Parasit-Wirtszell-Einheit wurden zunächst mit Trophozoiten infizierte Erythrozyten mit SLO behandelt. Die folgenden quantitativen Analysen der so gewonnenen Kompartimente zeigten, dass der größte Anteil der Polyamine mit dem Parasiten assoziiert ist und dass das Erythrozytenkompartiment im Vergleich dazu geringere Polyaminlevel aufweist (Tab. 2). Dies steht in Einklang mit den niedrigen Polyaminkonzentrationen, die in nichtinfizierten Erythrozyten gefunden wurden (Tab. 1).

	Polyamine [nmol 10 ¹⁰ Zellen ⁻¹]		
	Putrescin	Spermidin	Spermin
Parasit / Wirtszell-Einheit	164,6 ± 69,8	865,9 ± 342,5	45,7 ± 21,5
Parasit	104,7 ± 54,1	686,8 ± 299,4	34,0 ± 19,3
Wirtszelle	41,9 ± 9,6	140,4 ± 37,0	11,9 ± 6,8

Tab. 2: Analyse der Polyaminverteilung in mit *Pf*-Trophozoiten infizierten Erythrozyten. Parasiten und Cytoplasma der Wirtszellen wurden durch SLO-Behandlung getrennt. Die Daten stellen die Mittelwerte (± Standardabweichung) von vier unabhängigen Versuchen dar.

3.3 Effekt von APA-Derivaten, bis(Guanosylhydrazon)-Derivativen und AdoMet-Analoga auf die AdoMetDC/ODC von *P. falciparum*

Für die bifunktionelle *Pf*-AdoMetDC/ODC wurden die Inhibitionskonstanten verschiedener ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren bestimmt. Tab. 3 zeigt die K_i-Werte aller getesteten Inhibitoren. Die Abbildungen 9-14, 16 und 17 zeigen die graphischen Darstellungen der K_i-Bestimmungen für die jeweiligen ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren. Die Strukturformeln der ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren sind in Abb. 8 bzw. Abb. 15 dargestellt.

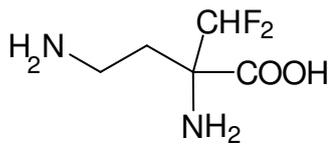
Mit einem K_i-Wert von 1,3 µM war CGP 40215A bezüglich der reversiblen AdoMetDC-Inhibitoren die effektivste Verbindung. Die Inhibitionskonstante für den AdoMetDC-Inhibitor AMA hatte einen K_i-Wert von 17,8 µM. AMA inhibiert die *Pf*-

AdoMetDC-Aktivität zeitabhängig; der τ_{50} -Wert (Halbwertszeit des Enzyms unter sättigenden Konzentrationen des Inhibitors) von AMA liegt bei $6,0 \pm 0,4$ min. Der klassische irreversible AdoMetDC-Inhibitor MDL 73811 besitzt einen K_i -Wert von $1,6 \pm 0,4$ μM für das bifunktionale Enzym, der τ_{50} -Wert beträgt hier $1,8 \pm 0,6$ min.

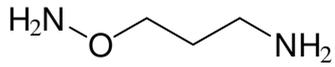
Die kinetischen Analysen für den „tight-binding“ ODC-Inhibitor APA und seiner Derivative CGP 54169A und CGP 52622A zeigen für das plasmodiale Enzym extrem niedrige K_i -Werte zwischen 3 und 20 nM. Die APA-Vorstufen AO-Agmatin und GAPA besitzen weit schlechtere K_i -Werte, die statt im nanomolaren nur im millimolaren Bereich liegen.

ODC/AdoMetDC	
ODC-Inhibitoren	K_i-Wert [nM]
APA	$2,7 \pm 0,5$
CGP 54169A	$5,9 \pm 1,2$
CGP 52622A	$17,0 \pm 6,7$
AO-Agmatin	1960 ± 280
GAPA	7330 ± 860
AdoMetDC-Inhibitoren	K_i-Wert [μM]
CGP 40215A	$1,3 \pm 0,2$
CGP 48664A	n.b.
AMA	$17,7 \pm 5,5$
MDL 73811	$1,6 \pm 0,4$

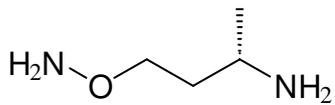
Tab. 3: Effekt von ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren auf die Enzymaktivitäten. Die K_i -Werte wurden mit der rekombinanten, bifunktionalen *Pf*-ODC/AdoMetDC bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von vier bis sechs unabhängigen Versuchen.



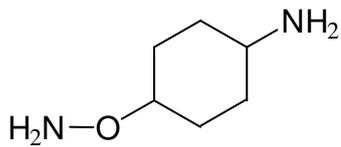
DFMO



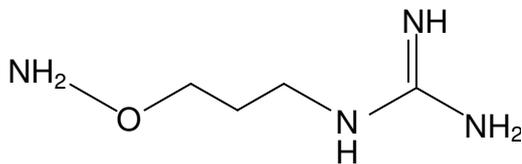
APA



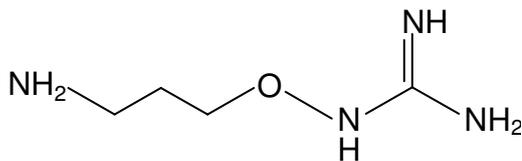
CGP 54169A



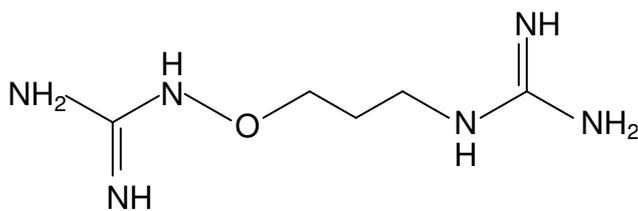
CGP 52622A



AO-Agmatin



GAPA



bis-GAPA

Abb. 8: Strukturen der ODC-Inhibitoren

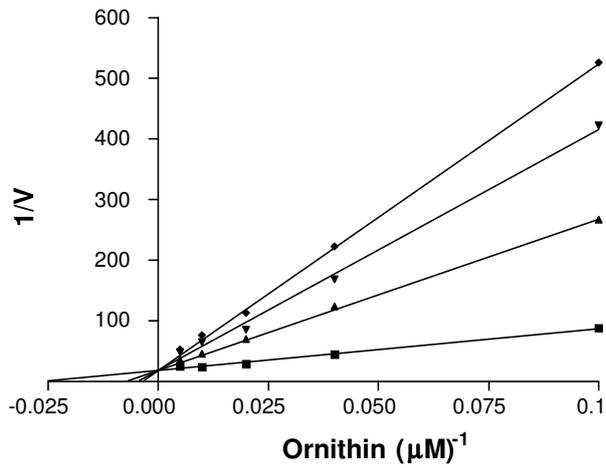


Abb 9: Inhibierung der *PfODC* durch APA. Für die Bestimmung des K_i -Werts wurden folgende Inhibitorkonzentrationen eingesetzt: 0 (■), 2 (▲), 4 (▼), 6 (◆) nM. V entspricht $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

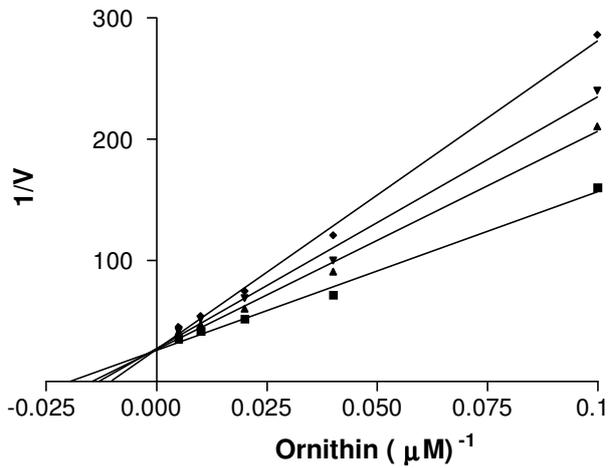


Abb 10: Inhibierung der *PfODC* durch CGP 54169A. Für die Bestimmung des K_i -Werts wurden folgende Inhibitorkonzentrationen eingesetzt: 0 (■), 5 (▲), 8 (▼), 11 (◆) nM. V entspricht $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

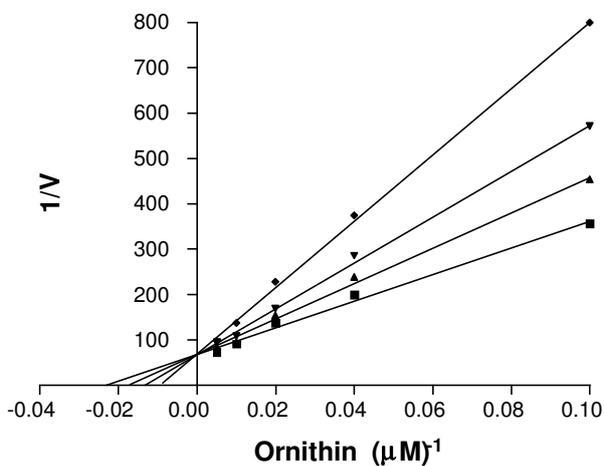


Abb 11: Inhibierung der *PfODC* durch CGP 52622A. Für die Bestimmung des K_i -Werts wurden folgende Inhibitorkonzentrationen eingesetzt: 0 (■), 10 (▲), 15 (▼), 20 (◆) nM. V entspricht $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

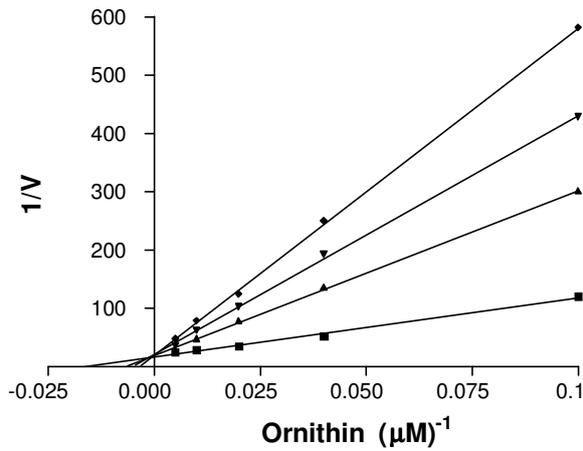


Abb 12: Inhibierung der *PfODC* durch AO-Agmatin. Für die Bestimmung des K_i -Werts wurden folgende Inhibitorkonzentrationen eingesetzt:
0 (■), 2,5 (▲), 5 (▼), 7,5 (◆) μM .
 V entspricht $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

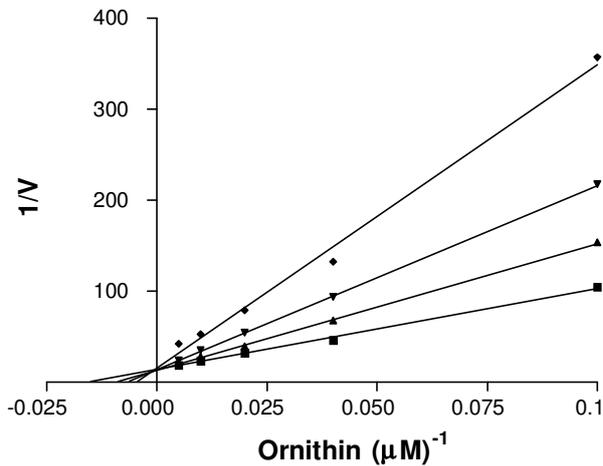


Abb 13: Inhibierung der *PfODC* durch GAPA. Für die Bestimmung des K_i -Werts wurden folgende Inhibitorkonzentrationen eingesetzt:
0 (■), 5 (▲), 10 (▼), 15 (◆) μM .
 V entspricht $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

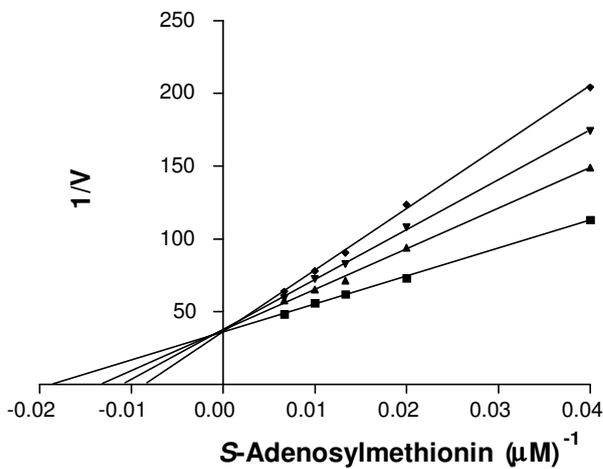
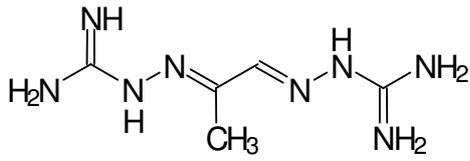
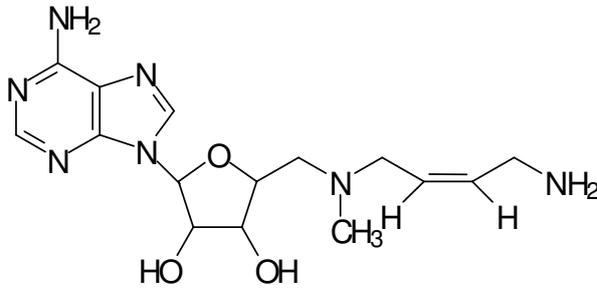


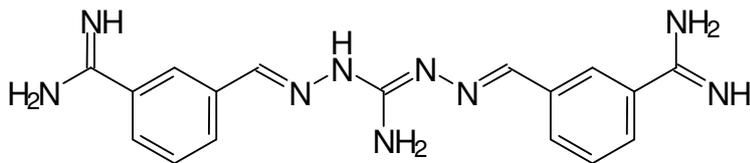
Abb 14: Inhibierung der *PfAdoMetDC* durch CGP 40215A. Für die Bestimmung des K_i -Wertes wurden folgende Inhibitor-konzentrationen eingesetzt:
0 (■), 0,5 (▲), 1,0 (▼), 2,0 (◆) μM .
 V entspricht $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.



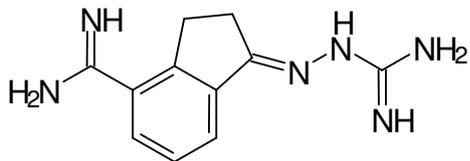
MGBG



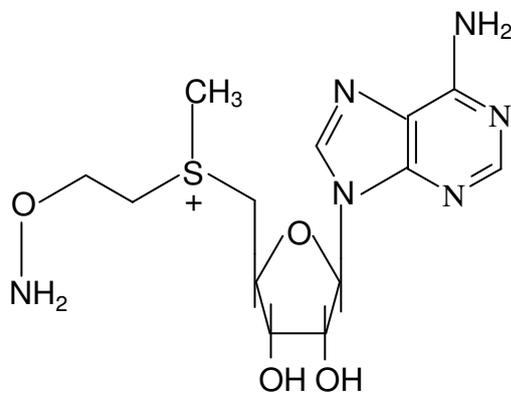
MDL 73811



CGP 40215A



CGP 48664A



AMA

Abb. 15: Strukturen der AdoMetDC-Inhibitoren

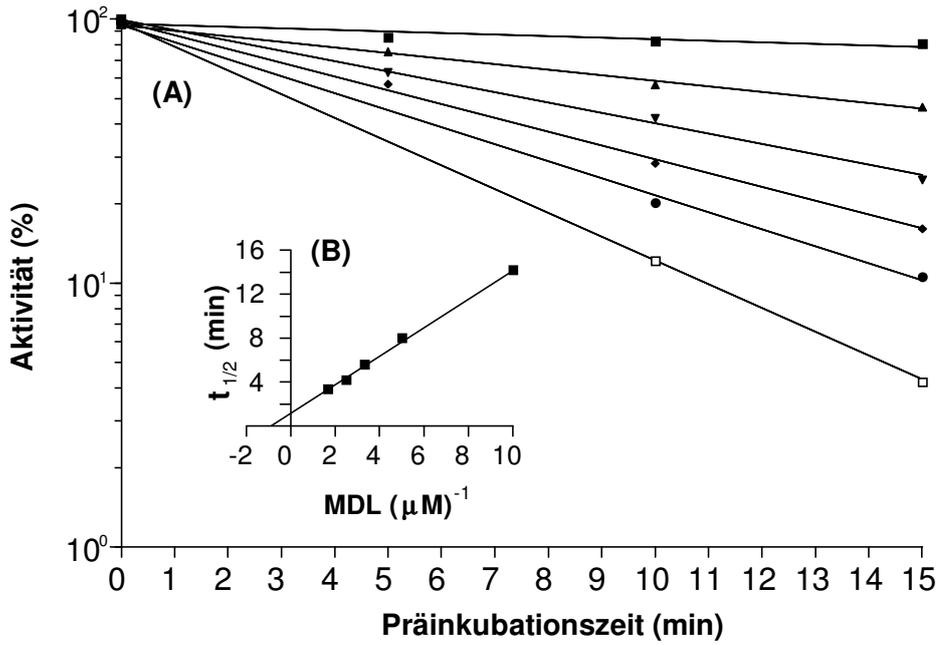


Abb. 16: Zeitabhängige Inhibierung der *PfAdoMetDC* durch MDL 73811 (A). Das Enzym wurde für drei verschiedene Zeitintervalle (5 min, 10 min, 15 min) mit 0 (■), 0,1 (▲), 0,2 (▼), 0,3 (◆), 0,4 (●) und 0,6 (□) µM MDL 73811 präinkubiert. Die Präinkubation wurde im Standardtestpuffer mit Zusatz von MDL 73811, aber ohne Substrat durchgeführt. Darstellung von $t_{1/2}$ gegen $(\text{MDL } 73811)^{-1}$ (B).

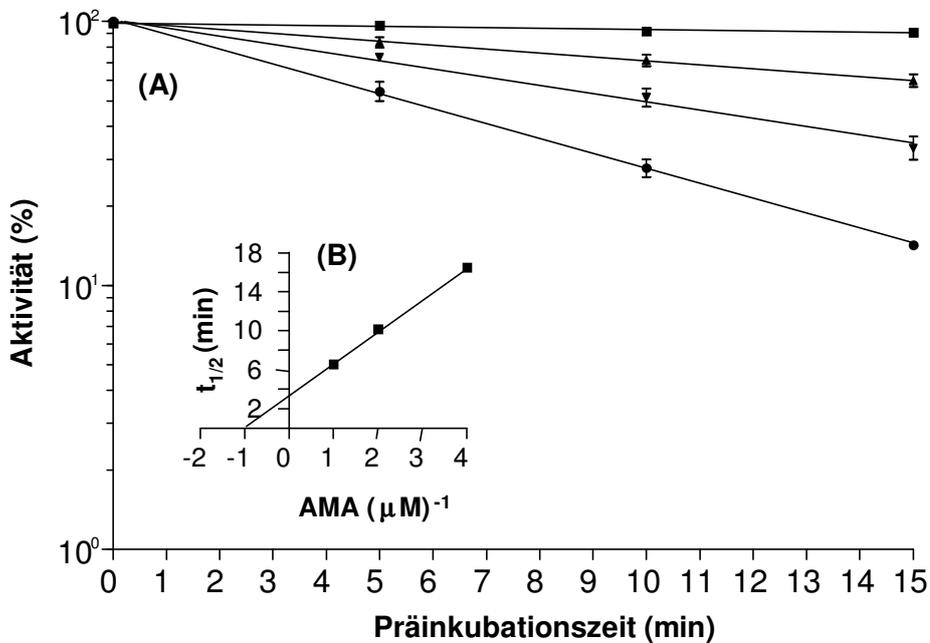


Abb. 17: Zeitabhängige Inhibierung der *PfAdoMetDC* durch AMA (A). Das Enzym wurde für drei verschiedene Zeitintervalle (5 min, 10 min, 15 min) mit 0 (■), 0,25 (▲), 0,5 (▼) und 1,0 (●) µM AMA präinkubiert. Die Präinkubation wurde im Standardtestpuffer mit Zusatz von AMA, aber ohne Substrat durchgeführt. Darstellung von $t_{1/2}$ gegen $(\text{AMA})^{-1}$ (B).

3.4 Effekt von ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren auf *P. falciparum* in Kultur

Der Einfluss verschiedener ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren auf das Wachstum von *P. falciparum* wurde evaluiert, indem die Parasiten in Gegenwart steigender Inhibitor-konzentrationen kultiviert wurden. Die Wachstumsrate von *P. falciparum*, untersucht mittels des Einbaus von [³H]-Hypoxanthin, ist von allen eingesetzten Inhibitoren beeinflusst worden. Im Vergleich dazu wurden die Inhibitoren gegen murine B-Lymphozyten getestet. Entsprechende Daten über eine humane T₂₄ Blasenkrebs-Zelllinie (Regenass *et al.*, 1994; Stanek *et al.*, 1992; Stanek *et al.*, 1993) wurden zu Vergleichszwecken ebenfalls herangezogen. Tab. 4 fasst die errechneten IC₅₀-Werte zusammen. Im Vergleich zu dem klassischen ODC-Inhibitor DFMO erwiesen sich die ODC-Inhibitoren APA, CGP 54169A und CGP 52622A hinsichtlich des *P. falciparum*-Enzyms um das 500- bis 1300-fache effektiver. Bezüglich der AdoMetDC-Inhibitoren zeigte CGP 40215A mit 1,8 µM den besten IC₅₀-Wert, gefolgt von dem bereits etablierten AdoMetDC-Inhibitor MDL 73811. CPG 48664A, in Säugetierzellen ein recht effektiver Inhibitor, lag mit einem IC₅₀-Wert von 8,8 µM etwa um das fünffache höher als CGP 40215A. Das ebenfalls untersuchte AdoMet-Analogon AMA, ein irreversibler Inhibitor der AdoMetDC, wies nur einen sehr geringen Effekt mit einem IC₅₀-Wert von 100 µM auf. Versuche, in denen APA mit MDL 73811 kombiniert wurde, zeigten einen additiven, aber keinen synergistischen Effekt auf das Wachstum von *P. falciparum* (Abb. 18).

Die ODC-Inhibitoren AO-Agmatin und GAPA sind Agmatin-Analoga und hinsichtlich ihrer chemischen Beschaffenheit Vorstufen von APA. Diese als „pro drugs“ von APA, CGP 54169A und CGP 52622A konzipierten Verbindungen wiesen jedoch bei weitem nicht so effektive IC₅₀-Werte auf wie APA und dessen Derivate selbst.

Vergleicht man die Daten mit jenen bezüglich der Säugetierzellen, so zeigt sich, dass die *P. falciparum*-Kulturen mit Ausnahme des AdoMetDC-Inhibitors CGP 48664A eine höhere Sensitivität (4-40-fach) gegenüber den Inhibitoren aufweisen als die Säugetierzellen.

Die gleichzeitige, exogene Zugabe von Putrescin zu den *P. falciparum*-Kulturen, die mit ODC-Inhibitoren behandelt wurden, führte zur Aufhebung des Wachstumsstopps; dies untermauerte die Spezifität der Inhibitoren APA, CGP 54169A und CGP 52622A und zeigte, dass die Putrescinsynthese von diesen Inhibitoren direkt blockiert wird.

Die Zugabe von Spermidin hingegen vermag die durch die ODC-Inhibitoren bewirkte Wachstumsinhibierung nicht aufzuheben (Abb. 19) und veränderte auch den Effekt der AdoMetDC-Inhibitoren nur in geringem Maße.

	IC ₅₀ -Wert in <i>P. falciparum</i> -Kultur	IC ₅₀ -Wert in Säugerzellen-Kultur
ODC-Inhibitoren	[μM]	[μM]
APA	1,0 \pm 0,3	12,8 \pm 3,6 / 24,4 ⁺
CGP 54169A	2,0 \pm 0,3	40,8 \pm 16,3
CGP 52622A	2,7 \pm 0,2	12,2 \pm 3,2
DFMO	1250 \pm 420	n.b.
AO-Agmatin	92,5 \pm 12,6	n.b.
GAPA	166,7 \pm 41,6	n.b.
AdoMetDC-Inhibitoren	[μM]	[μM]
CGP 40215A	1,8 \pm 0,4	74,4 \pm 3,8 / > 100 [*]
CGP 48664A	8,8 \pm 1,7	0,18 \pm 0,07 / 0,6 [#]
MDL 73811	3,0 \pm 0,4	n.b.
AMA	100,0	n.b.

Tab. 4: Effekt von ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren auf die Überlebensrate von *P. falciparum* in Kultur sowie auf Säugetierzellen. Die IC₅₀-Werte wurden für *P. falciparum*-Zellen und murine B-Lymphozyten (A20/J2 Zellen) 48 h nach Zugabe des jeweiligen Inhibitors ermittelt. Die Daten für die humanen T₂₄ Blasenkrebszellen sind übernommen von ⁺(Stanek et al., 1992), ^{*}(Stanek et al., 1993); [#](Regenass et al., 1994). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von drei unabhängigen Versuchen.

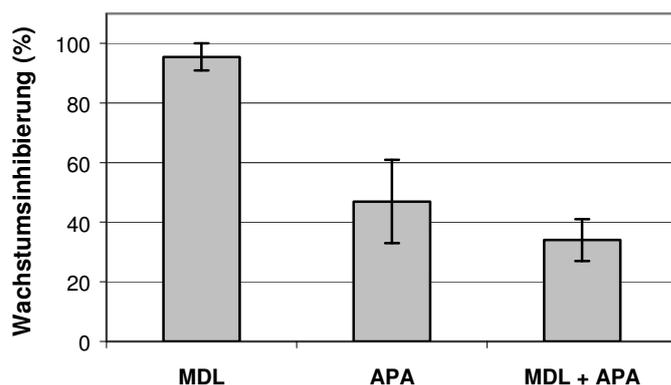
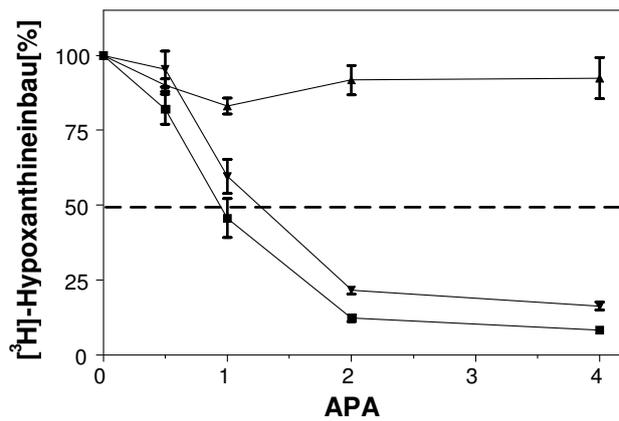
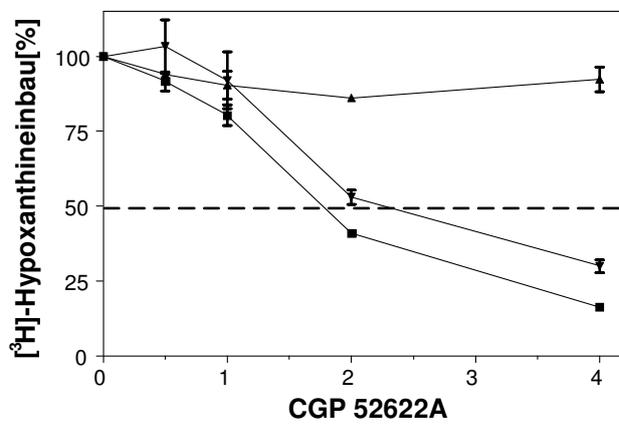


Abb. 18: Wachstumsinhibierung von *P. falciparum* in Kultur durch MDL 73811 (1,5 μ M), APA (1,0 μ M) und Kombination von MDL 73811 und APA (1,5 μ M/1,0 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Versuchen \pm Standardabweichung.

(A)



(B)



(C)

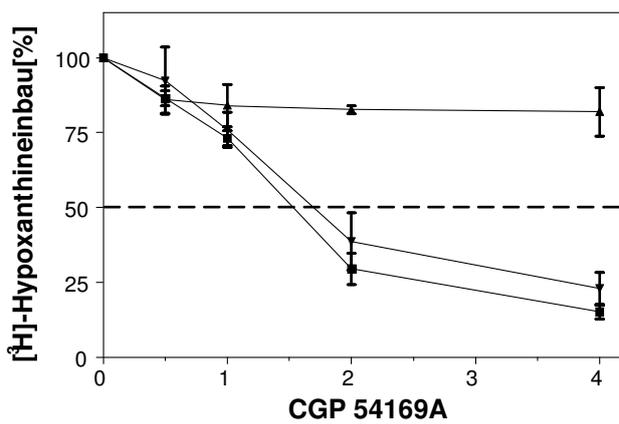


Abb. 19: Effekt exogener Polyamine auf die IC_{50} -Werte der mit ODC-Inhibitoren behandelten *P. falciparum*-Kulturen. Dem *P. falciparum*-Kulturmedium wurden 0 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 4 μ M APA (A), CGP 52622A (B) oder CGP 54169A (C) sowie 500 μ M Putrescine (▲) oder Spermidin (▼) zugesetzt. Die Kontrollzellen (■) wurden ohne Polyaminzusatz geführt.

3.5 Einfluss von Inhibitoren der Polyamin-Synthese auf das Polyaminmuster von *P. falciparum* in Kultur

Die effektivsten der getesteten ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren wurden auch hinsichtlich ihres Einflusses auf die intrazellulären Polyaminkonzentrationen untersucht. Zu diesem Zweck wurden *P. falciparum*-Kulturen für 24 h bzw. 48 h mit subletalen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors versetzt. Danach wurden die infizierten Erythrozyten mit Hilfe eines Percoll-L-Alanin-Gradienten von den nichtinfizierten Erythrozyten getrennt, die Zellen aufgeschlossen und die Veränderungen der Polyaminkonzentrationen analysiert.

Wie aus Tab. 5 ersichtlich, beeinflusst der ODC-Inhibitor APA die Putrescinnmengen in infizierten Erythrozyten schon in geringen Konzentrationen. Die Behandlung mit 2 µM APA für 24 h führte zu einer fast vollständigen Abnahme des Putrescins. Das Verhältnis von Spermidin zu Putrescin nahm von 4:1 in den Kontrollen bis zu 22:1 in den behandelten Zellen zu; als Konsequenz des verringerten Putrescinlevels nahmen jedoch auch die Spermidinkonzentrationen insgesamt um 80% ab, während die Sperminmengen anstiegen. Die Zugabe von 5 µM des ODC-Inhibitors CGP 52622A für 24 h resultierte ebenfalls in einer bemerkenswerten Reduktion der Putrescin- und Spermidinkonzentrationen um durchschnittlich 50%. Ähnlich des durch die Behandlung mit APA erzielten Effekts zeigen die Sperminlevel eine geringe, aber deutliche 3-fache Zunahme nach der Zugabe von 5 µM CGP 52622A. Die Inkubation von *P. falciparum*-Kulturen mit 1 µM CGP 54169A für 24 h resultierte ebenfalls in einer drastischen Abnahme der Putrescin- und Spermidinkonzentrationen, die auf 22% und 38% reduziert waren. Wie bei APA und CGP 52622A waren die Sperminlevel erhöht. Eine Behandlung des Parasiten mit 5 µM CGP 54169A resultierte in einer 95%igen Reduktion des Putrescins; die Spermidinlevel fielen um mehr als 80%. Im Vergleich dazu war der Effekt der „pro drugs“ AO-Agmatin, GAPA und bis-GAPA nicht so gravierend. Alle drei zeigten erst bei einer Konzentration von 10 µM eine Abnahme der Putrescinkonzentration. Im Falle von bis-GAPA und AO-Agmatin sanken auch die Spermidinkonzentrationen. Nicht so deutlich war der Effekt auf Spermidin bei GAPA; hier stieg die Konzentration nur wenig an. Der AdoMetDC-Inhibitor MDL 73811 zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt. Die Behandlung resultierte in deutlich erhöhten Putrescinlevels und verringerten Spermidinkonzentrationen in den behandelten Zellen.

Behandlung (24 h)	Intrazelluläre Polyamine [nmol 10 ¹⁰ Zellen ⁻¹]		
	Putrescin	Spermidin	Spermin
Kontrolle	272,4 ± 37,1	1007,8 ± 118,7	49,9 ± 5,5
1 µM APA	52,6 ± 38,0	319,2 ± 180,1	69,4 ± 9,9
2 µM APA	10,1 ± 4,8	222,7 ± 105,4	88,8 ± 6,6
Kontrolle	410,2 ± 87,0	1550,5 ± 76,0	83,5 ± 3,3
1 µM CGP 54169A	91,7 ± 28,5	589,2 ± 198,0	187,1 ± 35,6
5 µM CGP 54169A	23,4 ± 13,3	287,5 ± 127,9	202,0 ± 59,3
Kontrolle	453,9 ± 100,4	888,9 ± 245,7	38,9 ± 23,5
1 µM CGP 52622A	342,9 ± 99,4	641,0 ± 162,1	81,5 ± 67,2
5 µM CGP 52622A	286,6 ± 85,6	489,1 ± 106,3	117,7 ± 100,8
Kontrolle	462,0	816,5	18,5
5 µM GAPA	408,5	778,0	43,5
10 µM GAPA	285,0	1012,5	59,0
Kontrolle	753,0	613,0	9,0
5 µM AO-Agmatin	769,5	633,3	31,0
10 µM AO-Agmatin	475,0	423,5	50,0
Kontrolle	794,0	1291,5	76,0
5 µM bis-GAPA	576,5	1046,5	135,0
10 µM bis-GAPA	444,0	939,0	139,5

Tab. 5: Effekt der ODC-Inhibitoren APA, CPG 54169A, CGP 52622A, GAPA, AO-Agmatin und bis-GAPA auf die Polyaminmuster *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten. Die Daten repräsentieren bezüglich APA, CGP 52622A und CGP 54169A den Durchschnitt ± der Standardabweichung von vier bis fünf unabhängigen Versuchen; im Falle von GAPA, AO-Agmatin und bis-GAPA wird der Mittelwert aus zwei Versuchen gezeigt.

Eine Inkubation mit 5 µM MDL 73811 für 24 h erhöhte den Putrescinlevel um das 3-fache und die Spermidinkonzentrationen nahmen um 67% ab.

Die Sperminmengen waren nach einer Behandlung für 48 h mit dieser Verbindung ebenfalls verringert. Im Gegensatz zu MDL 73811 beeinflusste die Inkubation mit den

AdoMetDC-Inhibitoren CGP 40215A und CGP 48664A die Polyaminmuster infizierter Erythrozyten nicht (Tab. 6).

Behandlung (24 h)	Intrazelluläre Polyamine [nmol 10¹⁰ Zellen⁻¹]		
	Putrescin	Spermidin	Spermin
Kontrolle	172,9 ± 76,6	649,5 ± 129,2	24,6 ± 3,4
1 µM MDL 73811	367,3 ± 40,1	301,2 ± 22,3	29,4 ± 3,4
5 µM MDL 73811	515,0 ± 168,9	213,1 ± 25,6	33,4 ± 9,2
Kontrolle	334,1 ± 24,7	935,3 ± 93,2	64,7 ± 6,9
5 µM CGP 40215A	262,2 ± 33,2	1182,9 ± 179,6	84,5 ± 16,0
Behandlung (48 h)			
Kontrolle	261,8 ± 40,6	743,9 ± 68,0	39,3 ± 15,6
1 µM MDL 73811	616,2 ± 124,3	594,8 ± 120,9	17,8 ± 4,4
5 µM MDL 73811	822,6 ± 151,9	335,0 ± 117,5	13,6 ± 5,0
Kontrolle	479,5 ± 128,1	1045,6 ± 144,6	41,1 ± 8,4
2 µM CGP 40215A	422,9 ± 124,9	1246,5 ± 110,9	46,8 ± 13,0
4 µM CGP 40215A	379,7 ± 200,2	1169,3 ± 175,6	50,5 ± 14,2
Kontrolle	364,4 ± 149,5	1312,0 ± 650,9	73,2 ± 33,9
5 µM CGP 48664A	362,9 ± 185,1	1337,3 ± 516,5	94,2 ± 61,4
10 µM CGP 48664A	465,4 ± 270,8	1211,9 ± 897,4	91,8 ± 59,0
Kontrolle	400,3 ± 122,0	772,7 ± 367,2	56,0 ± 53,2
1 µM AMA	324,6 ± 102,8	624,5 ± 471,1	36,6 ± 34,3
10 µM AMA	598,6 ± 287,7	887,8 ± 704,0	71,2 ± 53,7

Tab. 6: Effekt der AdoMetDC-Inhibitoren MDL 73811, CGP 40215A, CGP 48664A und AMA auf die Polyaminmuster *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt ± der Standardabweichung von drei bis fünf unabhängigen Versuchen.

3.6 Klonierung und Expression der rekombinanten AdoMet-Synthetase von *P. falciparum*

Die *PfAdoMet*-Synthetase wurde mittels einer PCR auf *Pf*-cDNA amplifiziert. Das erhaltene 1,2 kb große Fragment (Abb. 20) wurde in den Vektor pJC40 kloniert und in DH5 α -Zellen transformiert. Ein Verdau der DNA mit *Xho*I und *Apa*I (Abb. 21) zeigte bei den positiven Klonen eine Bande bei ca. 1,2 kb (*AdoMet*-Synthetase) und eine bei ca. 2,5 kb (pJC40). Der offene Leserahmen wurde durch eine anschließende Sequenzanalyse kontrolliert.

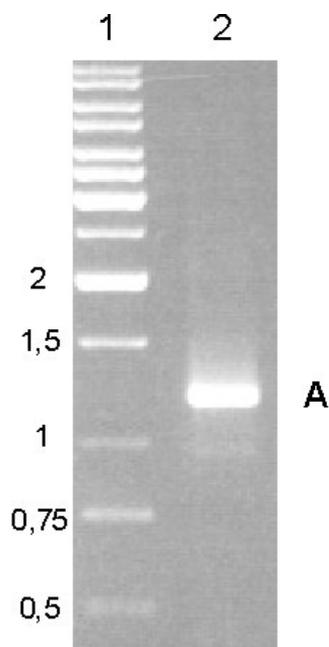


Abb. 20: PCR-Produkt der *AdoMet*-Synthetase von *P. falciparum*. Die Abbildung zeigt ein Agarosegel mit einem PCR-Produkt von 1200 bp (**A**). Als DNA-Größenstandard wurde ein 1 kb-Leiter aufgetragen.

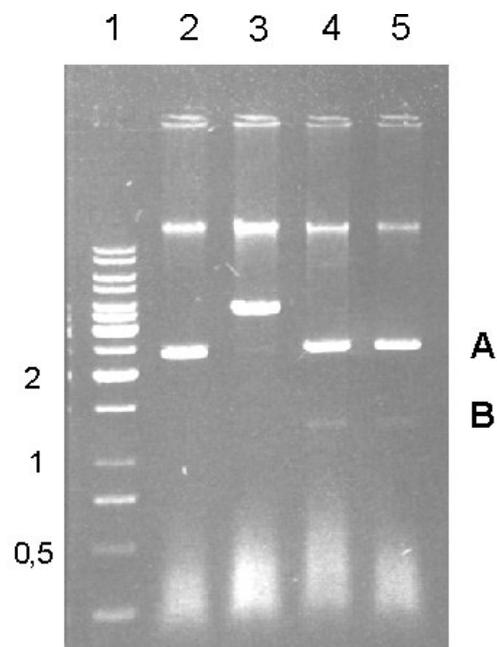


Abb. 21: *PfAdoMet*-Synthetase in pJC40. Das Gel zeigt die pJC40*PfAdoMet*-Synthetase nach Verdau mit *Xho*I/*Apa*I. Spur 4 und 5 zeigen je ein Fragment von 2,5 kb (**A**) und eines von 1,2 kb (**B**). Als DNA-Größenstandard wurde ein 1 kb-Leiter aufgetragen.

Die Expression der *P. falciparum*-AdoMet-Synthetase wurde in den *E. coli*-Zelllinien EWH 331, Rosetta gami B und BLR DE3 pLys S getestet. Die höchste Ausbeute an Protein konnte in den Rosetta gami B-Zellen erhalten werden. Nach Expression und Reinigung der rekombinanten AdoMet-Synthetase über eine Ni-NTA-Säule und anschließenden Waschschritten wurde mit einer SDS-PAGE die Reinheit des Enzyms überprüft. Abb. 22 zeigt nach Färbung des Gels mit Coomassie-blue eine 44 kD-Bande, was der Größe des His-Tag-Fusionsproteins entspricht.

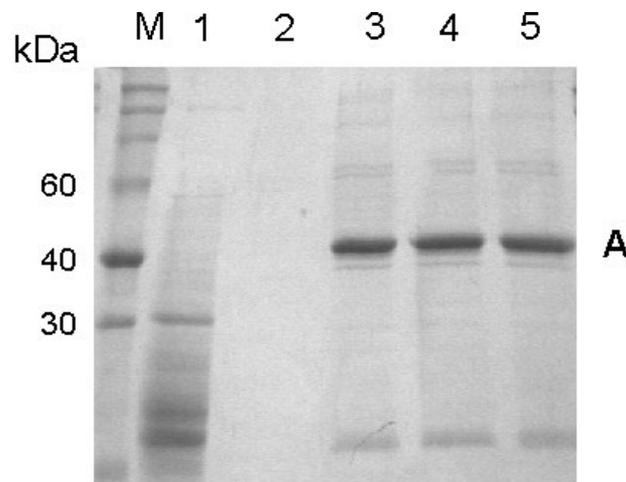


Abb. 22: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Expression der rekombinanten *PfAdoMet*-Synthetase in Rosetta gami-Zellen. Für die Expression wurden die Zellen mit 1 mM IPTG induziert und ÜN bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert, das Pellet in Binding-Puffer (Qiagen) resuspendiert, sonifiziert und bei 100000 x g nochmals abzentrifugiert. Im Anschluss wurde eine Ni²⁺-NTA-Chromatographie durchgeführt. **M:** Proteinmarker (Roti-Mark), **1:** Waschlösung, **2:** nichtinduzierte Expression, **3-6:** IPTG-induzierte Expression, **A:** Position der rekombinant exprimierten *PfAdoMet*-Synthetase.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der AdoMet-Synthetase wurde das gereinigte Enzym auf eine geeichte Sephadex S-200-Säule aufgetragen, das Eluat in 2 ml-Fractionen aufgefangen und die Proteinkonzentration bestimmt. Die proteinhaltigen Fractionen wurden mit Hilfe des Standard-Aktivitätstests auf ihre Enzymaktivität untersucht. Die AdoMet-Synthetase eluierte in Fraction 51 (Abb. 23), was entsprechend der Eichung der FPLC-Säule einer molekularen Masse von 44 kDa entspricht. Des Weiteren zeigt das Elutionsprofil nur einen einzelnen Peak. Dies deutet darauf hin, dass die AdoMet-Synthetase als Monomer vorliegt.

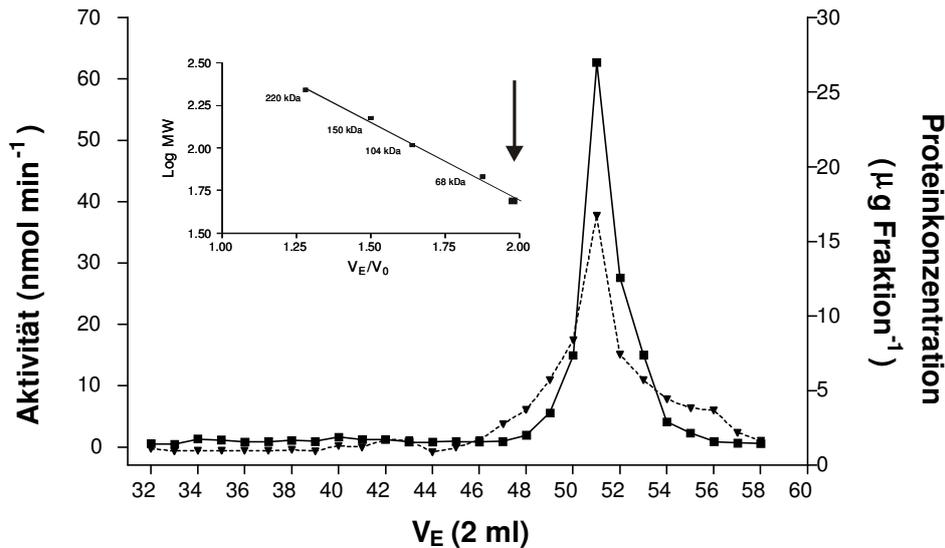


Abb. 23: Elutionsprofil der AdoMet-Synthetase. Das Enzym wurde mittels einer Gelfiltration über eine Sephadex S-200-Säule eluiert, in 2 ml-Fractionen aufgefangen und die Aktivität im Standardassay ermittelt. Sowohl die Enzymaktivität (■) als auch die Proteinkonzentration (▼) ist auf die 2 ml-Fractionen bezogen.

3.6.1 Bestimmung des pH-Optimums der AdoMet-Synthetase

Der Aktivitätstest für die AdoMet-Synthetase wurde unter Standardtest-Bedingungen, aber mit drei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt, um festzustellen, in welchem pH-Bereich das Enzym eine optimale Katalyseaktivität zeigt. Der pH-Bereich von pH 6,0-8,0 wurde von einem 50 mM KH₂PO₄-Puffer, jener von pH 8,0-9,0 von einem Tris-Puffer und der pH-Bereich zwischen 9,0-10,0 mittels eines Glycin-Puffers abgedeckt. Wie aus Abb. 24 ersichtlich liegt der optimale pH-Wert bei pH 8,0. Diese Pufferbedingungen wurden im Folgenden für den Standardtest verwendet.

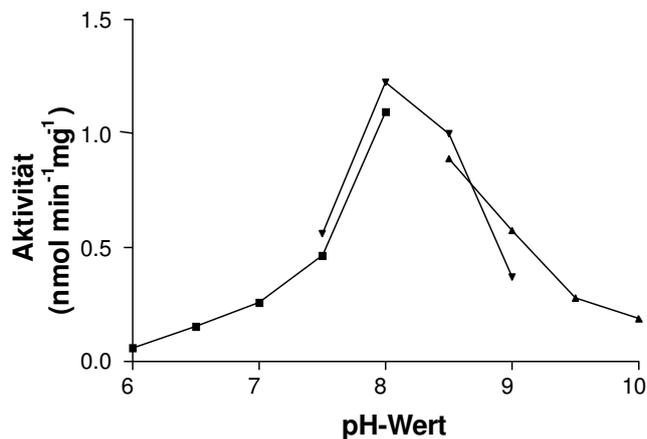


Abb. 24: pH-Optimum der AdoMet-Synthetase. Dargestellt ist die Katalyseaktivität der AdoMet-Synthetase bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlicher Puffer: 50 mM KH₂PO₄-Puffer (■; pH 6,0-8,0), 100 mM Tris-HCl-Puffer (▼; pH 7,5-9,0), 50 mM Glycin (▲; pH 8,5-10,0).

3.6.2 Abhängigkeit der AdoMet-Synthetase von KCl

Das aktive Zentrum der AdoMet-Synthetase bindet - neben zwei divalenten Metallionen (z.B. Mg^{2+}) - auch ein monovalentes Kation (K^+); sowohl das ein- als auch die zweiwertigen Ionen werden für eine maximale Katalyseaktivität des Enzyms benötigt (Markham et al., 1980; Markham, 1981; Markham, 1984; Zhang et al., 1993; McQueney und Markham, 1995). Um zu überprüfen, bei welcher KCl-Konzentration die AdoMet-Synthetase optimale Katalyseaktivität zeigt, wurden dem Standardaktivitätstest steigende Mengen an KCl zugesetzt. Wie aus Abb. 25 hervorgeht, weist die AdoMet-Synthetase ab einer KCl-Konzentration von 100 mM einen optimalen Substratumsatz auf.

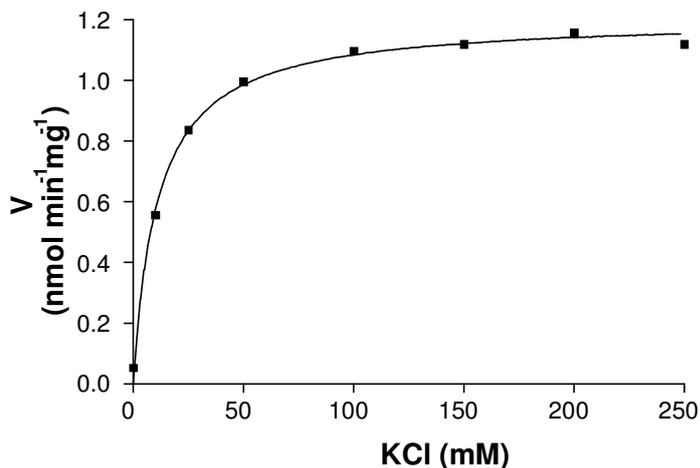


Abb. 25: Enzymaktivität der AdoMet-Synthetase bei steigenden KCl-Konzentrationen; eingesetzt wurden 0 - 250 mM KCl.

3.6.2.1 Bestimmung des K_m -Wertes der AdoMet-Synthetase für Methionin

Zur Bestimmung des K_m -Wertes der rekombinanten AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* für das Substrat Methionin wurden unter Standardtest-Bedingungen variierende Konzentrationen an Methionin (25-500 μ M) eingesetzt. Der so ermittelte K_m -Wert lag bei $86,2 \pm 7,1 \mu$ M (Abb. 26). Die spezifische Aktivität betrug $1,2 \pm 0,04$ nmol/min/mg Protein.

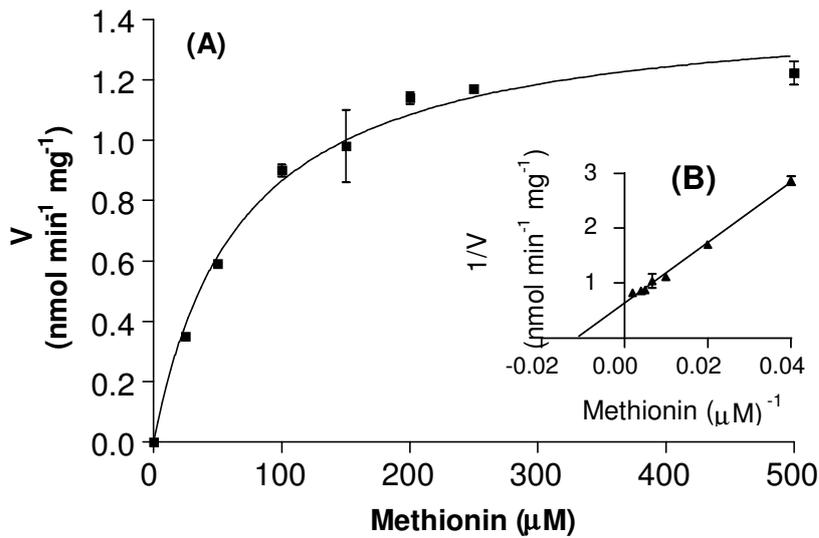


Abb. 26: K_m -Wert der *PfAdoMet*-Synthetase für Methionin. Für die Bestimmung des K_m -wertes wurden Methionin-Konzentrationen von 25-500 μM eingesetzt. (A): Michaelis-Menten-Diagramm, (B): Lineweaver-Burk-Diagramm.

3.6.2.2 Bestimmung des K_m -wertes für ATP

Der K_m -Wert der *AdoMet*-Synthetase von *P. falciparum* für ATP wurde mit steigenden ATP-Konzentrationen (0,2-2,5 mM) ermittelt. Der K_m -Wert lag bei $446 \pm 49 \mu\text{M}$ (Abb. 27). Die spezifische Aktivität betrug $218,6 \pm 19,7 \text{ pmol/min/mg Protein}$.

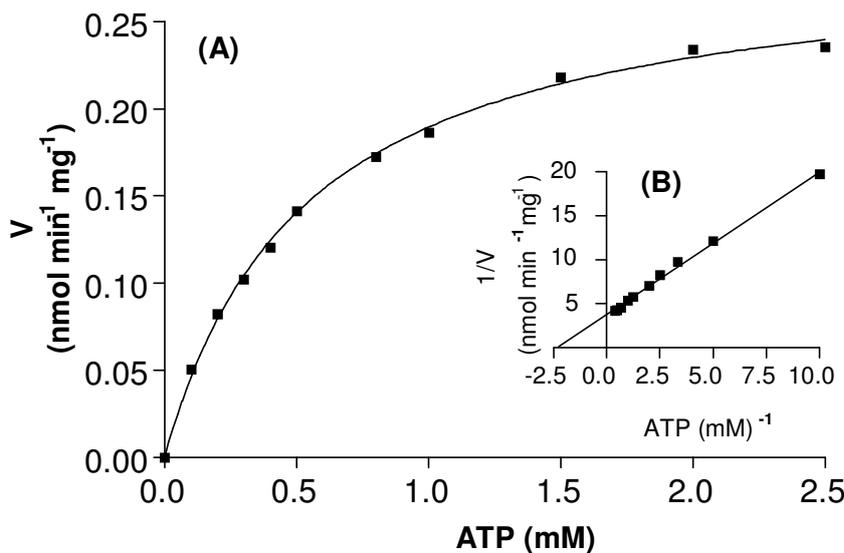


Abb. 27: K_m -Wert der *PfAdoMet*-Synthetase für ATP. Für die Bestimmung des K_m -wertes wurden ATP-Konzentrationen von 0,1-2,5 mM eingesetzt. (A):Michaelis-Menten-Diagramm, (B): Lineweaver-Burk-Diagramm.

3.7 Einfluss des AdoMet-Synthetase-Inhibitors Selenomethionin und des AdoMetDC-Inhibitors CGP 40215A auf die Enzymaktivität der PfAdoMet-Synthetase

3.7.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte für Selenomethionin und CGP 40215A

Das Substratanalogon Selenomethionin inhibiert die AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* mit einem IC₅₀-Wert von 132 µM, der IC₅₀-Wert des AdoMetDC-Inhibitors CGP 40215A für die AdoMet-Synthetase beträgt 39 µM (Abb. 28 und 29).

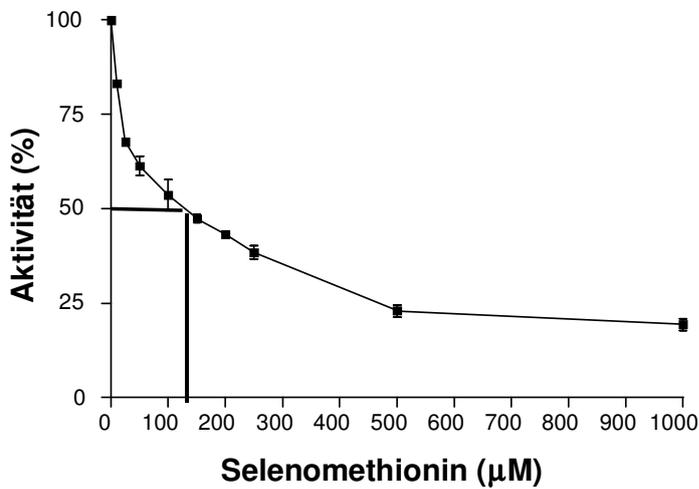


Abb. 28: IC₅₀-Bestimmung für den PfAdoMet-Synthetase-Inhibitor Selenomethionin. Eingesetzt wurden Selenomethionin-Konzentrationen von 0-1000 µM. Gezeigt ist die prozentuale Darstellung des Mittelwerts aus 3 unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung.

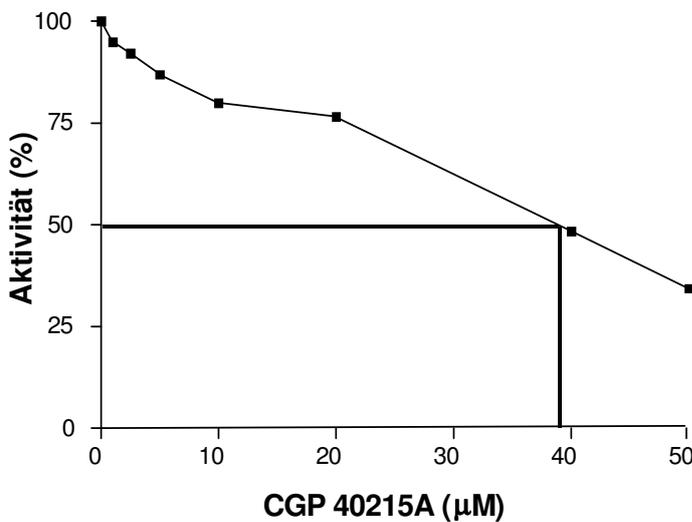


Abb. 29: IC₅₀-Bestimmung für den PfAdoMetDC-Inhibitor CGP 40215A. Eingesetzt wurden CGP 40215A-Konzentrationen von 0-50 µM. Gezeigt ist die prozentuale Darstellung des Mittelwerts einer Doppelbestimmung.

3.7.2 Bestimmung des K_i -Werts für Selenomethionin

Im Anschluss an die IC_{50} -Bestimmung wurde der Standardaktivitätstest zur Ermittlung des K_i -Werts durchgeführt; eingesetzt wurden Selenomethionin-Konzentrationen, die in der IC_{50} -Bestimmung die plasmodiale AdoMet-Synthetase inhibierten (50-200 μM). Der so erhaltene K_i -Wert betrug $89 \mu\text{M} \pm 16 \mu\text{M}$ (Abb. 30).

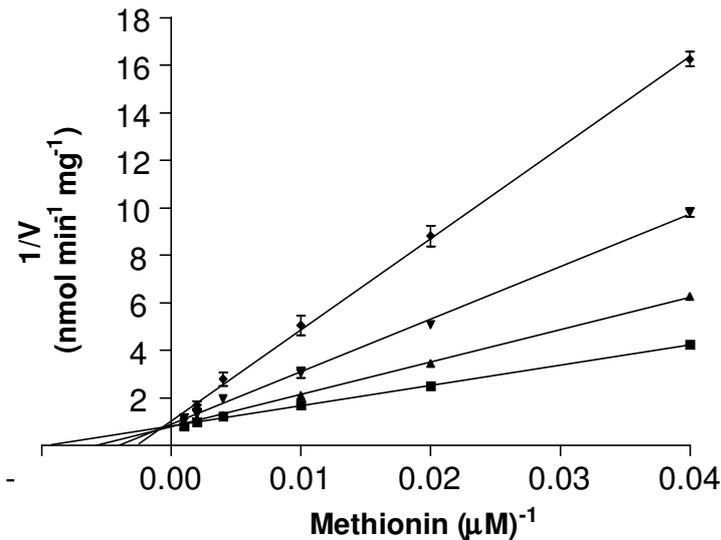


Abb 30: Inhibition der *Pf*AdoMet-Synthetase durch Selenomethionin. Für die Bestimmung des K_i -Werts wurden folgende Inhibitor-konzentrationen eingesetzt: 0, 50, 100, 200 μM .

3.8 Mutation konservierter Aminosäurereste der AdoMet-Synthetase in *P. falciparum*

Ein Vergleich (Abb. 33) der Aminosäuresequenz der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* mit den Sequenzen vier anderer pro- und eukaryotischer Organismen zeigt eine hohe Identität/Homologie zwischen der *P. falciparum*-Sequenz und den Sequenzen der Vergleichsorganismen (*E. coli* 48% / 66%, *H. sapiens* 56% / 75%, *L. donovani* 56% / 71%, *T. cruzi* 56% / 72%). Unter den konservierten Aminosäureresten befinden sich auch jene, die für die Vergleichsorganismen als essentiell für die Katalyseaktivität der AdoMet-Synthetase beschrieben wurden; die mit den Resten Asp²⁴ und Asp²⁷¹ korrespondierenden Aminosäuren sind an der Bindung der Mg²⁺-Ionen beteiligt, die für eine optimale Katalyseaktivität des Enzyms benötigt werden. Jene mit Asp¹²⁷ und Asp²³⁸ korrespondierenden Reste sind an der Methioninbindung und die dem Glu⁵⁰ entsprechenden Reste an der Bindung des K⁺-Ions beteiligt

(Taylor und Markham, 1999, Pérez-Pertejo, 2003). Zur Bestätigung der Hypothese, dass diese Reste auch bei dem plasmodialen Enzym essentiell für die Katalyseaktivität sind, wurden die Mutanten D²⁴N, D¹²⁷N, D²³⁸N, D²⁷¹N und E⁵⁰Q hergestellt, exprimiert und die Aktivität der entsprechenden Proteine ermittelt. Abb. 31 und Abb. 32 zeigen SDS-Elektrophoresegele der exprimierten Mutanten.

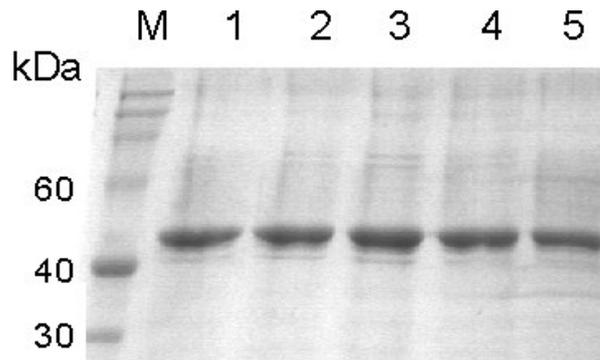


Abb. 31: SDS-PAGE der Mutanten D²⁴N, D¹²⁷N, D²³⁸N und D²⁷¹N der *PfAdoMet*-Synthetase. Das rekombinante Wildtyp-Enzym diente als Kontrolle. Sowohl Induktions-, Inkubations- als auch Ni²⁺-NTA-Chromatographiebedingungen der Mutanten glichen der Expression und Aufreinigung des Wildtyp-Enzyms. **M:** Proteinmarker, **1:** rekombinante AdoMet-Synthetase, **2:** Mutante D¹²⁷N, **3:** Mutante D²³⁸N, **4:** Mutante D²⁴N, **5:** Mutante D²⁷¹N.

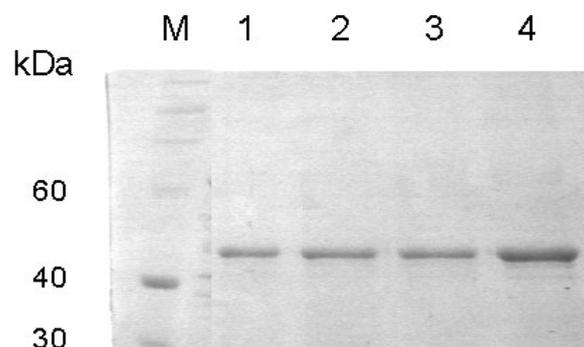


Abb. 32: SDS-PAGE der Mutanten E⁵⁰Q und D²⁷¹N der *PfAdoMet*-Synthetase. Das rekombinante Wildtyp-Enzym diente als Kontrolle. Sowohl Induktions-, Inkubations- als auch Ni²⁺-NTA-Chromatographiebedingungen der Mutanten glichen der Expression und Aufreinigung des Wildtyp-Enzyms. **M:** Proteinmarker, **1:** Mutante D²⁷¹N, **2:** Mutante E⁵⁰Q, **3:** Mutante E⁵⁰Q, **4:** rekombinante AdoMet-Synthetase.

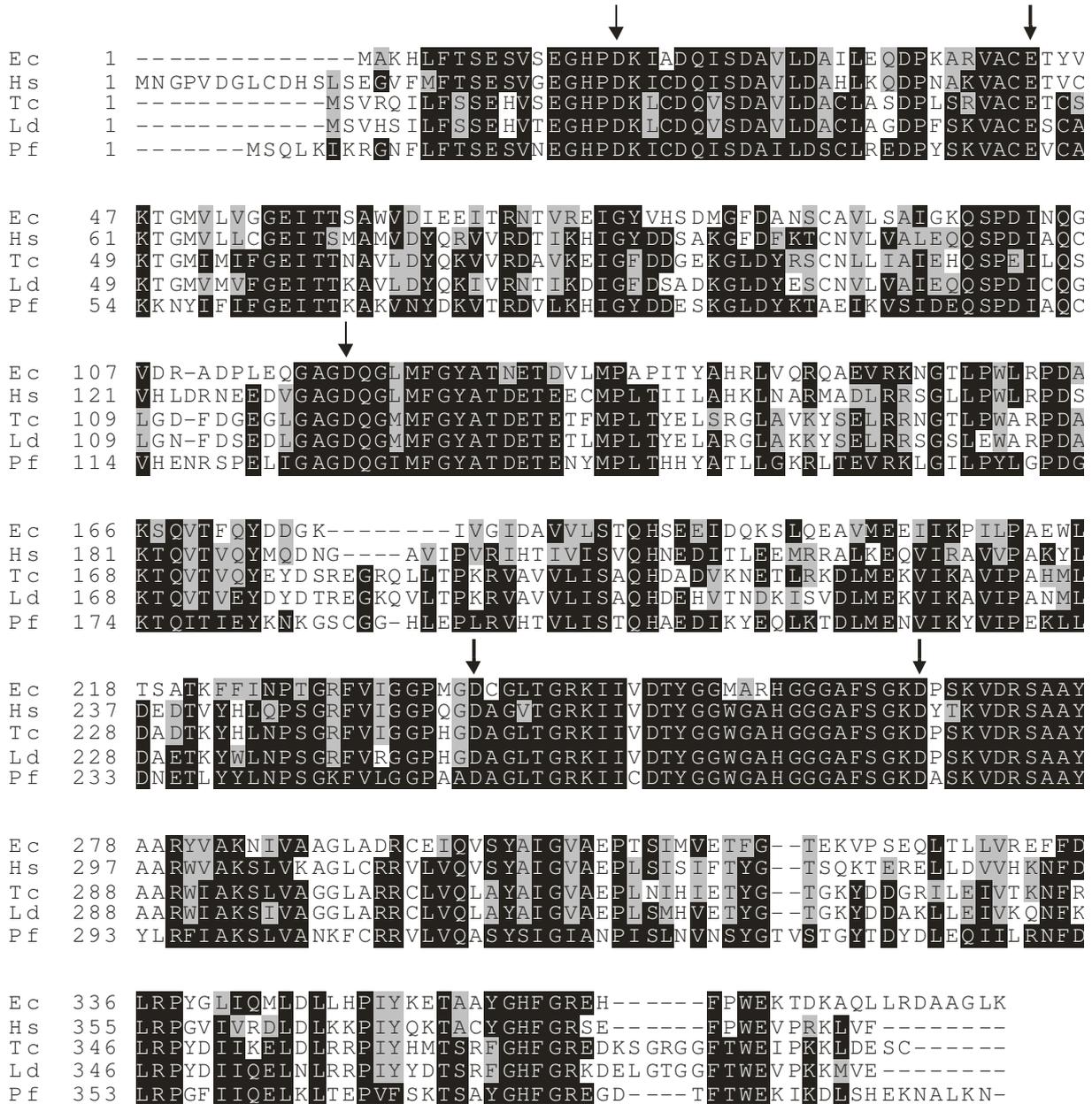


Abb. 23: Vergleich der Aminosäuresequenzen der AdoMet-Synthetasen von *E. coli* (Ec), *H. sapiens* (Hs), *L. donovani* (Ld) und *T. cruzi* (Tc) mit jener von *P. falciparum* (Pf). Identische Aminosäurereste sind schwarz, ähnliche grau gekennzeichnet. Die gegen Asparagin ausgetauschten Aspartatreste sowie der gegen Glutamin ausgetauschte Glutamatrest sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.8.1 Die Mutanten D¹²⁷N und D²³⁸N

Die Aminosäurereste Asp¹²⁷ und Asp²³⁸ wurden gegen Asparagin ausgetauscht, die jeweiligen Mutanten exprimiert und mittels des Standardaktivitätstests auf ihre Enzymaktivität untersucht. Wie aus Abb. 34 ersichtlich, zeigen beide Mutanten nur noch eine äußerst geringe Restaktivität von 1,1% (D¹²⁷N) bzw. 1,4% (D²³⁸N).

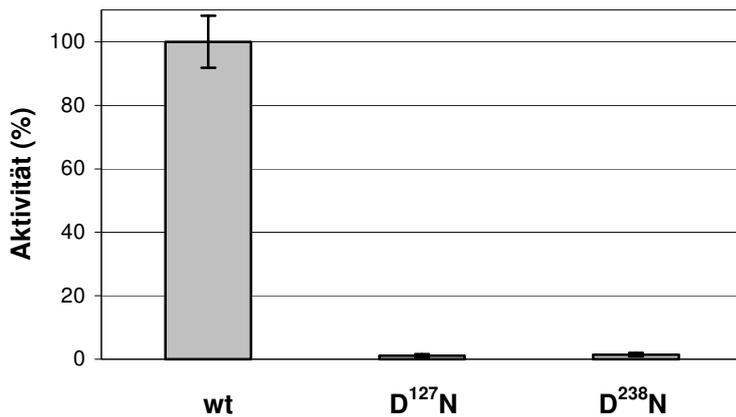


Abb. 34: Restaktivität der *PfAdoMet*-Synthetase-Mutanten D¹²⁷N und D²³⁸N im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Versuchen ± Standardabweichung.

3.8.2 Die Mutanten D²⁴N und D²⁷¹N

Die Aminosäurereste Asp²⁴ und Asp²⁷¹ wurden ebenfalls mutiert; auch hier handelte es sich um einen Austausch des Aspartats gegen Asparagin (D²⁴N/D²⁷¹N). Wie im Falle von D¹²⁷N und D²³⁸N verblieb - verglichen mit dem Wildtyp - nur eine geringe Restaktivität von 3,4% bei beiden Mutanten (Abb. 35).

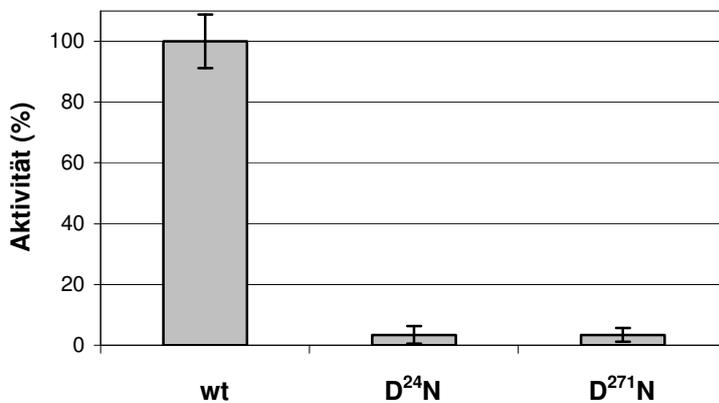


Abb. 35: Restaktivität der *PfAdoMet*-Synthetase-Mutanten D²⁴N und D²⁷¹N im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 7 Versuchen ± Standardabweichung.

3.8.3 Die Mutante E⁵⁰Q

Die AdoMet-Synthetase-Aktivität ist bei allen bisher untersuchten Organismen K⁺-abhängig. Der Aminosäurerest Glu⁵⁰, der bei anderen AdoMet-Synthetasen für die Bindung der K⁺-Ionen verantwortlich ist, wurde gegen einen Glutaminrest ausgetauscht. Die *PfAdoMet*-Synthetase-Mutante E⁵⁰Q wurde exprimiert und der

Standardaktivitätstest mit steigenden KCl-Konzentrationen durchgeführt. Die Mutante zeigte auch bei zehnfach erhöhtem KCl-Angebot nur eine Restaktivität von 1,4% (Abb. 36).

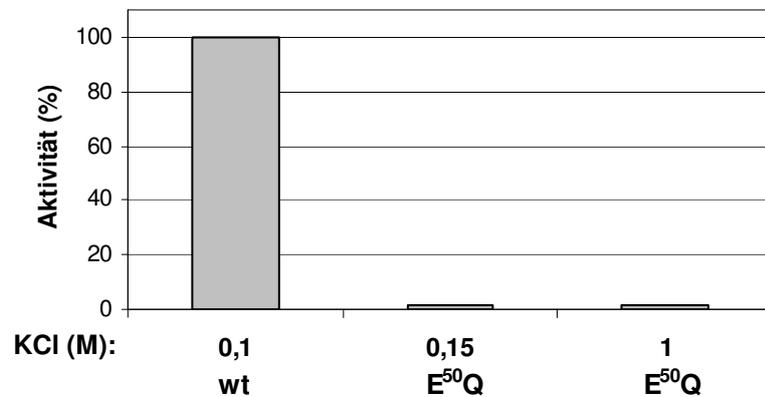
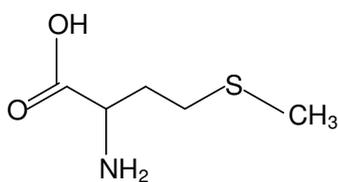


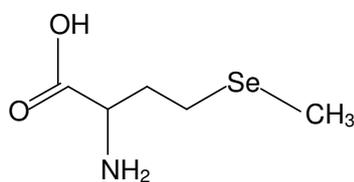
Abb. 36: Restaktivität der *PfAdoMet-Synthetase*-Mutante E⁵⁰Q im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen.

3.9 Effekt der *PfAdoMet-Synthetase*-Inhibitoren Selenomethionin und Cycloleucin auf *P. falciparum* in Kultur

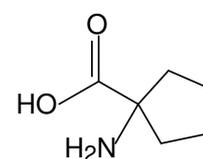
Wie bei den ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren wurde der Einfluss der AdoMet-Synthetase-Inhibitoren Selenomethionin und Cycloleucin auf das Wachstum von *P. falciparum* untersucht, indem die Parasiten in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors kultiviert wurden. Auch hier sind die Wachstumsraten von *P. falciparum* mittels des Einbaus von [³H]-Hypoxanthin untersucht und die IC₅₀-Werte ermittelt worden; diese betragen 65 µM für Selenomethionin und 7,5 mM für Cycloleucin. Abb. 37 zeigt die Strukturen des Methionins und dessen Analoga.



Methionin



Selenomethionin



Cycloleucin

Abb. 37: Strukturen des AdoMet-Synthetase-Substrats Methionin und der kompetitiven Inhibitoren Selenomethionin und Cycloleucin.

3.10 Polyaminmuster von *P. falciparum* in Kultur nach Behandlung mit Selenomethionin

Der AdoMet-Synthetase-Inhibitor Selenomethionin inhibiert die AdoMet-Synthetase kompetitiv. Ob dieser Inhibitor auch einen Einfluss auf die intrazellulären Polyaminkonzentrationen hat, wurde durch die Zugabe von 100 μM Selenomethionin und Inkubation für 24 bzw. 48 h untersucht. In beiden Fällen konnten keine bemerkenswerten Änderungen der Polyaminmengen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Tab. 7).

Behandlung (24 h)	Intrazelluläre Polyamine [nmol 10^{10} Zellen $^{-1}$]		
	Putrescin	Spermidin	Spermin
Kontrolle	196,3 \pm 150,7	516,8 \pm 244,7	44,1 \pm 25,4
100 μM Selenomethionin	258,4 \pm 184,1	419,0 \pm 64,2	57,1 \pm 22,0
Behandlung (48 h)			
Kontrolle	238,7 \pm 192,3	535,8 \pm 298,5	30,3 \pm 11,4
100 μM Selenomethionin	272,7 \pm 177,6	512,1 \pm 128,7	35,9 \pm 16,9

Tab. 7: Effekt des AdoMet-Synthetase-Inhibitors Selenomethionin auf die Polyaminmuster *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt \pm der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

3.11 Konzentrationen von AdoMet in *P. falciparum* in Kultur nach Behandlung mit Selenomethionin

Um einen eventuellen Einfluss des AdoMet-Synthetase-Inhibitors Selenomethionin auf die intrazellulären Konzentrationen von AdoMet nachweisen zu können, wurden den Plasmodienkulturen 50 μM bzw. 100 μM Selenomethionin zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation war die AdoMet-Konzentration in den mit 50 μM Selenomethionin behandelten Kulturen nahezu unverändert, während die Inkubation mit 100 μM Selenomethionin zu einer Abnahme der AdoMet-Menge auf etwa 50% führte (Tab. 8).

Behandlung (24 h)	Intrazelluläres AdoMet [nmol 10 ¹⁰ Zellen ⁻¹]
Kontrolle	38,4 ± 2,2
Selenomethionin 50 µM	34,2 ± 3,5
Selenomethionin 100 µM	21,3 ± 2,8

Tab. 8: Effekt des AdoMet-Synthetase-Inhibitors Selenomethionin auf die AdoMet-Konzentrationen *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt ± der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

3.12 Konzentrationen von AdoMet/MTA in *P. falciparum* in Kultur nach Behandlung mit CGP 40215A

Ob der AdoMetDC-Inhibitor CGP 40215A auch einen Einfluss auf die intrazellulären Konzentrationen von AdoMet und MTA hat, wurde durch die Zugabe von 5 µM bzw. 10 µM CGP 40215A und Inkubation für 24 h untersucht. Nach Behandlung mit 5 µM CGP 40215A war die AdoMet-Konzentration auf etwa ein Viertel der Kontrollwerte gesunken, während die Inkubation mit 10 µM CGP 40215A zu einer Abnahme der AdoMet-Menge auf weniger als 10% führte (Tab. 9). Die Konzentrationen von MTA nahmen auf ca. $\frac{2}{3}$ des Kontrollwertes ab.

Behandlung (24 h)	Intrazelluläres AdoMet/MTA [nmol 10 ¹⁰ Zellen ⁻¹]	
	AdoMet	MTA
Kontrolle	42,5 ± 7,9	10,0 ± 1,6
CGP 40215A 5 µM	10,1 ± 5,1	7,6 ± 2,9
CGP 40215A 10 µM	3,3 ± 1,5	6,8 ± 1,1

Tab. 9: Effekt des AdoMetDC-Inhibitors CGP 40215A auf die AdoMet- und MTA-Konzentrationen *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt ± der Standardabweichung.

4 DISKUSSION

4.1 AdoMet-Synthetase

AdoMet ist eine Schlüsselverbindung in Transmethylierungsreaktionen (Mato et al., 2002), ein Propylamingruppendonor im Metabolismus von Spermidin und Spermin (Tabor und Tabor, 1985) und ein Intermediat im *trans*-Sulfurierungspathway zu Cystein (Mato et al., 1990). Die AdoMet-Synthetase katalysiert die enzymatische Kondensation von ATP und Methionin in allen lebenden Organismen und liefert - neben Pyro- und Orthophosphat - AdoMet als Hauptsyntheseprodukt (Chiang und Cantoni, 1977; Kotb und Geller, 1993; Tabor und Tabor, 1984). Aufgrund ihrer wichtigen Eigenschaften in verschiedenen Stoffwechselprozessen wurden einige grundlegende biochemische und kinetische Charakteristika dieses Enzyms in *P. falciparum* sowie die inhibitorischen Effekte von Methioninanaloga auf das Enzym untersucht, um Anhaltspunkte für eine mögliche Eignung der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* als potentielles „drug target“ zu erlangen.

Nach Klonierung, Expression und Aufreinigung zeigte die rekombinante AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* eine molekulare Masse von 44 kDa. Dies stimmt mit einer vorhergehenden Beschreibung des plasmodialen Enzyms überein; Chiang et al. (1999) berichteten von einer molekularen Masse von 45 kDa. Das Enzym eluierte - analysiert mittels Gelfiltration - als Monomer. Für andere Organismen wurden sowohl Homodimere wie z.B. bei Leishmanien (Reguera et al., 2002; Pérez-Pertejo et al. 2003) oder bei *Methanococcus jannaschii* (Lu und Markham, 2002) als auch Homotetramere wie in *E. coli* (Markham et al., 1980) beschrieben. Die native molekulare Masse variiert zwischen den einzelnen Organismen, die Untereinheiten besitzen jedoch überwiegend die gleiche Größe und liegen sowohl bei Protozoen wie *L. infantum* und *L. donovani* (Reguera et al., 2002; Pérez-Pertejo et al., 2003) oder *Amoeba proteus* (Jeon und Jeon, 2003) als auch bei Bakterien und Pflanzen von wenigen Ausnahmen abgesehen mit molekularen Massen zwischen 42 und 46 kDa (Markham et al., 1984; Lee et al., 1997; Schröder et al., 1997; Ahn und Henney, 1997; Slapeta et al., 2003) im gleichen Bereich wie das plasmodiale Enzym.

Im Gegensatz zu Protozoen und Bakterien sind im Gewebe von Säugetieren drei unterschiedliche Formen der AdoMet-Synthetase identifiziert worden; sie werden als

AdoMet-Synthetase I, II und III bezeichnet (Hoffman und Kunz, 1977; Liao et al., 1977; Okada et al., 1979; Liao et al., 1979; Okada et al., 1981; Sullivan und Hoffman, 1983) und besitzen unterschiedliche biochemische Eigenschaften (Okada et al., 1981; Suma et al., 1986; Mitsui et al., 1988). Die AdoMet-Synthetase II wird überwiegend in nichtheptischem Gewebe und in der fetalen Leber als Heterotetramer exprimiert (Kotb und Geller, 1993; Mitsui et al., 1988; Halim et al., 1999; LeGros et al., 2000). In der adulten Leber kommt die AdoMet-Synthetase als Tetramer (I) und als Dimer (III) vor. Der Grund für das Vorhandensein zweier Isoformen ist bisher noch nicht geklärt (Corrales et al., 2002).

Trotz der verschiedenen Formen der AdoMet-Synthetase zeigt sich auch bei dem Enzym der Säugetiere, dass die Untereinheiten bezüglich ihrer molekularen Masse zwischen 38 kDa und 48 kDa liegen (Chiang und Cantoni, 1977; Oden und Clarke, 1983; Sullivan und Hoffmann, 1983; Kotb und Kredich, 1985; Mitsui et al. 1988). Diese Daten wurden auch für die AdoMet-Synthetase der humanen Leber beschrieben: die molekulare Masse der Untereinheiten beträgt 44 kDa (Alvarez et al., 1993) und das humane Enzym gleicht mit seinen zwei oligomeren Formen dem Muster anderer Säugerenzyme wie z. B. dem der Rattenleber (Alvarez et al., 1993).

4.2 Analyse der biochemischen Eigenschaften der AdoMet-Synthetase

Das pH-Optimum der rekombinanten AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* liegt bei 8,0. Unter identischen pH-Bedingungen wurde die AdoMet-Synthetase-Aktivität für die Enzyme von *E. coli* (Taylor et al., 2002), *L. infantum* (Reguera et al., 2002), *L. donovani* (Pérez-Pertejo et al., 2003) und *M. jannaschii* (Lu und Markham, 2002) bestimmt. Für das Enzym von *Cryptosporidium parvum* liegt das pH-Optimum bei 8,2 (Slapeta et al., 2003). Niedrigere pH-Optima wurden mit 7,4 für rekombinantes humanes MAT II-Enzym (Halim et al., 1999) und mit 6,2-6,4 für das Enzym der humanen Lunge festgelegt (Sternowsky et al., 1976). Die AdoMet-Synthetase von *T. b. brucei* ist über ein breiteres pH-Spektrum zwischen pH 7,5 und pH 10,0 hinweg aktiv und zeigt zwischen pH 8,0 und 10,0 kaum Änderungen in der Aktivität (Yarlett et al., 1993).

Um einen optimalen Substratumsatz zu gewährleisten, benötigt die AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* neben dem passenden pH-Wert eine KCl-Konzentration von 50 mM; bei einer KCl-Konzentration von 10 mM wies das Enzym nur eine Aktivität von etwa 50% auf, ohne KCl war keine Enzymaktivität festzustellen. Diese Daten stehen in Einklang mit den AdoMet-Synthetasen von *E. coli* (McQueney und Markham, 1995) und *T. brucei* (Yarlett et al., 1993), für die ebenfalls eine Mindestkonzentration an KCl für eine optimale Katalyseaktivität beschrieben wurde. Generell ist die AdoMet-Synthetase eines von vielen Enzymen, die durch monovalente Metall-Kationen aktiviert werden (Suelter, 1970). Für die katalytischen Reaktionen, Bildung von AdoMet und Hydrolyse von Tripolyphosphat (PPP_i), werden darüber hinaus divalente Metallionen wie Mg²⁺ benötigt (McQueney und Markham, 1995).

Bei *E. coli* bindet neben diesen zwei divalenten Ionen ein monovalentes Kation an das aktive Zentrum (Abb. 38) und stimuliert den Schritt der AdoMet-Bildung um das bis zu 100-fache. Gleichzeitig verringert dies den K_m-Wert von ATP um das 4-fache und den des Methionins um das 12-fache, hat aber einen relativ geringen Effekt auf die Rate der PPP_i-Hydrolyse-Reaktion (McQueney und Markham, 1995). Obwohl bisher weder der Mechanismus noch die strukturellen Details für diese monovalente Aktivierung durch Kationen bekannt sind, wird vorgeschlagen, dass sie ein Resultat geringfügiger Änderungen der Proteinkonformation ist (Markham, 1986). Die Kristallstruktur der AdoMet-Synthetase von *E. coli* zeigte, dass keine direkte Interaktion zwischen K⁺-Ion und ADP oder P_i zu erkennen ist; somit könnte die Rolle des K⁺-Ions eher in der Organisation der Struktur des aktiven Zentrums liegen (Takusagawa et al., 1996), analog der Rolle des K⁺-Ions in der Pyruvatkinase (Larsen et al., 1994) oder der Dialkylglycin-Decarboxylase (Toney et al., 1993). Ein weiteres monovalentes Ion, wahrscheinlich ebenfalls ein K⁺-Ion, ist im Zentrum des Dimers lokalisiert und könnte für die Ausbildung und die feste Bindung der dimeren Struktur wichtig sein (Takusagawa et al., 1996).

Aufgrund der hohen Homologien der *P. falciparum*-Sequenz zu der von *E. coli* und dem Vorhandensein der K⁺-Bindungsstelle am Glu⁵⁰ (Glu⁴² bei *E. coli*) sowie der Notwendigkeit einer Mindestkonzentration an KCl für eine optimale Katalyseaktivität lässt sich für *P. falciparum* eine vergleichbare Rolle der K⁺-Ionen bei der Aktivierung der AdoMet-Synthese vermuten.

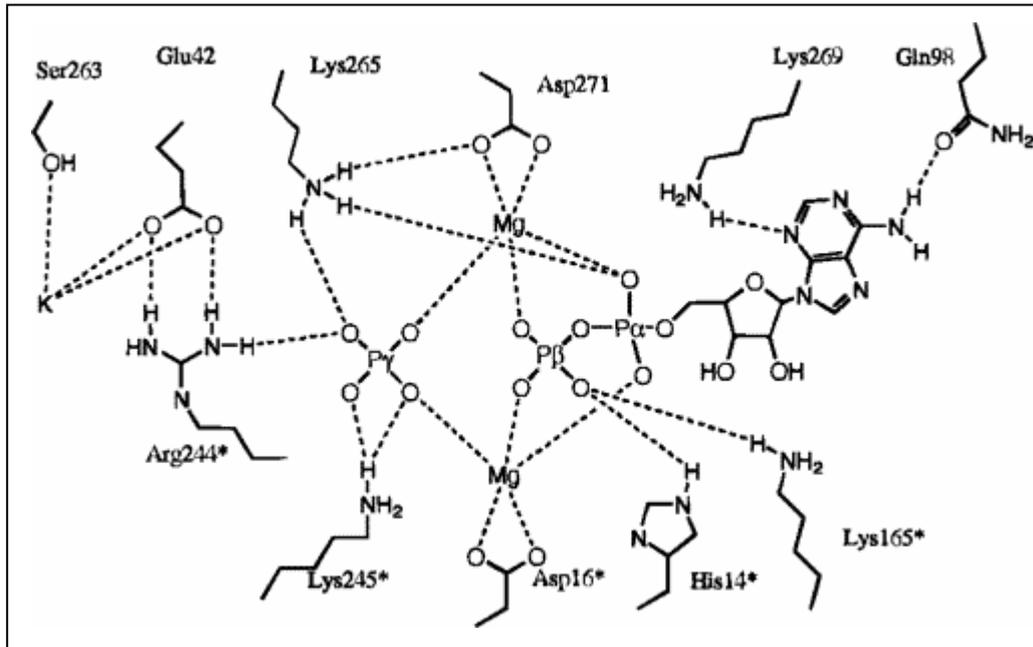


Abb. 38: Aktives Zentrum der AdoMet-Synthetase von *E. coli*. Je ein Mg²⁺-Ion bindet an Asp¹⁶ bzw. Asp²⁷¹. Ein K⁺-Ion bindet an das Glu⁴² (aus: Takusagawa et al., 1995).

Der K_m -Wert der AdoMet-Synthetase für Methionin wurde mit 86 μM bestimmt und liegt damit im Bereich der K_m -Werte von 80 μM für *E. coli* (Taylor und Markham, 1999) und 96 μM für *C. parvum* (Slapeta et al., 2003). Auch die K_m -Werte für die drei Isoenzyme I, II und III der AdoMet-Synthetase aus *Catharanthus roseus* befinden sich zwischen 102 μM und 109 μM und damit in diesem Bereich (Schröder et al., 1997). Höhere K_m -Werte lassen sich bei den bakteriellen Organismen *M. jannaschii* mit 240 μM (Lu und Markham, 2002) und *Mycobacterium smegmatis* mit 288 μM (Berger und Knodel, 2003) finden. Der K_m -Wert für *L. infantum*-Promastigoten ist mit 35 μM (Reguera et al., 1999) hingegen etwas niedriger als der von *P. falciparum*. Interessanterweise beschrieben Pérez-Pertejo et al. (2004) bei *L. donovani* einen $S_{0,5}$ -Wert (Liganden-Konzentration, die für die halbmaximale Geschwindigkeit benötigt wird) für Methionin von 250 μM , im Vergleich zum K_m -Wert von *L. infantum* einen um das siebenfache höheren Wert.

Für *T. brucei* konnte festgestellt werden, dass die K_m -Werte in Abhängigkeit von der Substratkonzentration variieren; Yarlett et al. (1993) zeigten, dass bei Methioninkonzentrationen zwischen 0,01-0,25 mM der K_m -Wert bei 20 μM , zwischen 0,5-5,0 bei 150 μM liegt. Ein solcher biphasischer oder sigmoidaler Kurvenverlauf mit

vergleichbaren K_m -Werten ist auch für die Enzyme einiger anderer pro- und eukaryotischer Organismen beschrieben worden (Chiang und Cantoni, 1977; Xue et al., 1989; Pajares et al., 1992; Mato et al., 2002; Wang et al., 2003), war im Falle der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* bei eingesetzten Methioninkonzentrationen im Bereich von 0,025-1,0 mM jedoch nicht festzustellen.

Auf die AdoMet-Synthetase der Schafsleber wirkt AdoMet in hohen Konzentrationen inhibierend. Auch für *T. brucei* beschrieben Yarlett et al. (1993) einen inhibitorischen Effekt des Substrats in hohen Konzentrationen mit einem K_i -Wert von 0,24 mM. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die AdoMet-Synthetase regulatorische Eigenschaften besitzt und die Reaktionsrate in vivo direkt durch die Substrat- und Produktkonzentrationen beeinflusst werden kann (Xue et al., 1989).

Über den Grund für die Anwesenheit zweier unterschiedlicher AdoMet-Synthetase-Isoformen in der Leber ist lange spekuliert worden. Da jedoch der Großteil des Methionins in diesem Organ metabolisiert wird, könnte die Existenz zweier verschiedener AdoMet-Synthetase-Isoformen eine Adaption an die speziellen metabolischen Anforderungen der Leber darstellen. Sowohl in vitro als auch in vivo in Ratten-Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass das Substrat Methionin die AdoMet-Synthetase III in eine Konformation mit einer höheren spezifischen Aktivität umwandeln kann, ein Phänomen, das als "hysteretic behavior" bezeichnet wurde (del Pino et al., 2000).

In diesem Zusammenhang wird postuliert, dass die Verfügbarkeit von Methionin die Aktivität der AdoMet-Synthetase III reguliert (Mato et al., 2002). In Rattenhepatozyten liegt die Methioninkonzentration zwischen 50 und 80 μ M (Finkelstein, 1990); unter diesen Bedingungen würde die AdoMet-Synthetase III dann überwiegend in der sogenannten „low specific activity“-Konformation vorliegen und die AdoMet-Synthetase I wäre das für die AdoMet-Synthese verantwortliche Enzym. Nach einem Anstieg der Methioninkonzentration würde eine Konversion in die „high activity“-Form der AdoMet-Synthetase III stattfinden und der Methionin-Überschuß schnell eliminiert bzw. abgebaut werden. Solch ein Mechanismus wäre sehr sensitiv gegenüber Änderungen der Methioninkonzentration (Mato et al., 2002).

Der K_m -Wert für das zweite Substrat ATP liegt bei *P. falciparum* bei 446 μ M und ist damit weitaus höher als die für andere Organismen ermittelten K_m -Werte. Pèrez-Pertejo (2003) ermittelten für *L. donovani* einen K_m -Wert von 27 μ M, während Yarlett

et al. (1992) für *T. brucei* bei Substratkonzentrationen zwischen 0,01 mM und 0,25 mM ATP einen K_m -Wert von 53 μ M beschrieben, bei ATP-Konzentrationen zwischen 0,5 mM und 5,0 mM jedoch einen K_m -Wert bei 1,35 mM. Aufgrund des - wie im Falle für das Substrat Methionin - daraus resultierenden biphasischen Kurvenverlaufs zeigt sich bei höheren Substratkonzentrationen eine positive Kooperativität, während bei niedrigen ATP-Konzentrationen ein eher lineares Verhältnis vorliegt. Ein Hill-Koeffizient von $n_H = 1,0$ (keine Kooperativität, hyperbolischer Kurvenverlauf) wurde sowohl für Methionin als auch für ATP ermittelt. Bei höheren ATP-Konzentrationen ist bei *T. brucei* $n_H = 2,0$, was eine positive Kooperativität des Enzyms bei höheren Substratkonzentrationen anzeigt. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Pérez-Pertejo (2003) für die AdoMet-Synthetase von *L. donovani*. Der K_m -Wert für ATP bei *L. infantum* lag - analog zu dem für Methionin - auch hier um ein vielfaches höher (Reguera et al., 1999). Für die AdoMet-Synthetasen von Säugetieren wurde eine solche positive Kooperativität bei höheren ATP-Konzentrationen ebenfalls beschrieben (Okada, 1981; Xue et al., 1989; Pajares et al., 1992).

Generell liegen die K_m -Werte bei den meisten bisher untersuchten Organismen zwischen 50 μ M und 1 mM (Chiang und Cantoni, 1977; Okada, 1981; Pajares et al., 1992; Schröder et al., 1997; Taylor und Markham, 1999; Lu und Markham, 2002; Berger und Knodel, 2003). Auch für die AdoMet-Synthetase-Isoformen der humanen Leber beschrieben Mato et al. (2002) K_m -Werte für ATP zwischen 30 μ M und 1 mM. Der hohe K_m -Wert des plasmodialen Enzyms gibt Anlass zu der Vermutung, dass auch bei *P. falciparum* eine Kooperativität hinsichtlich des ATP vorliegen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich ein solches Phänomen jedoch nicht feststellen; bei den eingesetzten ATP-Konzentrationen von 0,2-2,5 mM ergab sich stets ein hyperbolischer Kurvenverlauf.

4.3 Effekt der AdoMet-Synthetase-Inhibitoren Selenomethionin und Cycloleucin

Das Substratanalogon Seleno-L-Methionin inhibiert die Wachstumsrate von *P. falciparum* in Kultur mit einem IC_{50} -Wert von 132 μ M. Den gleichen IC_{50} -Wert (130 μ M) beschrieben Porter et al. (1984) für L1210-Zellen. Kajander et al. (1990) testeten verschiedene Zelllinien auf die Wachstumsinhibierung durch Selenomethionin und

stellten fest, dass alle ermittelten IC_{50} -Werte zwischen 45 und 160 μM und somit in einem ähnlichen Bereich wie bei *P. falciparum* liegen.

Der K_i -Wert für Selenomethionin bezüglich der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* betrug 89 μM . Yarlett et al. (1993) bestimmten für das Enzym von *T. brucei* einen weitaus höheren K_i -Wert von 510 μM , konnten jedoch feststellen, dass Selenomethionin in Abwesenheit des eigentlichen Substrats Methionin als Substrat dient; bei geringeren Selenomethionin-Konzentrationen von 0,01-0,1 mM synthetisiert das Enzym zunehmende Konzentrationen des Produktanalogons mit einem K_m -Wert von 100 μM .

Die Cytotoxizität von Selenomethionin ist darüber hinaus auch in Kulturen humaner und muriner Lymphoid-Zellen analysiert worden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Selenomethionin zu dem entsprechenden AdoMet-Analogon umgewandelt und in Transmethylierungsreaktionen sowie in der Polyaminbiosynthese weiter metabolisiert wird, gleich den korrespondierenden schwefelhaltigen Metaboliten des Methionins. In Konzentrationen unter 40 μM in dem Kulturmedium konnte keine Inhibition des Zellwachstums festgestellt werden. Erst bei Konzentrationen über 40 μM zeigte Selenomethionin Cytotoxizität. Bei cytotoxischen Selenomethioninkonzentrationen wurde der inhibitorische Effekt von Änderungen der AdoMet-Konzentrationen begleitet: Selenomethionin-Konzentrationen zwischen 30 und 160 μM bedingten einen cytotoxischen Effekt mit einer 50%igen Wachstumsinhibition, gleichzeitig nahmen die intrazellulären AdoMet-Mengen ab (Kajander et al., 1990, 1991).

Hinsichtlich eines möglichen Einflusses des Selenomethionins auf die intrazellulären Polyaminkonzentrationen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Zugabe von 100 μM Selenomethionin zu *P. falciparum* in Kultur und die Inkubation für 24 bzw. 48 h keine signifikanten Änderungen der Polyaminmengen im Vergleich zur Kontrolle eintraten. Somit scheint der inhibitorische Effekt ausschließlich durch die Interaktion mit der AdoMet-Biosynthese stattzufinden. Um dies genauer zu analysieren, wurde auch der Einfluss von Selenomethionin auf die intrazellulären Mengen an AdoMet untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass die Behandlung der infizierten Erythrozyten mit 100 μM Selenomethionin zu einer Abnahme der AdoMet-Konzentration auf etwa 50% der Kontrollwerte führte. Da davon ausgegangen werden kann, dass ein Umsatz des Substratanalogons

Selenomethionin zu *S*-Adenosylselenomethionin bei der quantitativen HPLC-Analyse keinen Unterschied in der detektierbaren Menge des Reaktionsprodukts ausmachen würde, kann davon ausgegangen werden, dass der antiproliferative Effekt aufgrund der Störung der Transmethylierungsreaktionen vermittelt wird, was die fehlende Beeinflussung der Polyaminbiosynthese erklären würde.

Der IC₅₀-Wert des zweiten untersuchten AdoMet-Synthetase-Inhibitors Cycloleucin für *P. falciparum* lag bei 7,5 mM. Damit befindet sich der IC₅₀-Wert im gleichen Bereich wie der für L1210-Zellen ermittelte IC₅₀-Wert von 5 mM (Porter et al., 1984). Bereits zuvor wurde hinsichtlich des Einflusses von Cycloleucin auf die AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* ein K_i-Wert von 10 mM beschrieben; auch dieser K_i-Wert gleicht jenem für humane Leberzellen, der bei 10 mM liegt (Chiang et al., 1999). Bei der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y resultierte die Zugabe von 4 mM Cycloleucin in einer signifikanten 50%igen Inhibierung der katalytischen Aktivität der AdoMet-Synthetase (Gomes Trolin et al., 1998); auch nach Inkubation humaner Erythrozyten mit Cycloleucin waren die Transmethylierungsreaktionen zu 70% inhibiert (Kim et al., 1980). Im Falle somatischer Säugetierzellen wurden die Methylierungsreaktionen durch Cycloleucin ebenfalls erheblich gestört (Caboche und Mulsant, 1978). Neben dem Effekt dieses Inhibitors auf die Katalyseaktivität wurde auch ein Einfluss auf die AdoMet- und die Methioninkonzentrationen beschrieben; die Behandlung von Mäusen mit Cycloleucin (2 mg/g Körpergewicht) resultierte in reduzierten AdoMet- und stark erhöhten Methioninkonzentrationen. Auch in diesem Fall wurden die Effekte des Cycloleucins als Ergebnis der durch den AdoMet-Mangel beeinträchtigten Transmethylierungsprozesse interpretiert (Lee et al., 1992).

Die AdoMet-Synthetase von *C. parvum* wird ebenfalls durch Cycloleucin inhibiert (Slapeta et al., 2003); des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die inhibitorischen Eigenschaften des Cycloleucins auch in Viren die AdoMet-Mengen beeinflussen. In Hühnerembryozellen, die mit dem B77 Avian Sarcoma Virus infiziert sind, konnten mit Cycloleucin die intrazellulären Konzentrationen von AdoMet reduziert und auf diese Weise die Methylierung viraler RNA inhibiert werden (Dimock und Stolfus, 1978). In mit dem SV40-Virus infizierten BSC-1-Zellen bedingte die Behandlung mit 2 und 5 mg/ml Cycloleucin eine 10- und 100-fache Reduktion der methylierten SV40-mRNA (Finkel und Groner, 1983).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass Cycloleucin nur in verhältnismäßig hohen

Dosierungen eine inhibitorische Wirkung zeigt, unabhängig davon, welche Art von Organismus behandelt wird. Die Ergebnisse für die plasmodiale AdoMet-Synthetase bilden hier keine Ausnahme. Wie im Falle von Selenomethionin scheint der inhibitorische Effekt durch eine Beeinflussung der AdoMet-Biosynthese stattzufinden; da die Polyaminbiosynthese nicht beeinträchtigt wird, kann davon ausgegangen werden, dass der antiproliferative Effekt ausschließlich aufgrund der Störung der Transmethylierungsreaktionen oder anderer Ziele vermittelt wird.

4.4 Mutation konservierter Aminosäurereste der AdoMet-Synthetase in *P. falciparum*

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von pro- und eukaryotischen AdoMet-Synthetasen macht deutlich, dass ein hoher Grad an Homologie zwischen der *P. falciparum*-Sequenz und den Sequenzen anderen Organismen festzustellen ist, der zwischen 66% und 75% liegt. Die Motive, die in anderen Organismen als notwendig für die katalytische Aktivität der AdoMet-Synthetase beschrieben wurden, sind in *P. falciparum* ebenfalls hochkonserviert. Das Nonapeptid GGGAFSGKD an Position 258-266 korrespondiert mit einem P-Loop, der einen Teil der ATP-Bindungsstelle bildet (Deigner et al., 1995). Die Hydrolyse des Triphosphats geschieht an dem Arg²⁴⁴-Rest. Die Asp²⁴- und Asp²⁷¹-Reste werden als essentiell für die Bindung der Mg²⁺-Ionen beschrieben (Taylor und Markham, 1999), während das Glu⁵⁰ an der Bindung des K⁺-Ions beteiligt ist (McQueney und Markham, 1995). In der Aminosäuresequenz von *P. falciparum* ist des Weiteren das Hexapeptid GAGDQG an Position 115-120 konserviert, das in *L. donovani* Teil des aktiven Zentrums ist (Pérez-Pertejo et al., 2003). Die mit Asp¹²⁷ und Asp²³⁸ korrespondierenden Reste spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung des Methionins (Taylor und Markham, 1999).

Um festzustellen, ob diese Aminosäurereste auch bei der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* essentiell für die Katalyseaktivität sind, wurden die potentiell für die Substratbindung erforderlichen Aminosäurereste ausgetauscht, die Mutanten D²⁴N, D¹²⁷N, D²³⁸N, D²⁷¹N und E⁵⁰Q hergestellt und auf ihre Aktivität untersucht.

Erwartungsgemäß wiesen die Mutanten D¹²⁷N und D²³⁸N nur noch eine äußerst geringe Restaktivität von etwa 1% auf. In der AdoMet-Synthetase von *E. coli* wurden ebenfalls vergleichbare Mutationen charakterisiert (Taylor und Markham, 1999). Bei den Mutanten D¹¹⁸N und D²³⁸N, die mit den bei *P. falciparum* durchgeführten Mutationen D¹²⁷N und D²³⁸N korrespondieren, nahm die enzymatische Aktivität in vergleichbarem Maße wie bei dem plasmodialen Enzym ab.

Bei den Mutationen D²⁴N und D²⁷¹N verblieb bei *P. falciparum* ebenfalls nur eine geringe Restaktivität von ca. 3%. Die entsprechenden Werte für die korrespondierenden Mutationen bei der AdoMet-Synthetase von *E. coli* lagen bei 0,05% Restaktivität für D¹⁶N und bei 0,3% für D²⁷¹N (Taylor und Markham, 1999). Somit konnte mittels dieser Mutanten in *P. falciparum* nachgewiesen werden, dass die Aminosäurereste D¹²⁷, D²³⁸, D²⁴ und D²⁷¹ essentiell für die katalytische Aktivität der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* sind.

Taylor und Markham (1999) stellen fest, dass hinsichtlich der Teilreaktion der PPP_i-Hydrolyse die Mutanten der Mg²⁺-bindenden Reste, D¹⁶N und D²⁷¹N, eine um das mehr als 700-fache reduzierte katalytische Effizienz besaßen. Zwar war diese Abnahme im Falle des plasmodialen Enzym weniger stark, aber dennoch machen diese Daten deutlich, dass die divalenten Kationen im Rahmen der Gesamtreaktion eine besondere Rolle in der Hydrolyseaktivität des Enzyms besitzen. Hinsichtlich der Rolle der Mg²⁺-Ionen wurde postuliert, dass sie eine pyramidenartige Brücke zwischen beiden Enden der Triphosphatkette bilden; jedes Mg²⁺-Ion ist dabei durch zwei Sauerstoffatome des PP_i-Ions und durch ein Sauerstoffatom des P_i-Ions koordiniert, wird darüber hinaus von den Aminosäureresten Asp²⁷¹ und Asp¹⁶ der AdoMet-Synthetase gebunden und positioniert (Takusagawa et al., 1996) und ist so maßgeblich an einer maximalen Hydrolyserate des Triphosphats zu PP_i und P_i beteiligt (Markham et al., 1980).

Die Seitenketten Asp¹¹⁸ und Asp²³⁸ gelten als essentiell für die Bindung des Methionins; das Asp¹¹⁸ interagiert dabei mit dem Schwefelatom, das Asp²³⁸ mit der α-Aminogruppe des Methionins (Schalk-Hihi und Markham, 1999). Die Abnahme der Aktivität der plasmodialen D¹¹⁸N-Mutante hängt infolgedessen damit zusammen, dass durch den Aminosäureaustausch eine Carboxygruppe gegen eine Ketogruppe ausgetauscht wird; dies würde mit einem Verlust einer energetisch günstigen elektrostatischen Interaktion zwischen Schwefelatom und Carboxylat einhergehen und den fast vollständigen Rückgang der katalytischen Aktivität erklären. Im Falle

des Asp²³⁸ liegt die Wahrscheinlichkeit nahe, dass durch den Aminosäureaustausch ebenfalls die Bindungsmöglichkeit an die α -Aminogruppe des Methionins herabgesetzt wird und die gravierende Abnahme der Katalyseaktivität bei der D²³⁸N-Mutante sowohl im Falle von *E. coli* als auch von *P. falciparum* bedingt.

Mg²⁺ wirkt als Aktivator der AdoMet-Synthetase-Reaktion (Taylor und Markham, 1999). Trotz der Tatsache, dass für die Mutanten der Mg²⁺-Bindungsstellen des Enzyms von *E. coli* eine etwa um das 10- bis 15-fache erhöhte Aktivatorkonstante (Mg²⁺-Konzentration für $\frac{1}{2} V_{\max}$) im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden konnte, ließ sich für die plasmodiale AdoMet-Synthetase keine Aktivität bei steigenden Mg²⁺-Konzentrationen feststellen. Diese Unterschiede hinsichtlich der Aktivierungskapazität durch Mg²⁺ bei den Asp¹⁶- und Asp²⁷¹-Mutanten finden sich auch bei anderen Enzymen. Untersuchungen über die anorganische Pyrophosphatase, die alkalische Phosphatase und die T7 RNA-Phosphatase, die alle Phosphorylgruppen übertragen und verschiedene Metallionen im aktiven Zentrum enthalten, zeigten ähnliche Abweichungen (Bishop et al., 1980; Avaeva et al., 1996a; Avaeva et al., 1996b; Moon-Woody et al., 1996; Tibbits et al., 1996). Im Falle der Pyrophosphatase, die der PPP_i-ase-Aktivität der AdoMet-Synthetase funktionell relativ nahe ist, bedingt ein Asp→Asn-Austausch keine Änderung in der Konzentrationsabhängigkeit der Mg²⁺-Aktivierung (Avaeva et al., 1996a; Avaeva et al., 1996b). Bei der T7 RNA-Polymerase setzte eine Asp-Asn-Mutation die Affinität des Mg²⁺ nur um das 2- bis 5-fache herab, inaktivierte aber das Enzym (Moon-Woody et al., 1996). Im Gegensatz dazu führte eine Asp-Asn-Mutation in der alkalischen Phosphatase zu einer gravierenden Abnahme der Affinität für Mg²⁺ und resultierte darin, dass das Mg²⁺ nicht mehr an das aktive Zentrum binden konnte (Tibbits et al., 1996).

Höhere Konzentrationen an Mg²⁺ führten bei der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* zu keiner Steigerung der katalytischen Aktivität; der Austausch der putativen Mg²⁺-Bindungsstellen resultierte in einer nicht zu umgehenden Inaktivierung des Enzyms. Die Koordinationsgeometrie von jedem Metallion scheint genau darauf abgestimmt zu sein, sowohl die AdoMet-Bildung als auch die PPP_i-Hydrolyse-Reaktion zu erleichtern, was die entscheidende Rolle der Aspartatreste Asp¹⁶ und Asp²⁷¹ bei der Gesamtreaktion der plasmodialen AdoMet-Synthetase unterstreicht.

Für die maximale Katalyseaktivität der AdoMet-Synthetase ist - wie bereits beschrieben - neben zwei divalenten auch ein monovalentes Kation erforderlich (Markham et al., 1980; Markham, 1981; Markham, 1984; Zhang et al., 1993; McQueney und Markham, 1995). Von dem Aminosäurerest Glu⁵⁰ wird angenommen, dass hier die Bindung der K⁺-Ionen stattfindet. Die Bindung des K⁺-Ions führt bei *E. coli* zu einer bis zu 100-fachen Stimulation des Schrittes der AdoMet-Bildung, setzt die K_m-Werte sowohl von ATP als auch von Methionin herab, hat jedoch relativ geringe stimulierende Effekte auf die Hydrolyserate von PPP_i (McQueney und Markham, 1995). Im Falle der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* resultierte der Austausch des Glutamates Glu⁵⁰ gegen Glutamin in einem fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität; die Mutante zeigte auch bei zehnfach erhöhtem KCl-Angebot nur eine Restaktivität von etwa 1%. Eine Stimulation der Enzymaktivität war hier nicht mehr möglich. Vergleichbare Untersuchungen bei dem Enzym von *E. coli* zeigten ebenfalls eine Abnahme der spezifischen Aktivität auf 1%. Diese Mutante wies kinetische Eigenschaften auf, die denen des Wildtyp-Enzyms in Abwesenheit von K⁺-Ionen glichen (McQueney und Markham, 1995). Da das Glutamat der einzige geladene Ligand in der näheren Umgebung der K⁺-Bindungstasche ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Austausch dieses Glutamats gegen Glutamin die Bindung des monovalenten Kations und die Aktivierung der Katalyse durch das Entfernen der negativen Ladung unterbindet.

Sowohl in der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* und der von *E. coli* als auch bei zwei anderen K⁺-aktivierten Enzymen, nämlich der Pyruvat-Kinase (Toney et al., 1993) und der Dialkylglycin-Decarboxylase (Larson et al., 1994), enthält die K⁺-Bindungsstelle einen Carboxylatrest, der als Carboxylat-Ligand für das K⁺ über eine Wasserstoffbrückenbindung an einen Arginin-Rest gebunden sein könnte, der - zumindest in der Pyruvat-Kinase - wiederum eine H-Bindung an das γ -Phosphat des ATP ausbildet. Somit könnte sowohl in der Pyruvat-Kinase als auch in der AdoMet-Synthetase das K⁺ über eine Carboxylat-Arginin-Aminosäurebrücke an das ATP-Substrat gebunden sein (McQueney und Markham, 1995). Der vollständige Verlust der katalytischen Aktivität bei der Mutante E⁵⁰Q im plasmodialen Enzym deutet darauf hin, dass der Mechanismus der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* hinsichtlich der Bindung von K⁺ in vergleichbarer Weise funktioniert und das Glu⁵⁰ im plasmodialen Enzym die einzige Bindungsstelle für die K⁺-Ionen darstellt. Durch den Austausch des Glutamats gegen Glutamin und den damit verbundenen Austausch

der Carboxylgruppe gegen eine Ketogruppe ist davon auszugehen, dass die Bindungskapazität für K^+ -Ionen nahezu vollständig verloren geht, was den Verlust der katalytischen Aktivität der AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* erklären würde. Die hier durchgeführten Mutationen zeigen, dass die bei AdoMet-Synthetasen anderer Organismen für die Bindung von Methionin und Mg^{2+} essentiellen Aminosäurereste auch bei *P. falciparum* eine wesentliche Rolle spielen; ihr Austausch gegen andere Aminosäurereste führt zu einer Inaktivierung des Enzyms. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Substratbindung und die Bindung der benötigten Ionen in ähnlicher Weise stattfinden könnten wie im Falle der AdoMet-Synthetasen anderer Organismen. Inhibitoren, die als Substrat- oder Produktanaloga der Phosphatgruppe oder des K^+ -Ions wirken, sind in *E. coli* schon erfolgreich getestet worden und zeigten z. T. bessere Effekte als die hier getesteten Methioninanaloga Selenomethionin und Cycloleucin. So untersuchten Reczkowski und Markham (1999) die inhibitorischen Eigenschaften von Imidophosphatanaloga und zeigten, dass Diimidotriphosphat und Imidodiphosphat als potente Inhibitoren mit K_i -Werten von 2 nM bzw. 0,8 μM wirken. Auch das Uranyl-Ion UO_2^{2+} wirkt mit einem K_i -Wert von 350 nM als kompetitiver Inhibitor an der K^+ -Bindungsstelle (McQueney und Markham, 1995). Aufgrund der Parallelen, die zwischen dem katalytischen Prozess anderer Organismen und dem von *P. falciparum* vorzuliegen scheinen, könnte versucht werden, diese auch im Falle von *P. falciparum* als potentiell Target für den Einsatz solcher Verbindungen zu nutzen.

4.5 Bestimmung der Polyaminkonzentrationen während des erythrozytären Zyklus von *P. falciparum*

Die Untersuchung der Polyaminkonzentrationen in asexuellen erythrozytären Stadien von *P. falciparum* zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Entwicklungsstadium der Parasiten und den intrazellulären Konzentrationen an Putrescin, Spermidin und Spermin. Die Mengen aller drei Polyamine steigen während der Entwicklung vom Ring- zum Schizontenstadium stark an, wobei Spermidin - unabhängig vom Entwicklungsstadium - stets das Polyamin mit der höchsten Konzentration darstellt, gefolgt von Putrescin und geringen Mengen an Spermin. Die Polyaminkonzentrationen in nichtinfizierten Erythrozyten sind im

Vergleich zu den infizierten Erythrozyten sehr niedrig. Ein solches Ansteigen der Polyaminmengen im Laufe der parasitären Entwicklung ist erwartungsgemäß, da das Wachstum und die Proliferationsprozesse des Parasiten von einem steigenden Polyaminbedarf begleitet sein sollten. Dieses Ergebnis korreliert zum einen mit den stadienspezifischen Expressionsmustern der bifunktionalen AdoMetDC/ODC (Müller et al., 2000) und der SpdSyn (Haider et al., 2005) und bestätigt zum anderen die Ergebnisse vorhergehender Untersuchungen, in denen die Entwicklung von *P. falciparum* mit Änderungen der Polyaminmuster und Änderungen der ODC- und AdoMetDC-Aktivitäten in *P. falciparum*-Kulturen assoziiert waren (Assaraf et al., 1984; Whaun et al., 1985; Wright et al., 1991).

Hinsichtlich der Verteilung der Polyamine in der Wirtszellen-Parasiten-Einheit ist der Großteil von Putrescin, Spermidin und Spermin mit dem Parasiten assoziiert; nur ein kleiner Teil der Polyamine kann den Erythrozyten zugeordnet werden. Da Polyamine eine wesentliche Rolle beim Wachstum von Zellen und bei Differentiationsprozessen spielen (Marton und Pegg, 1995; Seiler, 2003), erklärt dies den steigenden Bedarf der Plasmodien an Polyaminen im Laufe ihrer Entwicklung. In Übereinstimmung damit konnten Assaraf et al. (1987) zeigen, dass die intrazellulären Polyaminkonzentrationen von *P. falciparum* mit der Reifung und der metabolischen Aktivität des sich entwickelnden Parasiten zunehmen, während abnehmende Raten von DNA-, Protein- und RNA-Synthese von reduzierten Polyaminlevels begleitet werden. Da Erythrozyten keinen eigenen Polyaminsyntheseapparat besitzen (Assaraf et al., 1987), ist die Tatsache, dass Polyamine nur in Spuren in ihnen vorkommen, nicht überraschend; das geringe Vorkommen der Polyamine in nichtinfizierten Erythrozyten beruht einzig auf der Aufnahme dieser Verbindungen, wobei die Sperminaufnahme in weitaus geringerem Maße stattfindet als die der anderen beiden Polyamine und die Affinität der Erythrozyten für Spermidin wiederum bis zu 30-mal höher ist als die für Putrescin (Moulinoux et al., 1984). Dennoch sind auch in Bezug auf humane Erythrozyten Änderungen der Polyaminkonzentrationen im Laufe der erythrozytären Entwicklung beschrieben. Cooper et al. (1976) untersuchten die Polyaminkonzentrationen in Erythrozyten und konnten bei den Putrescin-, Spermidin- und Sperminkonzentrationen signifikante Unterschiede zwischen jungen und alten Erythrozyten feststellen.

4.6 Effekt von ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren

Die Inhibition der Polyaminbiosynthese resultiert erfahrungsgemäß in einer Blockierung der Entwicklung erythrozytärer Stadien von *P. falciparum* im Trophozitenstadium (Assaraf et al., 1984; Whaun und Brown, 1985; Assaraf et al., 1987; Wright et al., 1991); aufgrund dessen liegt die Vermutung nahe, dass die Polyamine an der Kontrolle des Schizogonieprozesses in *Plasmodium* beteiligt sind. Ihre elementare Bedeutung an Zellwachstum und -differenzierung, gekoppelt mit dem erhöhten Bedarf schnell proliferierender Zellen an Polyaminen, lässt eine Inhibierung der Schlüsselenzyme und die daraus resultierende Blockierung der Polyaminbiosynthese als geeignete Möglichkeit erscheinen, die Entwicklung des Parasiten zu unterbrechen.

Der Einfluss verschiedener ODC- und AdoMetDC-Inhibitoren auf die Enzymaktivität der bifunktionellen PfAdoMetDC/ODC und das Wachstum der Plasmodien in Kultur wurde untersucht, indem zum einen die Inhibitionskonstanten für die einzelnen Inhibitoren festgelegt wurden und zum anderen die IC₅₀-Werte und die Auswirkungen der jeweiligen Inhibitoren auf die intrazellulären Polyaminkonzentrationen analysiert worden sind.

4.6.1 Effekt der ODC-Inhibitoren auf Enzymaktivität, Wachstumsrate und Polyaminlevel

Die effektivsten in dieser Arbeit getesteten ODC-Inhibitoren, APA und dessen Derivate CGP 52622A und CGP 54169A, inhibieren die katalytische Aktivität der plasmodialen AdoMetDC/ODC mit K_i-Werten in einem niedrigen nanomolaren und das Wachstum der Parasiten in Kultur in einem einstelligen mikromolaren Bereich. Sie blockieren die Parasitenentwicklung im Trophozitenstadium, ein Ergebnis, das mit vorherigen Untersuchungen über den stadienspezifischen Effekt des ODC-Inhibitors DFMO in Übereinstimmung steht (Assaraf et al., 1984; Assaraf et al., 1987; Wright et al., 1991).

Die besonderen Eigenschaften, die APA und dessen Derivate zu so potenten Inhibitoren der ODC machen, liegen zu einem großen Teil in ihrem Reaktionsmechanismus begründet. Die Decarboxylierungsreaktion von Ornithin beinhaltet die

Bildung einer Schiff'schen Base zwischen dem Cofaktor PLP und einer Aminogruppe des Substrats. Um die entsprechenden Enzyme zu inhibieren, liegt die Verwendung von Carbonylverbindungen wie Derivaten von Hydrazin, Hydroxylamin, Semicarbazid oder ähnlichem somit nahe. Der inhibitorische Effekt von APA und seiner Derivate beruht auf der Aminoxy-Gruppe, die mit einer Carbonylgruppe reagiert und infolgedessen ein Oxim mit dem Cofaktor PLP im aktiven Zentrum der ODC bildet. Da APA und dessen Derivate Strukturanaloga von Putrescin sind, ist ihr inhibitorischer Effekt zudem sehr spezifisch, während die Aktivitäten anderer PLP-abhängiger Enzyme bei weitem weniger betroffen sind (Khomutov et al., 1985a). APA weist darüber hinaus strukturelle Ähnlichkeiten zu Canalin auf, einem potenten Inhibitor verschiedener Enzyme, die PLP als Cofaktor benötigen, einschließlich der ODC und der Tyrosin-Aminotransferase (Rahiala et al., 1971). Khomutov et al. (1985a) untersuchten den Einfluss von APA auf solche pyridoxalphosphat-abhängigen Enzyme wie die Tyrosin-Aminotransferase, die Alanin-Aminotransferase und die Aspartat-Aminotransferase und stellten fest, dass diese von APA nicht beeinflusst wurden, was die Spezifität dieses Inhibitors unterstreicht.

Für APA, den effektivsten der getesteten ODC-Inhibitoren und dessen Derivate wurde ein K_i -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich (3-17 nM) bestimmt. Dieser K_i -Wert von APA liegt im gleichen Bereich wie der für die ODC von *E. coli*; diese wird durch APA ebenfalls im nanomolaren Bereich mit einem K_i -Wert von 1,0 nM inhibiert (Paulin et al., 1986), genau wie die ODC der Mäuseniere, für die ein K_i -Wert von 3,2 nM beschrieben wurde (Khomutov et al., 1985a). Die ODC der Mäuseleber wird durch APA mit einem IC_{50} -Wert von 21 nM inhibiert (Khomutov et al., 1985b).

Krause et al. (2000) konnten zeigen, dass die separat exprimierte ODC-Domäne von *P. falciparum* gleiche kinetischen Konstanten aufweist wie das bifunktionale Protein. Vergleicht man die K_i -Werte für CGP 54169A und CGP 52622A mit denen des bifunktionalen Enzyms von *P. falciparum*, so wird deutlich, dass sich die Inhibitor-konstanten nicht von jenen des bifunktionalen Enzyms unterscheiden.

In Einklang mit der effektiven Inhibierung der plasmodialen ODC wird auch das Wachstum von *P. falciparum* in Kultur durch APA und die abgeleiteten CGP-Verbindungen mit IC_{50} -Werten zwischen 1 und 3 μ M blockiert. Im Vergleich dazu liegt der IC_{50} -Wert für APA bei humanen T₂₄ Blasenkrebszellen bei etwa 13 μ M (Stanek et

al., 1993); bei murinen B-Lymphozyten beträgt der für CGP 52622A 12,2 μM , jener für CGP 54169A 40,8 μM . Hier sind die IC_{50} -Werte im Vergleich zu *P. falciparum* also um das ca. 5- bis 20-fache höher. Vergleicht man diese IC_{50} -Werte der neueren kompetitiven ODC-Inhibitoren mit jenem für DFMO, dem bisher am besten untersuchten ODC-Inhibitor, so zeigt sich, dass DFMO für *P. falciparum* in vitro einen IC_{50} -Wert von 1,3 mM aufweist (Bitonti et al., 1987) und damit um das 1000-fache schlechter wirkt als APA.

Ein Versuch, bei dem APA mit dem potenten AdoMetDC-Inhibitor MDL 73811 kombiniert wurde, zeigte einen additiven, aber keinen synergistischen Effekt auf das Wachstum von *P. falciparum*. Auch dieses Ergebnis steht in Einklang mit bereits zuvor erhaltenen Daten über die Kombination eines ODC-Inhibitors (DFMO) mit dem AdoMetDC-Inhibitor MDL 73811 (Wright et al., 1991).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass APA und dessen Derivate die ODC zum einen deutlich besser inhibieren als die bisher bekannten ODC-Inhibitoren, zum anderen birgt die Selektivität dieser Inhibitoren, die sich in den 10-20-fach schlechteren IC_{50} -Werten bei anderen Zelltypen - insbesondere bei Säugetierzellen - zeigt, die Möglichkeit einer Entwicklung dieser Verbindung als potentiell Chemotherapeutikum.

Übereinstimmend mit den beschriebenen niedrigen K_i -Werten für die rekombinante ODC von *P. falciparum* und dem gravierenden Einfluss auf die Wachstumsraten von *P. falciparum* in Kultur haben APA und seine Derivate auch einen starken Effekt auf die Polyaminmengen in infizierten Erythrozyten, resultierend in einer fast vollständigen Abnahme des Putrescins, einer starken Reduzierung der Spermidinkonzentrationen und einer Zunahme der Sperminlevel. Die APA-Derivate CGP 54169A und CGP 52622A führten ebenfalls zu einer solchen Polyaminverteilung, wobei der Effekt von CGP 54169A dem von APA in seiner Intensität glich, der von CGP 52622A hingegen einen etwas weniger gravierenden Einfluss zeigte. Die starke Abnahme der Spermidinmengen konnten Hyvonen et al. (1988, 1990) auch bei Hamsternierenzellen feststellen; die Zugabe von 0,5 mM APA zu dem Kulturmedium blockierte das Zellwachstum und reduzierte die Putrescinmengen, die zellulären Spermidinlevel sanken innerhalb von 24 h auf weniger als 10% der Kontrollwerte. Diese starke Spermidinverarmung resultierte hier in einer zunehmenden Aktivität der AdoMetDC, die Reduktion der Spermidinmengen war von

einem völligen Erliegen der Exkretion von Putrescin, Spermidin und acetylierten Polyaminen, einer Zunahme der AdoMetDC-Aktivität und der daraus resultierenden Akkumulation von AdoMet und dcAdoMet begleitet. Diese Effekte waren reversibel und konnten durch die Zugabe von 0,5 mM Putrescin oder 0,1 mM Spermidin aufgehoben werden.

Die Auswirkungen von APA auf die Enzymaktivität und die Polyaminkonzentrationen fanden sich auch in humanen Darmkrebszellen (Caco-2 und HT-29). Hier blockierte APA die ODC-Aktivität innerhalb von 24 h komplett. APA und der AdoMetDC-Inhibitor AMA in Kombination (je 100 µM) reduzierten die ODC- und AdoMetDC-Aktivität auf nicht mehr detektierbare Level und die intrazellulären Polyamine auf 8-23% der Kontrollwerte. Der daraus resultierende Wachstumsstop konnte nur durch die Zugaben von Spermidin umgekehrt werden (Milovica, 2001).

Garriz et al. (2003) konnten zeigen, dass APA in dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* die ODC, die Spermidin-Synthase und die AdoMetDC inhibiert. Die Addition von APA (1 mM) zum Kulturmedium bedingte eine 29%ige Abnahme von Spermidin und eine zweifache Zunahme von Spermin.

Bei *P. falciparum* konnte die extreme Abnahme der intrazellulären Putrescin- und Spermidin-Konzentrationen durch Zugabe von 500 µM Putrescin zu dem Medium wieder aufgehoben werden; dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, die bei den anderen untersuchten Zelltypen gemacht worden sind. Auch der Effekt von DFMO lässt sich durch die Zugabe von 500 µM Putrescin aufheben. Im Gegensatz zu APA und dessen Derivaten ermöglichte bei DFMO-behandelten *P. falciparum* in Kultur jedoch auch die Zugabe von 0,25 mM Spermidin eine Wiederherstellung des Wachstumsprozesses (Assaraf et al., 1987). Darüber hinaus berichteten Bitonti et al. (1987), dass dem Effekt von DFMO durch eine gleichzeitige Zugabe von Spermidin und Spermin entgegengewirkt werden kann, während die Zugabe exogenen Spermins allein den Effekt von DFMO nicht aufzuheben vermag (Assaraf et al., 1987).

In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass Putrescin von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten weitaus besser aufgenommen werden kann als von nichtinfizierten Erythrozyten, während die Aufnahme von Spermidin nur geringfügig verstärkt war und in der ohnehin schon niedrigen Sperminaufnahme keine Änderung auftrat (Assaraf et al., 1987). Infolgedessen sollte in Betracht gezogen

werden, dass eine verstärkte Aufnahme von Putrescin durch infizierte Erythrozyten die Effizienz der ODC-Inhibitoren reduzieren könnte. Ein spezifischer Putrescintransporter wurde bei *Plasmodium knowlesi* charakterisiert (Singh et al., 1997).

Erhöhte Sperminkonzentrationen in *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten, wie sie nach Einwirkung von APA, CGP 54169A und CGP 52622A auftraten, wurden ebenfalls für die Behandlung mit DFMO berichtet (Bitonti et al., 1987). Da dem Genom von *P. falciparum* jedoch ein SpmSyn-Gen fehlt (untersucht mittels BLAST search der *P. falciparum*-Genomdatenbank), ist es bemerkenswert, dass die parasitierten Erythrozyten Spermin anhäufen, während die intrazelluläre Putrescinkonzentration aufgrund der ODC-Inhibition abnimmt. Dieser Effekt lässt darauf schließen, dass die Parasiten eine Möglichkeit besitzen, dieses Polyamin zu synthetisieren; tatsächlich konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass die *P. falciparum*-SpdSyn in geringem Maße auch die Bildung von Spermin aus Spermidin und dcAdoMet katalysiert (Haider et al., 2005). Bei Säugetierzellen, die mit ODC-Inhibitoren behandelt wurden, blieben die Spermin-Mengen dagegen fast unverändert (Marton und Pegg, 1995; Seiler, 2003).

Die Wachstumsrate von promyelozytischen Leukämiezellen HL-60 wurde durch APA (0,5 mM) ebenfalls blockiert. Bemerkenswerterweise kann diese Inhibition durch Spermidin, aber nicht durch Putrescin aufgehoben werden (Khomutov, 1985a). Die Behandlung von Ehrlich-Ascitestumorzellen mit APA resultierte ebenfalls in einer Abnahme des zellulären Gehalts von Putrescin und Spermidin, begleitet von einem Wachstumsstopp des Zellwachstums. Die Aktivität der AdoMetDC war hier - wie auch schon bei anderen untersuchten Zellen - um ein vielfaches gesteigert (Persson et al., 1989).

Die als sogenannte „pro drugs“ konzipierten Verbindungen H₂NO-Agmatin (AO-Agmatin) und H₂N-Agmatin (GAPA), isosterische Analoga von Agmatin, zeigten weitaus schlechtere inhibitorische Konstanten als APA und dessen Derivate. Von diesen „pro drugs“ erhofft man sich, dass sie aufgrund ihrer chemischen Struktur nach Aufnahme in die Zelle durch zelleigene Komponenten so modifiziert werden, dass sie ODC und/oder AdoMetDC inhibieren. Die Aufnahme von GAPA in die Zelle über einen Transportmechanismus und die Umwandlung zu APA, möglicherweise katalysiert durch eine Urease, würde zu einer Inhibierung der ODC führen. Des Weiteren wird postuliert, dass im Falle von bis-GAPA die strukturelle Nähe zu MGBG eine Inhibition der AdoMetDC bewirkt, bevor die Verbindung weiter zu AO-Agmatin

und APA umgewandelt wird, resultierend in einer effektiven Inhibition der ODC (Simonian et al., unveröffentlicht). Wie zu erwarten war, zeigten die K_i -Werte, dass diese Verbindungen zumindest auf das Enzym bei weitem nicht so effektiv wirken wie die APA-Derivate, was auf der Tatsache beruht, dass es sich um „pro drugs“ handelt und diese somit erst nach Modifikationen im Zellinneren ihre volle Wirksamkeit entfalten.

Trotz dieses Konzepts einer intrazellulären Prozessierung in pharmakologisch wirksamere Verbindungen zeigen die IC_{50} -Werte nicht den erhofften Effekt; sie liegen deutlich höher als jene für die Hydroxylverbindungen, weisen aber immer noch etwa zehnfach bessere Werte auf als DFMO.

Übereinstimmend mit den IC_{50} -Werten wiesen AO-Agmatin, GAPA und bis-GAPA auch bezüglich der Polyaminkonzentrationen *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten nicht so starke Auswirkungen wie APA, CGP 54169A und CGP 52622A auf. Hier kann davon ausgegangen werden, dass dieser weniger auffällige Einfluss auf die Polyaminkonzentrationen das Resultat der schlechteren inhibitorischen Eigenschaften dieser „pro drugs“ auf Grund schlechterer Aufnahme in die Zelle oder einer fehlenden oder unvollständigen Umwandlung in inhibitorisch aktivere Endverbindungen ist.

Fasst man diese Resultate, die diese jüngere Generation von ODC-Inhibitoren liefern, zusammen, so bleibt zu bemerken, dass besonders im Falle von APA und den daraus abgeleiteten Derivaten CGP 54169A und CGP 52622A Verbindungen zur Verfügung stehen, die bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf Enzymaktivität und Zellwachstum ihre Vorgänger bei weitem übertreffen. Erste Untersuchungen hinsichtlich der ODC von Säugetierzellen zeigen darüber hinaus eine geringere Beeinflussung des Enzyms, was sicherlich einen weiteren Vorteil in Bezug auf zu vermeidende Nebenwirkungen darstellt. Weitere Untersuchungen sind daher dringend notwendig, um zu erwägen, ob sich das enorme Potential dieser Verbindungen für die Entwicklung von Chemotherapeutika gegen *P. falciparum* nutzen lässt.

4.6.2 Effekt der AdoMetDC-Inhibitoren auf die Enzymaktivität, Wachstumsrate und Polyaminlevel

Das bicyclische Analogon des bereits etablierten AdoMetDC-Inhibitors MGBG, CGP 40215A, ist ein potenter Inhibitor der *P. falciparum* AdoMetDC-Aktivität mit einem K_i -Wert von 1,3 μM . Damit liegt die Inhibitionskonstante im gleichen Bereich wie die des bereits bekannten und gut charakterisierten irreversiblen AdoMetDC-Inhibitors MDL 73811 (1,6 μM) und der Ausgangsverbindung MGBG, für die eine Inhibitionskonstante von 0,46 μM beschrieben wurde (Rathaur und Walter, 1987). Die separat exprimierte AdoMetDC-Domäne wurde auch bereits hinsichtlich des CGP 40215A-Inhibitors getestet (Wrenger et al., 2001); auch hier zeigte sich mit 0,8 μM ein vergleichbarer K_i -Wert.

Im Falle der trypanosomalen AdoMetDC wurde ein IC_{50} -Wert für CGP 40215A von 20 μM beschrieben (Bacchi et al., 1996).; hier ist die Differenz zu dem inhibitorischen Effekt der nichtcyclischen Mutterverbindung MGBG (130 μM) weitaus höher als bei dem plasmodialen Enzym. Die sowohl antitypanosomale als auch antileishmaniale Aktivität von CGP 40215A hinsichtlich des Zellwachstums im niedrigen mikromolaren Bereich ist schon zuvor gut untersucht worden. Brun et al. (1996) ermittelten für CGP 40215A bei *T. brucei rhodesiense* einen IC_{50} -Wert von 4,5 nM; außerdem konnten sie zeigen, dass dieser Inhibitor im Vergleich zu anderen antitypanosomalen Verbindungen mit einem IC_{50} -Wert von 1,1 mM deutlich weniger toxisch für eine humane Adenocarcinoma-Zelllinie ist. Darüber hinaus beschrieben sie die fehlende Wirkung von CGP 40215A gegen *L. donovani*- und *T. cruzi*-Amastigoten in murinen Makrophagen in vitro. Mukhopadhyay et al. (1996) bestimmten für *L. donovani*-Promastigoten einen IC_{50} -Wert von 18 μM .

In *P. falciparum* inhibierte CGP 40215A den Wachstumsprozess mit einem IC_{50} -Wert von 1,8 μM , ein weitaus geringerer IC_{50} -Wert als der von Das et al. (1997) für die Mutterverbindung MGBG beschriebene (224 μM). Hier wird deutlich, dass der inhibitorische Effekt bezüglich der Wachstumsinhibition weitaus besser ist als der für MGBG; die Hemmung des Enzyms dagegen erfolgt mit ähnlichen Inhibitor-konstanten. Infolgedessen kann vermutet werden, dass CGP 40215A neben der Wirkung auf die plasmodiale AdoMetDC noch andere Prozesse beeinflusst, durch die der antiplasmodiale Effekt verstärkt wird.

Die vielversprechenden Eigenschaften von CGP 40215A bestätigten sich in Labormodellversuchen, die in der Heilung akuter, durch *T. brucei*-Unterarten und *T. congolense* verursachter Infektionen (Bacchi et al., 1996) resultierten und auch gegen andere Trypanosomenarten einschließlich eines multidrug-resistenten *T. brucei brucei*-Stammes eine signifikante inhibitorische Aktivität aufwiesen (Brun et al., 1996).

Die Behandlung von *P. falciparum* in Kultur mit 5 μ M des irreversiblen AdoMetDC-Inhibitors MDL 73811 führte zu stark erhöhten Putrescin- und verringerten Spermidin- und Sperminkonzentrationen in den infizierten Erythrozyten. Dieses Polyaminmuster nach Behandlung mit MDL 73811 steht in Übereinstimmung mit allen anderen bisher untersuchten Organismen: für *T. brucei rhodiense* (Bitonti et al., 1990), L1210-Zellen (Byers et al., 1992), basophile Leukämiezellen aus der Ratte (Bianchi et al., 1996) und auch für *P. falciparum* (Wright et al., 1991) wurde ein Anstieg der Polyaminkonzentrationen und eine Abnahme der Spermidinmengen beschrieben. Trotz der hohen Effizienz von MDL 73811 gegen *P. falciparum* in Kultur zeigte diese Verbindung in *P. berghei*-infizierten Mäusen keine Wirkung (Wright et al., 1991). Dies lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit der sehr schnellen Clearance des Inhibitors zuschreiben; die Halbwertszeit von MDL 73811 im Plasma von Ratten und Mäusen beträgt nur etwa 10 min (Byers et al., 1992).

Der Effekt des AdoMetDC-Inhibitors wurde im Falle von *P. falciparum* durch die Zugabe von Spermidin nur in geringem Maße aufgehoben, was auf eine ineffiziente Aufnahme des Triamins hinweisen könnte. Diese Daten stehen in Kontrast zu jenen vorhergehender Untersuchungen mit MDL 73811, in denen sowohl die Zugabe von 250 μ M Spermidin als auch von 250 μ M Spermin den inhibitorischen Effekt aufhoben (Wright et al., 1991).

Byers et al. (1991) berichteten über den Effekt des AdoMetDC-Inhibitors MDL 73811 auf *T. brucei brucei* und fanden eine starke Anhäufung der AdoMet-Mengen innerhalb einer Stunde nach Behandlung, während die Polyaminmengen innerhalb dieser Zeitspanne nicht beeinflusst waren. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen ist diskutiert worden, dass die Lebensfähigkeit der Parasiten durch eine erhöhte Rate an Methylierungsreaktionen beeinträchtigt werden könnte. Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung von Säugetierzellen mit MDL 73811 für 6 h nur in einer 1,5- bis 2-fachen Zunahme der AdoMet-Level. Der Grund für die typischen

Veränderungen der Polyaminmuster nach Behandlung mit MDL 73811 beruht auf der Tatsache, dass MDL 73811 die AdoMetDC durch eine irreversible Aminierung der prosthetischen Pyruvoylgruppe des Enzyms inaktiviert (Shantz et al., 1992). Als Konsequenz erfolgt keine Decarboxylierung von AdoMet mehr, was wiederum zu herabgesetzten Spermidin- und Sperminkonzentrationen in den Zellen und Geweben führt, gefolgt von einer Induktion der ODC und einer Zunahme der Putrescinkonzentrationen.

Im Gegensatz zu MDL 73811 beeinflusste die Inkubation der Plasmodienkulturen mit subletalen Dosen der AdoMetDC-Inhibitoren CGP 40215A und CGP 48664A die Polyaminmuster *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten nicht. Dies weist auf einen Wirkungsmechanismus hin, der nicht auf eine Polyamin-Depletion abzielt, sondern einen anderen Wirkungsort anspricht. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die Struktur von CGP 40215A jenen von Berenil (Diminazen) und Pentamidin gleicht. Für beide Verbindungen ist der Wirkungsmechanismus unbekannt; es wird jedoch vermutet, dass Nukleinsäuren und ihr Metabolismus beteiligt sind (Wang, 1995).

Laughton et al. (1996) berichteten, dass viele dikationische Amidinverbindungen an eine zentrale AATT-Sequenz der „minor groove“ der DNA binden und eine sehr effektive Aktivität gegen eine Vielzahl von Erregern besitzen. Substituierte aromatische Diamidine wie Furamidin, Berenil und Pentamidin sind typische Beispiele für diese Verbindungsklasse. Genauere Analysen mittels Kristallisierungen zeigten die Ausbildung ausgedehnter Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidingruppen des Inhibitors und den -NH-Gruppen der DNA-Basen der „minor groove“. Eine Korrelation zwischen der DNA-Bindung erwähnter Inhibitoren und dem antiparasitischen Effekt ist unbestritten (Bell et al., 1990, 1991, 1993; Tidwell und Boykin, 2003). Auch CGP 40215A kann mit der DNA interagieren (Nguyen et al., 2002, 2004) und zeigte in diesem Zusammenhang eine hohe Affinität für AT-reiche DNA-Sequenzen, aber eine sehr schwache Bindung an GC-Sequenzbereiche.

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann vermutet werden, dass eine solche Interaktion mit der DNA für den inhibitorischen Effekt von CGP 40215A verantwortlich sein könnte, insbesondere, wenn man den ungewöhnliche hohen A+T-Anteil des plasmodialen Genoms von 80% (Gardner et al., 2002) bedenkt.

Im Gegensatz zu den geringen Auswirkungen von CGP 40215A auf die Polyaminkonzentrationen von *P. falciparum* sind bei anderen untersuchten

Organismen jedoch durchaus gravierende Effekte auf die Polyaminmengen beschrieben worden; die Behandlung von *L. donovani*-Promastigoten sowie von *T. cruzi* und *T. congolense* mit CGP 40215A resultierte in signifikanten Abnahmen der Spermidinkonzentrationen (Mukhopadhyay, 1996; Bacchi, 1993). Aufgrund dieser reduzierten Spermidin- und erhöhten Putrescinkonzentrationen in *Trypanosoma*-Zellen wird die trypanosomale AdoMetDC als ein primäres Zielenzym für die Inhibition durch CGP 40215A angesehen (Bacchi et al., 1996).

In amelanocytischen AMEL-3 Hamster-Melanomzellen beschrieben Garcia-Fernandez et al. (2005) eine kompetitive Inhibition des Putrescintransports durch CGP 40215A mit einem K_i -Wert von 1,9 μM . Ein solches Phänomen wäre auch eine Erklärung für den fehlenden Einfluss auf die Polyaminkonzentrationen in *P. falciparum*; eine Anhäufung des Putrescins als Folge der AdoMetDC-Inhibition würde durch eine blockierte Putrescinaufnahme ausbleiben.

Um zu untersuchen, ob der AdoMetDC-Inhibitor CGP 40215A auch die Aktivität der AdoMet-Synthetase beeinflusst, wurde auch die Wirkung auf dieses Enzym getestet. Hier war zwar ein Effekt von CGP 40215A auf die AdoMet-Konzentrationen in Form einer starken Abnahme zu erkennen; die inhibitorische Wirkung auf das Enzym zeigte sich jedoch erst in höheren Konzentrationen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein inhibitorischer Einfluss von CGP 40215A auf die AdoMet-Synthetase nicht der Grund für den gravierenden inhibitorischen Effekt dieses Inhibitors einerseits und den fehlenden Einfluss auf die Polyaminkonzentrationen andererseits ist.

Ein weiterer hier untersuchter AdoMetDC-Inhibitor, CGP 48664A, der das Wachstum von Säugetierzellen sehr effektiv blockiert (Regenass et al., 1994) und bereits in klinischen Studien der Phasen I und II an Krebspatienten auf seine Aktivität gegen Tumorzellen und non-Hodgkin's Lymphoma getestet wurde (Pless et al., 2004; Paridaens et al., 2000; van Zuylen et al., 2004; Seiler, 2003; Millward et al., 2005), hat sich gegen *P. falciparum* als weniger effektiv erwiesen, weder hinsichtlich der Inhibitorkonstanten noch bezüglich des Einflusses auf die Polyaminkonzentrationen. Im Gegensatz zu dem relativ geringen Effekt von CGP 48664A auf die Wachstumsrate und die Polyaminkonzentrationen von *P. falciparum* wurde in humanen Tumorzelllinien ein IC_{50} -Wert von 5 nM beschrieben, begleitet von einem Anstieg des Putrescinpools um das zehnfache und eines Abfallens der Spermidin-

und Sperminkonzentrationen auf weniger als 10% der Kontrollen (Regenass et al., 1994). Für weitere Tumorzelllinien aus Säugetieren wurden ebenfalls gravierende Effekte auf die Polyamine in Form von sinkenden Spermidin- und Sperminkonzentrationen und stark erhöhten Putrescinnmengen sowie IC_{50} -Werte zwischen 0,1 und 5 μ M gezeigt (Dorhout et al., 1995; Manni et al., 1995; Thomas, 1996; Svensson et al., 1997). Allerdings beschrieben Dorhout et al. (1997) im Zusammenhang mit L1210-Zellen unveränderte Polyaminmengen nach Behandlung mit CGP 48664A; Zellzahl und Überlebensfähigkeit der Zellen jedoch fielen konzentrationsabhängig auf 50% bis 70% der Kontrollen. Infolgedessen postulierten sie, dass die Wachstumsinhibition durch CGP 48664A nicht aus einer AdoMetDC-Inhibition resultiert, sondern eher aufgrund eines bisher nicht bekannten zweiten Effekts erfolgt.

AMA ist ein weiterer Inhibitor der AdoMetDC. Es stellt ein AdoMet-Analogon dar, in dem eine Methylgruppe, verbunden mit einer Aminooxygruppe, an das Sauerstoffatom substituiert ist; eine Aminomethylengruppe ist hier gegen eine Aminooxygruppe ausgetauscht. Solch eine Substitution ist isosterisch, die Ähnlichkeit des Inhibitors mit dem Substrat führt dazu, dass sich die Bindungskapazität von AMA an einen Pyruvatrest im aktiven Zentrum des Enzyms (Capitani et al., 2003) nur in geringem Maße ändert, wodurch die Inhibierung spezifisch ist.

Die AdoMetDC von *P. falciparum* wurde von AMA mit einem K_i -Wert von 17,7 μ M inhibiert. Diese Inhibitorkonstante ist etwa um das dreifache niedriger als jene für die AdoMetDC von *E. coli* mit 47 μ M (Paulin, 1986).

Der IC_{50} -Wert für die Wachstumsinhibition von Plasmodien (100 μ M) gleicht dem von L1210-Leukämiezellen, der ebenfalls bei 100 μ M liegt (Kramer et al., 1989). Trotz dieser Wachstumsinhibition der Plasmodienzellen in Kultur ließ sich kein Einfluss auf die Polyaminmuster erkennen. Dieses Ergebnis hinsichtlich der Polyaminkonzentrationen passt zu denen von CGP 40215A und CGP 48664A, steht jedoch im Gegensatz zu den von Kramer et al. (1989) beschriebenen sinkenden Spermidin- und Sperminmengen und der mehr als zehnfachen Zunahme des Putrescins. In diesem Zusammenhang konnte die Enzymspezifität von AMA durch das Aufheben der Wachstumsinhibition durch die Zugabe exogenen Spermidins gezeigt werden.

Trotz der Tatsache, dass der in anderen Zellen, insbesondere in Tumorzellen sehr erfolgreiche AdoMetDC-Inhibitor CGP 48664A bei *P. falciparum* keinen bemerkens-

werten Effekt zeigt, konnte für das zweite MGBG-Derivat CGP 40215A eine sehr effektive Inhibition sowohl der Enzymaktivität der plasmodialen AdoMetDC mit einem K_i -Wert von 1,3 μM als auch des Zellwachstums mit einem IC_{50} -Wert von 1,8 μM festgestellt werden. In noch höheren Maße als bei den ODC-Inhibitoren lassen sich hier signifikante Unterschiede zu dem IC_{50} -Wert in Säugetierzellen erkennen, der in humanen T₂₄ Blasenkrebszellen bei 74 μM liegt (Stanek *et al.*, 1993), so dass von weitaus weniger Nebenwirkungen ausgegangen werden kann als beispielsweise bei der Mutterverbindung MGBG.

Bedenkt man darüber hinaus, dass auch erste Ergebnisse des Wirkungspotentials von CGP 40215A *in vivo* einen positiven Effekt zeigten und zu einer Heilung *T. brucei*- und *T. congolense*-Infektionen in Labormodellversuchen führten (Bacchi *et al.*, 1996), so sind - ähnlich wie im Falle des ODC-Inhibitors APA - weiterführende Untersuchungen dringend notwendig, die weitere Erkenntnisse hinsichtlich einer möglichen Weiterentwicklung von CGP 40215A als Chemotherapeutikum liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Nach wie vor ist Malaria mit jährlich 300 bis 500 Millionen infizierten Personen und über einer Millionen Toten die bedeutendste parasitäre Tropenkrankheit. Die sich in zunehmendem Maße ausbreitenden Resistenzen gegenüber den herkömmlichen Malariamedikamenten erschweren das Bemühen, diese Krankheit zu kontrollieren; infolgedessen ist es von dringender Notwendigkeit, neue potentielle Ziele im Stoffwechsel von *P. falciparum* für die Entwicklung von Chemotherapeutika zu identifizieren und zu analysieren. Hinsichtlich der pathophysiologischen Auswirkungen der Malaria tropica auf den humanen Wirt sind die erythrozytären Stadien der Plasmodien von entscheidender Bedeutung. Eine Infektion humaner Erythrozyten mit *P. falciparum* ändert in gravierender Weise die metabolischen Bedürfnisse des Parasit-Wirtszellen-Systems, da innerhalb kürzester Zeit genügend RNA, DNA und Protein synthetisiert werden muss, um die Entwicklung und Freisetzung neuer Merozoiten gewährleisten zu können.

Wie gezeigt werden konnte, geht die hohe Proliferationsrate des erythrozytären Stadiums mit einem gesteigerten Bedarf an Polyaminen einher. Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin - aliphatische Kohlenwasserstoffe, die unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind - spielen für Proliferation und Differenzierung der Zellen eine elementare Rolle.

Entsprechend konnten in *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten im Laufe der Entwicklung der Parasiten vom Ring- über das Trophozoiten- zum Schizontenstadium deutlich steigende Mengen an Putrescin, Spermidin und Spermin gefunden werden. Die Verteilung der Polyamine in der Wirtszellen-Parasiten-Einheit wurde nach der Trennung von Parasit und Wirtszelle durch die Verwendung des porenbildenden Toxins Streptolysin O (SLO) untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der Großteil an Polyaminen mit dem Parasiten assoziiert ist und nur ein kleiner Anteil dem Erythrozyten zugeordnet werden kann.

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Vermehrungsprozess und Polyaminbedarf bietet eine Blockierung des Polyaminbiosyntheseweges eine Möglichkeit für die Bekämpfung parasitärer Infektionen. Dieser Ansatz birgt besonders dann vielversprechende Perspektiven, wenn sich der Stoffwechsel von Wirt und Parasit unterscheidet. In *P. falciparum* ist ein solcher struktureller Unterschied gegeben; während die Schlüsselenzyme der Polyaminsynthese, die S-Adenosylmethionin-

Decarboxylase (AdoMetDC) und die Ornithin-Decarboxylase (ODC) bei Säugetieren durch zwei verschiedene Genorte repräsentiert und unabhängig voneinander transkribiert und translatiert werden, sind sie bei *P. falciparum* auf einem bifunktionellen PfAdoMetDC/ODC-Polypeptid angeordnet. Darüber hinaus fehlen *P. falciparum* die Enzyme des Interkonversionsweges sowie eine Spermin-Synthase.

AdoMet, das in decarboxylierter Form für die Synthese von Spermidin und Spermin benötigt wird, wird durch die Reaktion von Methionin und ATP - katalysiert durch die S-Adenosylmethionin-Synthetase (AdoMet-Synthetase) - bereitgestellt. Darüber hinaus erfüllt AdoMet wichtige Funktionen bei Transmethylierungsreaktionen und ist am *trans*-Sulfurierungspfad zu Cystein, einer der drei Aminosäuren, die in die Synthese von Glutathion involviert sind, beteiligt.

Die AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* wurde rekombinant exprimiert und charakterisiert. Die biochemischen Parameter wie molekulare Masse der Untereinheiten, pH-Optimum, K_m -Werte, spezifische Aktivität und K^+ -Abhängigkeit gleichen weitgehend denen der anderen bisher charakterisierten AdoMet-Synthetasen. In ihrem monomeren Status unterscheidet sie sich jedoch von den meist dimeren oder tetrameren AdoMet-Synthetasen anderer Organismen.

Mit Hilfe von Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass die konservierten Aminosäurereste Asp²⁴, Asp¹²⁷, Asp²³⁸, Asp²⁷¹ und Glu⁵⁰ der *P. falciparum*-AdoMet-Synthetase für die Bindung von Methionin, von Mg^{2+} und K^+ verantwortlich und für die katalytische Aktivität essentiell sind. Bei allen Mutanten nahm die katalytische Aktivität der Mutanten drastisch ab und zeigte nur noch etwa 1-3 % des Wildtyps.

Für alle drei Enzyme, ODC, AdoMetDC und AdoMet-Synthetase, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Inhibitoren hinsichtlich ihres Einflusses auf Enzymaktivität, Wachstumsrate und Polyamin- bzw. AdoMet-Konzentrationen untersucht. Zwei Substratanaloga von Methionin, Inhibitoren der AdoMet-Synthetase, Seleno-L-Methionin und Cycloleucin inhibierten das Wachstum von *P. falciparum* mit IC_{50} -Werten von 65 μ M bzw. 7,5 mM. Für Selenomethionin konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es die PfAdoMet-Synthetase mit einem K_i -Wert von 89 μ M inhibiert.

Der Einfluss auf die intrazellulären AdoMet- und Polyamin-Konzentrationen wurde nach Inkubation mit Selenomethionin ebenfalls quantifiziert. Hier zeigte sich zwar eine Abnahme auf etwa 50%, ein Einfluss auf die Polyaminmengen von *P. falciparum* war jedoch nicht festzustellen.

Die AdoMetDC-Inhibitoren CGP 40215A und die bereits zuvor bei anderen Organismen gut untersuchte Verbindung MDL 73811 zeigten für die rekombinante *PfAdoMetDC* K_i -Werte bei etwa 1,5 μM und blockierten das Zellwachstum mit IC_{50} -Werten zwischen 2 und 3 μM . Während MDL 73811 einen deutlichen Einfluss auf die Polyaminkonzentrationen zeigte, resultierend in stark erhöhten Putrescin- und verringerten Spermidin- und Sperminkonzentrationen, war ein entsprechender Effekt für CGP 40215A trotz guter Inhibitionskonstanten nicht festzustellen. Dies weist darauf hin, dass der Inhibitionsmechanismus von CGP 40215A auf einen anderen Zielort gerichtet ist.

Interessanterweise inhibiert CGP 40215A auch die AdoMet-Synthetase von *P. falciparum* mit einem IC_{50} -Wert von 39 μM ; die AdoMet-Konzentrationen nach Behandlung mit 10 μM des AdoMetDC-Inhibitors sanken auf ca. 10% der Kontrollen.

Die besten der getesteten ODC-Inhibitoren, APA und dessen Derivate CGP 54169A und CGP 52622A, zeigten bereits in äußerst niedrigen Konzentrationen sehr große Effekte. Die ODC wurde von diesen Verbindungen mit K_i -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich (3-17 nM) inhibiert. Auch das Wachstum der Plasmodienzellen in Kultur stagnierte durch die Zugabe von APA und den abgeleiteten CGP-Verbindungen mit IC_{50} -Werten zwischen 1 und 3 μM . Im Falle dieser Klasse von Inhibitoren lässt sich darüber hinaus ein deutlicher Zusammenhang zwischen hemmendem Effekt und Auswirkungen auf die Polyaminkonzentrationen erkennen; die Inkubation der Plasmodienkulturen mit den Inhibitoren in Konzentrationen zwischen 1 μM und 5 μM resultierte in einer fast vollständigen Abnahme des Putrescins, einer starken Reduzierung der Spermidinkonzentrationen und einem Anstieg der Sperminlevel. Die Spezifität dieser Inhibitoren zeigte sich dadurch, dass die Zugabe exogenen Putrescins die Wachstumsblockierung aufzuheben vermag. Mit diesen Werten sind die inhibitorischen Effekte dieser neueren Generation von ODC-Inhibitoren um ein vielfaches besser als die des bisher bekanntesten und am besten untersuchten ODC-Inhibitors DFMO, der bereits erfolgreich in der Krebstherapie und bei der Behandlung der Schlafkrankheit eingesetzt worden ist.

Deshalb sollten besonders die Leitstrukturen APA und dessen CGP-Derivate dringend weiter untersucht werden, um ihre Eigenschaften im Plasmodien-Tiermodell zu testen und zu evaluieren, ob sie sich als potentielle Kandidaten für die Entwicklung als Antimalaria-Chemotherapeutikum eignen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahn K.S., Henney H.R. Jr. (1997) Nucleotide sequence and developmental expression of *Acanthamoeba* S-adenosylmethionine synthetase gene. *Biochim Biophys Acta.* 1351(1-2):223-230.

Aley S.B., Sherwood J.A., Marsh K., Eidelman O., Howard R.J. (1986) Identification of isolate-specific proteins on sorbitol-enriched *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes from Gambian patients. *Parasitology.* 92(Pt 3):511-525.

Alhonen-Hongisto L., Seppanen P., Jänne J. (1980) Intracellular putrescine and spermidine deprivation induces increased uptake of the natural polyamines and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Biochem J.* 192(3):941-945.

Alvarez L., Corrales F., Martin-Duce A., Mato J.M. (1993) Characterization of a full-length cDNA encoding human liver S-adenosylmethionine synthetase: tissue-specific gene expression and mRNA levels in hepatopathies. *Biochem J.* 293(Pt 2):481-486.

Ansorge I., Paprotka K., Bhakdi S., Lingelbach K. (1997) Permeabilization of the erythrocyte membrane with streptolysin O allows access to the vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum* and a molecular analysis of membrane topology. *Mol Biochem Parasitol.* 84(2):259-261.

Anton D.L., Kutny R. (1987). *Escherichia coli* S-adenosylmethionine decarboxylase. Subunit structure, reductive amination and NH₂-terminal sequences. *J. Biol. Chem.* 262:2817-2822.

Aouida M., Leduc A., Poulin R., Ramotar D. (2005) AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280(25):24267-24276.

Assaraf Y.G., Abu-Elheiga L., Spira D.T., Desser H., Bachrach U. (1987) Effect of polyamine depletion on macromolecular synthesis of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, cultured in human erythrocytes. *Biochem. J.* 242:221-226.

Assaraf Y.G., Golenser J., Spira D.T., Bachrach U. (1984) Polyamine levels and the activity of their biosynthetic enzymes in human erythrocytes infected with the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* 222:815-819.

Assaraf Y.G., Golenser J., Spira D.T., Messer G., Bachrach U. (1987) Cytostatic effect of DL-alpha-difluoromethylornithine against *Plasmodium falciparum* and its reversal by diamines and spermidine. *Parasitol. Res.* 73:313-318.

Avaeva S.M., Rodina E.V., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Vorobyeva N. N. (1996a) Effect of D42N substitution in *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase on catalytic activity and Mg²⁺ binding. FEBS Lett. 392(2):91-94.

Avaeva S., Ignatov P., Kurilova S., Nazarova T., Rodina E., Vorobyeva N., Oganessyan V., Harutyunyan E. (1996b) *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: site-directed mutagenesis of the metal binding sites. FEBS Lett. 399(1-2):99-102.

Bacchi C.J., Brun R., Croft S.L., Alicea K., Buhler Y. (1996) In vivo trypanocidal activities of new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1448-1453.

Bachrach U., Don S., Wiener H. (1973) Polyamines and tumor cells: effect of transformation of chick embryo fibroblasts by Rous sarcoma virus on polyamine levels. Biochem Biophys Res Commun. 55(3):1035-1041.

Bachrach U. (2004) Polyamines and cancer: minireview article. Amino Acids. 26(4):307-309.

Behe M., Felsenfeld G. (1981) Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly(dG-m5dC) . poly(dG-dC). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 78:1619-1623.

Behe M., Zimmermann S., Felsenfeld G. (1981) Changes in the helical repeat of poly(dG-m5dC). poly(dG-m5dC) and poly(dG-dC).poly(dG-dC) associated with the B-Z transition. Nature 293:233-235.

Bell C.A., Hall J.E., Kyle D.E., Grogl M., Ohemeng K.A., Allen M.A., Tidwell R.R. (1990) Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazoniensis*. Antimicrob Agents Chemother. 34:1391-1386.

Bell C.A., Cory M., Fairley T.A., Hall J.E., Tidwell R.R. (1991) Structure-activity studies of pentamidine analogs against *Giardia lamblia* and correlation of anti-giardial activity with DNA-binding affinity. Antimicrob Agents Chemother. 35:1099-1107.

Bell C.A., Dykstra C.C., Naiman N.A., Cory M., Fairley T.A., Tidwell R.R. (1993) Structure-activity studies of dicationically substituted bis-benzimidazoles against *Giardia lamblia*: correlation of anti-giardial activity with DNA-binding affinity and giardial topoisomerase II inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 37:2668-2673

Berger B.J., Knodel M.H. (2003) Characterisation of methionine adenosyltransferase from *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. BMC Microbiol. 3:12.

- Bey P., Danzin C., Van Dorsselaer V., Mamont P., Jung M., Tardif C. (1978) Analogues of ornithine as inhibitors of ornithine decarboxylase. New deductions concerning the topography of the enzyme's active site. *J Med Chem.* 21(1):50-55.
- Bhakdi S., Trantum-Jensen J., Sziegoleit A. (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun.* 47(1):52-60.
- Bianchi L., Roy M.L., Taglialatela M., Lundgren D.W., Brown A.M., Ficker E. (1996) Regulation by spermine of native inward rectifier K⁺ channels in RBL-1 cells. *J Biol Chem.* 271(11):6114-6121.
- Birkholtz L.M., Wrenger C., Joubert F., Wells G.A., Walter R.D., Louw A.I. (2004) Parasite-specific inserts in the bifunctional S-adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase of *Plasmodium falciparum* modulate catalytic activities and domain interactions. *Biochem J.* 377(Pt2):439-448.
- Bishop E.O., Kimber S.J., Orchard D., Smith B.E. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 635:63-72
- Bitonti A.J., McCann P.P., Sjoerdsma A. (1987) *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*: effects of ornithine decarboxylase inhibitors on erythrocytic schizogony. *Exp. Parasitol.* 64:237-243.
- Bitonti A.J., Byers T.L., Bush T.L., Casara P.J., Bacchi C.J., Clarkson A.B. Jr, McCann P.P., Sjoerdsma A. (1990) Cure of *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections in mice with an irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(8):1485-1490.
- Bonnefoy S., Attal G., Langsley G., Tekaija F., Mercereau-Puijalon O. (1994) Molecular characterization of the heat shock protein 90 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 67(1):157-170.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Braun Breton C., Rosenberry T.L., Pereira da Silva L.H. (1990) Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens. *Res Immunol.* 141(8):743-755.
- Bray P.G., Hawley S.R., Ward S.A. (1996) 4-Aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of amodiaquine uptake. *Mol Pharmacol.* 50(6):1551-1558.

Brockman A., Price R.N., van Vugt M., Heppner D.G., Walsh D., Sookto P., Wimonwattawatee T., Looareesuwan S., White N.J., Nosten F. (2000) *Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94(5):537-544.

Brun R., Buhler Y., Sandmeier U., Kaminsky R., Bacchi C.J., Rattendi D., Lane S., Croft S.L., Snowdon D., Yardley V., Caravatti G., Frei J., Stanek J., Mett H. (1996) In vitro trypanocidal activities of new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:1442-1447.

Butler D. (1997) Time to put Malaria control on the global agenda. *Nature* 386:535-536

Byers T.L., Pegg A.E. (1989) Properties and physiological function of the polyamine transport system. *Am J Physiol.* 257(3 Pt 1):C545-553.

Byers T.L., Bush T.L., McCann P.P., Bitonti A.J. (1991) Antitrypanosomal effects of polyamine biosynthesis inhibitors correlate with increases in *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine. *Biochem. J.* 274:527-533.

Byers T.L., Ganem B., Pegg A.E. (1992) Cytostasis induced in L1210 murine leukaemia cells by the S-adenosyl-L-methionine decarboxylase inhibitor 5'-((Z)-4-amino-2-butenyl)methylamino)-5'-deoxyadenosine may be due to hypusine depletion. *Biochem J.* 287(Pt 3):717-724.

Bzik D.J., Li W.B., Horii T., Inselburg J. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(23):8360-8364.

Caboche M., Mulsant P. (1978) Selection and preliminary characterization of cycloleucine-resistant CHO cells affected in methionine metabolism. *Somatic Cell Genet.* 4(4):407-421.

Capitani G., Eliot A.C., Gut H., Khomutov R.M., Kirsch J.F., Grutter M.G. (2003) Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in complex with an amino-oxy analogue of the substrate: implications for substrate binding. *Biochim Biophys Acta.* 1647(1-2):55-60.

Chiang P.K., Cantoni G.L. (1977) Activation of methionine for transmethylase. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms. *J Biol Chem.* 252(13):4506-4513.

Chiang P.K., Gordon R.K., Tal J., Zeng G.C., Doctor B.P., Pardhasaradhi K., McCann P.P. (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10(4):471-480.

- Chiang P.K. (1998) Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther.* 77(2):115-134.
- Chiang P.K., Chamberlin M.E., Nicholson D., Soubes S., Su X., Subramanian G., Lanar D.E., Prigge S.T., Scovill J.P., Miller L.H., Chou J.Y. (1999) Molecular characterization of *Plasmodium falciparum* S-adenosylmethionine synthetase. *Biochem J.* 344(Pt 2):571-576.
- Childs A.C., Mehta D.J., Gerner E.W. (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 60(7):1394-1406.
- Chiu,S., Oleinick N.L. (1998) Radioprotection of cellular chromatin by the polyamines spermine and putrescine: preferential action against formation of DNA-protein crosslinks. *Radiat Res.* 149(6):543-549.
- Chou A.C., Fitch C.D. (1980) Hemolysis of mouse erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX and chloroquine. Chemotherapeutic implications. *J Clin Invest.* 66(4):856-858.
- Clos J., Brandau S. (1994) pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 5(2):133-137.
- Clyne T., Kinch L.N., Phillips M.A. (2002) Putrescine activation of *Trypanosoma cruzi* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochemistry.* 41(44):13207-13216.
- Cohen S.S. (1998) A guide to the Polyamines. Oxford University Press, Oxford.
- Cooper K.D., Shukla J.B., Rennert, O.M. (1976) Polyamine distribution in cellular compartments of blood and in aging erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 73(1):71-88.
- Corrales F.J., Perez-Mato I., Sanchez Del Pino M.M., Ruiz F., Castro C., Garcia-Trevijano E.R., Latasa U., Martinez-Chantar M.L., Martinez-Cruz A., Avila M.A., Mato J.M. (2002) Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr.* 132(8Suppl):2377S-2381S.
- Cowman, A.F., Morry, M.J., Biggs, B.A., Cross, G.A., Foote, S.J. (1988) Amino acid changes linked to the pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(32):9109-9113.
- Das B., Gupta R., Madhubala R. (1997) Combined action of inhibitors of S-adenosylmethionine decarboxylase with an antimalarial drug, chloroquine, on *Plasmodium falciparum*. *J Eukaryot Microbiol.* 44(1):12-17.

- Danzin C., Marchal P., Casara P. (1990) Irreversible inhibition of rat S-adenosylmethionine decarboxylase by 5'-[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino)-5'-deoxyadenosine. *Biochem Pharmacol.* 40(7):1499-1503.
- Day N.P., Hien T.T., Schollaardt T., Loc P.P., Chuong L.V., Chau T.T., Mai N.T., Phu N.H., Sinh D.X., White N.J., Ho M. (1999) The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 180(4):1288-1297
- de Dios A.C., Casabianca L.B., Kosar A., Roepe P.D. (2004) Structure of the amodiaquine-FPIX mu oxo dimer solution complex at atomic resolution. *Inorg Chem.* 43(25):8078-8084.
- Deigner H.P., Mato J.M., Pajares M.A. (1995) Study of the rat liver S-adenosylmethionine synthetase active site with 8-azido ATP. *Biochem J.* 308(Pt 2):565-571.
- del Pino M.M., Corrales F.J., Mato J.M. (2000) Hysteretic behavior of methionine adenosyltransferase III. Methionine switches between two conformations of the enzyme with different specific activity. *J Biol Chem.* 275(31):23476-23482.
- Desai S.A., Bezrukov S.M., Zimmerberg J. (2000) A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature.* 406(6799):1001-1005.
- Dhingra V., Vishweshvar Rao K., Lakshmi Narasu M. (2000) Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci.* 66(4):279-300.
- Dimock K., Stolfus C.M. (1978) Cycloleucine blocks 5'-terminal and internal methylations of avian sarcoma virus genome RNA. *Biochemistry.* 17(17):3627-3632.
- Doherty J.F., Sadiq A.D., Bayo L., Allouche A., Olliaro P., Milligan P., von Seidlein L., Pinder M. (1999) A randomized safety and tolerability trial of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine versus sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated malaria in Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93(5):543-546.
- Dorhout B., te Velde R.J., Ferwerda H., Kingma A.W., de Hoog E., Nuskiët F.A. (1995) In vivo growth inhibition of L1210 leukemia by 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A), a new inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Int J Cancer.* 61(2):214-217.
- Dorhout B., Odink M.F., de Hoog E., Kingma A.W., van der Veer E., Muskiët F.A. (1997) 4-Amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A) exerts in vitro growth inhibitory effects that are not related to S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMdc) inhibition. *Biochim Biophys Acta.* 1335(1-2):144-152.

Dorn A., Vippagunta S.R., Matile H., Jaquet C., Vennerstrom J.L., Ridley R.G. (1998) An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochem Pharmacol.* 55(6):727-736.

Dudley H.W., Rosenheim O., Starling W.W. (1927) The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base from animal tissues. *Biochem. J.* 21:97-103.

Egee S., Lapaix F., Decherf G., Staines H.M., Ellory J.C., Doerig C., Thomas S.L. (2002) A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol.* 542(Pt 3):795-801.

Eloranta T.O., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Hyvonen T. (1990) Aminooxy analogues of spermidine as inhibitors of spermine synthase and substrates of hepatic polyamine acetylating activity. *J Biochem (Tokyo).* 108(4):593-598.

Fairlamb A.H., Henderson G.B., Cerami A. (1986) The biosynthesis of thypanothione and N₁-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21:247-257.

Feuerstein B.G., Marton I.J. (1989) In: *The Physiology of Polyamines* (Bachrach, U. and Heimer, Y. M., eds), Vol. 1, pp. 109-124, CRC Press.

Finkel D., Groner Y. (1983) Methylations of adenosine residues (m6A) in pre-mRNA are important for formation of late simian virus 40 mRNAs. *Virology.* 131(2):409-425.

Finkelstein J.D. (1990) Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem.* 1(5):228-237.

Fitch C.D., Chevli R., Banyal H.S., Phillips G., Pfaller M.A., Krogstad D.J. (1982) Lysis of *Plasmodium falciparum* by ferriprotoporphyrin IX and a chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 21(5):819-822.

Fitch C.D., Chevli R., Kanjanangulpan P., Dutta P., Chevli K., Chou A.C. (1983) Intracellular ferriprotoporphyrin IX is a lytic agent. *Blood.* 62(6):1165-1168.

Fitch C.D. (2004) Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial action of quinoline drugs. *Life Sci.* 74(16):1957-1972.

Fong W.F., Heller J.S., Canellakis E.S. (1976) The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon the addition of putrescine to cell cultures. *Biochim Biophys Acta.* 428(2):456-465.

Footo S.J., Galatis D., Cowman A.F. (1990) Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(8):3014-3017.

Frederici B.A., Park H.W., Bideshi D.K., Wirth M.C., Johnson J.J. (2003) Recombinant bacteria for mosquito control. *J Exp Biol.* 2003 Nov; 206(Pt 21):3877-3885.

Fu Z., Hu Y., Markham G.D., Takusagawa F. (1996) Flexible loop in the structure of S-adenosylmethionine synthetase crystallized in the tetragonal modification. *J Biomol Struct Dyn.* 13(5):727-739.

Fukumoto G.H., Byus C.V. (1996) A kinetic characterization of putrescine and spermidine uptake and export in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1282(1):48-56.

Fukumoto G.H., Byus C.V. (1997) Putrescine export in *Xenopus laevis* oocytes occurs against a concentration gradient: evidence for a non-diffusional export process.

Biochim Biophys Acta. 1324(2):215-222.

Garcia-Fernandez A.J., Rodriguez R.A., Perez-Pertejo Y., Balana-Fouce R. (2005) Characterization of putrescine uptake in hamster amelanocytic melanoma AMEL-3 cells. *Mol Cells.* 20(1):127-135.

Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M.S., Nene V., Shallom S.J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Perteo M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M.W., Vaidya A.B., Martin D.M., Fairlamb A.H., Fraunholz M.J., Roos D.S., Ralph S.A., McFadden G.I., Cummings L.M., Subramanian G.M., Mungall C., Venter J.C., Carucci D.J., Hoffman S.L., Newbold C., Davis R.W., Fraser C.M., Barrell B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 419(6906):498-511.

Giesecke H., Barale J.C., Langsley G., Cornelissen A.W. (1991) The C-terminal domain of RNA polymerase II of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Biochem Biophys Res Commun.* 180(3):1350-1355.

Ginsburg H., Krugliak M., Eidelman O., Cabantchik Z.I. (1983) New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 8(2):177-190.

Go M.L., Liu M., Wilairat P., Rosenthal P.J., Saliba K.J., Kirk K. (2004) Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(9):3241-3245.

Goldberg B., Yarlett N., Sufrin J., Lloyd D., Bacchi C.J. (1997) A unique transporter of S-adenosylmethionine in African trypanosomes. *FASEB J.* 11(4):256-260.

- Gomes Trolin C., Ekblom J., Orelund L. (1998) Regulation of methionine adenosyltransferase catalytic activity and messenger RNA in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol.* 55(5):567-571.
- Grumont R., Washtien W.L., Caput D., Santi D.V. (1986) Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica*: sequence homology with the corresponding monofunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(15):5387-5391.
- Gupta M., Coffino P. (1985) Mouse ornithine decarboxylase complete amino acid sequence deduced from cDNA. *J. Biol. Chem.* 260:2941-2944.
- Hafner E.W., Tabor C.W., Tabor H. (1979) Mutants of *Escherichia coli* that do not contain 1,4-diaminobutane (putrescine) or spermidine. *J Biol Chem.* 254(24):12419-12426.
- Haider N., Eschbach M.L., de Souza Dias S., Gilberger T.W., Walter R.D., Lüersen, K. (2005) The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* 142(2):224-236.
- Halim A.B., LeGros L., Geller A., Kotb M. (1999) Expression and functional interaction of the catalytic and regulatory subunits of human methionine adenosyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem.* 274(42):29720-29725.
- Hasne M.P., Ullman B. (2005) Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 280(15):15188-15194.
- Hayashi S.I., Murakami Y., Matsufuji S. (1996) Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem Sci.* 21(1):27-30.
- Hayashi S.I. (1989) Multiple mechanisms for the regulation of mammalian ornithine decarboxylase. In: *Ornithine Decarboxylase: Biology, Enzymology and Molecular Genetics*, Hayashi, S.-I. (ed), Pergamon Press, New York; pp. 35-45.
- Hayashi S.I., Murakami Y. (1995) Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* 306:1-10.
- Haynes R.K. (2001) Artemisinin and derivatives: the future for malaria treatment? *Curr Opin Infect Dis.* 14(6):719-726.
- Heby O. (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19:1-20.

Heby O., Andersson G. (1980) Polyamines and the cell cycle. In: Polyamines in Biomedical Research, edited by J. M. Gaugas. New York: Wiley, 1980, pp. 17-34.

Heby O., Persson L. (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eucaryotic cells. Trends Biochem. Sci. 15:153-158.

Heby O., Marton L.J., Wilson C.B., Martinez H.M. (1982) Polyamine metabolism in a rat brain tumor cell line: its relationship to the growth rate. J. Cell. Physiol. 86:511-522.

Heller J.S., Fong W.F., Canellakis E.S. (1976) Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by end products of its reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 73:1858-1862.

Herrero A.B., Lopez M.C., Garcia S., Schmidt A., Spaltmann F., Ruiz-Herrera J., Dominguez A. (1999) Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamine levels. Infect Immun. 67(9):4870-4878.

Higgins C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol. 8:67-113.

Höllta E., Pohjanpelto P. (1982) Polyamine dependence of Chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity. Biochim. Biophys. Acta 721:321-327

Hoffman J.L., Kunz G.L. (1977) Differential activation of rat liver methionine adenosyltransferase isozymes by dimethylsulfoxide. Biochem Biophys Res Commun. 77(4):1231-1236.

Hong Y.L., Yang Y.Z., Meshnik S.R. (1994) The interaction of artemisinin with malarial hemozoin. Mol Biochem Parasitol. 63(1):121-128.

Hougaard D.M., Del Castillo A.M., Larsson L.I. (1987) Endogenous polyamines associate with DNA during its condensation in mammalian tissue. A fluorescence cytochemical and immunochemical study of polyamines in fetal rat liver. Eur. J. Cell Biol. 45:311-314.

Huber S.M., Uhlemann A.C., Gamper N.L., Duranton C., Kremsner P.G., Lang F. (2002) *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation. EMBO J. 21(1-2):22-30.

Hughes D.E., Shonekan O.A., Simpson L. (1989) Structure, genomic organization and transcription of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Crithidia fasciculata*. Mol Biochem Parasitol. 34(2):155-166.

Hyde J.E. (1989) Point mutations and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today. 5(8):252-255.

Hyde J.E. (1990) The dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmacol Ther.* 48(1):45-59.

Hyvonen T., Alakuijala L., Andersson L., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Eloranta T.O. (1988) 1-Aminoxy-3-aminopropane reversibly prevents the proliferation of cultured baby hamster kidney cells by interfering with polyamine synthesis. *J Biol Chem.* 263(23):11138-144.

Hyvonen T., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Lapinjoki S., Eloranta T.O. (1990) Uptake of 3H-labeled 1-aminoxy-3-aminopropane by baby hamster kidney cells. *J Biochem (Tokyo).* 107(6):817-820.

Igarashi K., Ito K., Kashiwagi K. (2001) Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 152(3-4):271-278.

Igarashi K., Kashiwagi K. (1999) Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J.* 344(Pt 3):633-642.

Isomaa V.V., Pajunen A.E., Bardin C.W., Janne O.A. (1983) Ornithine decarboxylase in mouse kidney. Purification, characterisation and radioimmunological determination of the enzyme protein. *J. Biol. Chem.* 258:6735-6740.

Ivanetich K.M., Santi D.V. (1990) Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *FASEB J.* 4(6):1591-1597.

Jänne J., Pösö H., Raina A. (1978) Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 473:241-293.

Jensen J.B., Trager W. (1977) *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol.* 63(5):883-886.

Jeon T.J., Jeon K.W. (2003) Characterization of sams genes of *Amoeba proteus* and the endosymbiotic X-bacteria. *J Eukaryot Microbiol.* 50(1):61-69.

Jimenez-Bremont J.F., Ruiz-Herrera J., Dominguez A. (2001) Disruption of gene YIODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 1(3):195-204.

Kahana C., Nathans D. (1985a) Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase by polyamines. *J. Biol. Chem.* 260:15390-15393.

Kahana C., Nathans D. (1985b) Nucleotide sequence of murine decarboxylase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82:1673-1677.

- Kaiser A., Gottwald A., Wiersch C., Lindenthal B., Maier W., Seitz H.M. (2001) Effect of drugs inhibiting spermidine biosynthesis and metabolism on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res. 87(11):963-972.
- Kajander E.O., Harvima R.J., Kauppinen L., Akerman K.K., Martikainen H., Pajula R.L., Karenlampi S.O. (1990) Effects of selenomethionine on cell growth and on S-adenosylmethionine metabolism in cultured malignant cells. Biochem J. 267(3):767-774.
- Kajander E.O., Harvima R.J., Eloranta T.O., Martikainen H., Kantola M., Karenlampi S.O., Akerman K. (1991) Metabolism, cellular actions, and cytotoxicity of selenomethionine in cultured cells. Biol Trace Elem Res. 28(1):57-68.
- Kameji T., Pegg A.E. (1987a) Inhibition of translation of mRNAs for ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase by polyamines. J. Biol. Chem. 262:2427-2430.
- Kameji T., Pegg A.E. (1987b) Effect of putrescine on the synthesis of S-adenosylmethionine decarboxylase. Biochem. J. 243:285-288.
- Kanaani J., Ginsburg H. (1989) Metabolic interconnection between the human malarial parasite *Plasmodium falciparum* and its host erythrocyte. Regulation of ATP levels by means of an adenylate translocator and adenylate kinase. J Biol Chem. 264(6):3194-3199.
- Kashiwagi K., Kobayashi H., Igarashi K. (1986) Apparently unidirectional polyamine transport by proton motive force in polyamine-deficient *Escherichia coli*. J Bacteriol. 165(3):972-977.
- Kashiwagi K., Taneja S.K., Liu T., Tabor C.W., Tabor H. (1990) Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosynthesis and processing of a proenzyme form of S-adenosylmethionine decarboxylase. J Biol. Chem. 265:22321-22328.
- Kashiwagi K., Miyamoto S., Suzuki F., Kobayashi H., Igarashi K. (1992) Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the potE gene of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(10):4529-4533.
- Kashiwagi K., Kuraishi A., Tomitori H., Igarashi A., Nishimura K., Shirahata A., Igarashi K. (2000) Identification of the putrescine recognition site on polyamine transport protein PotE. J Biol Chem. 275(46):36007-36012.
- Kemp D.J., Coppel R.L., Anders R.F. (1987) Repetitive proteins and genes of malaria. Annu Rev Microbiol. 41:181-208.

Kern P., Hemmer C.J., Gallati H., Neifer S., Kreamsner P., Dietrich M., Porszolt F. (1992) Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria. *J Infect Dis.* 166(4):930-934.

Kern A.D., Oliveira M.A., Coffino P., Hackert M.L. (1999) Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure Fold Des.* 7(5):567-581.

Khomutov R.M., Hyvonen T., Karvonen E., Kauppinen L., Paalanen T., Paulin L., Eloranta T., Pajula R.L., Andersson L.C., Poso H. (1985a) 1-Aminooxy-3-aminopropane, a new and potent inhibitor of polyamine biosynthesis that inhibits ornithine decarboxylase, adenosylmethionine decarboxylase and spermidine synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 130(2):596-602.

Khomutov R.M., Denisova G.F., Khomutov A.R., Belostotskaia K.M., Shlosman R.B. (1985b) Aminooxypropylamine-an effective inhibitor of ornithine decarboxylase in vitro and in vivo. *Bioorg Khim.* 11(11):1574-1576.

Kim S., Galletti P., Paik W.K. (1980) In vivo carboxyl methylation of human erythrocyte membrane proteins. *J Biol Chem.* 255(2):338-341.

Klayman D.L. (1985) Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science.* 228(4703):1049-1055.

Kotb M., Kredich N.M. (1985) S-Adenosylmethionine synthetase from human lymphocytes. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 260(7):3923-3930.

Kotb M., Geller A.M. (1993) Methionine adenosyltransferase: structure and function. *Pharmacol Ther.* 59(2):125-143.

Kotb M., Mudd S.H., Mato J.M., Geller A.M., Kredich N.M., Chou J.Y., Cantoni G.L. (1997) Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet.* 13(2):51-52.

Kramer D.L., Sufrin J.R., Porter C.W. (1988) Modulation of polyamine-biosynthetic activity by S-adenosylmethionine depletion. *Biochem J.* 249(2):581-586.

Kramer D.L., Khomutov R.M., Bukin Y.V., Khomutov A.R., Porter C.W. (1989) Cellular characterization of a new irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase and its use in determining the relative abilities of individual polyamines to sustain growth and variability of L1210 cells. *Biochem J.* 259(2):325-331.

- Krause T., Lüersen K., Wrenger C., Gilberger T.W., Müller S., Walter R.D. (2000) The ornithine decarboxylase domain of the bifunctional ornithine decarboxylase/S-adenosylmethionine decarboxylase of *Plasmodium falciparum*: recombinant expression and catalytic properties of two different constructs. *Biochem. J.* 352:287-292.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- Lang W. (1993) *Tropenmedizin in Klinik und Praxis.* Thieme Verlag, 1. Auflage 1993.
- Larsen T.M., Laughlin L.T., Holden H.M., Rayment I., Reed G.H. (1994) Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn^{2+} , K^+ , and pyruvate. *Biochemistry.* 33(20):6301-6309.
- Laughton C.A., Tanious F., Nunn C.M., Boykin D.W., Wilson W.D., Neidle S. (1996) A crystallographic and spectroscopic study of the complex between d(CGCGAATTCGCG)₂ and 2,5-bis(4-guanylphenyl)-furan, an analogue of berenil. Structural origins of enhanced DNA-binding affinity. *Biochemistry.* 35(18):5655-5661.
- Lavrador K., Allart B., Guillerm D., Guillerm G. (1998) A new series of S-adenosyl-L-methionine synthetase inhibitors. *J Enzyme Inhib.* 13(5):361-367.
- Law G.L., Raney A., Heusner C., Morris D.R. (2001) Polyamine regulation of ribosome pausing at the upstream open reading frame of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem.* 276(41):38036-38043.
- LeBras J. (1999) Mechanisms and dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Bull Soc Pathol Exot.* 92(4):236-241.
- LeBras J., Durand R. (2003) The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol.* 17(2):147-153.
- Lee C.C., Surtees R., Duchon L.W. (1992) Distal motor axonopathy and central nervous system myelin vacuolation caused by cycloleucine, an inhibitor of methionine adenosyltransferase. *Brain.* 115 (Pt 3):935-955.
- Lee M.M., Lee S.H., Park K.Y. (1997) Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol Biol.* 34(3):371-382.
- Lee J.H., Chae H.S., Lee J.H., Hwang B., Hahn K.W., Kang B.G., Kim W.T. (1997) Structure and expression of two cDNAs encoding S-adenosyl-L-methionine synthetase of rice (*Oryza sativa L.*). *Biochim Biophys Acta.* 1354(1):13-18.

Leed A., DuBay K., Ursos L.M., Sears D., De Dios A.C., Roepe P.D. (2002) Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. *Biochemistry*. 41(32):10245-10255.

LeGros H.L.Jr, Halim A.B., Geller A.M., Kotb M. (2000) Cloning, expression, and functional characterization of the beta regulatory subunit of human methionine adenosyltransferase (MAT II). *J Biol Chem*. 275(4):2359-2366.

Liappis N. (1972) Geschlechtsspezifische Unterschiede der freien Aminosäuren im Serum von Erwachsenen. *Z. Klin. Chem. Klein. Biochem*. 10:132-135.

Liau M.C., Lin G.W., Hurlbert R.B. (1977) Partial purification and characterization of tumor and liver S-adenosylmethionine synthetases. *Cancer Res*. 37(2):427-435.

Liau M.C., Chang C.F., Belanger L., Grenier A. (1979) Correlation of isozyme patterns of S-adenosylmethionine synthetase with fetal stages and pathological states of the liver. *Cancer Res*. 39(1):162-169.

Libby P.R. (1978) Calf liver nuclear N-acetyltransferases. Purification and properties of two enzymes with both spermidine acetyltransferase and histone acetyltransferase activities. *J Biol Chem*. 253(1):233-237.

Lombardini J.B., Talalay P. (1973) Effect of inhibitors of adenosine triphosphate: L-methionine S-adenosyltransferase on levels of S-adenosyl-L-methionine and L-methionine in normal and malignant mammalian tissues. *Mol Pharmacol*. 9(4):542-560.

Lombardini J.B., Sufrin J.R. (1983) Chemotherapeutic potential of methionine analogue inhibitors of tumor-derived methionine adenosyltransferases. *Biochem Pharmacol*. 32(3):489-495.

Löwkvist B., Oredsson S.M., Holm I., Emanuelsson H., Heby O. (1987) Inhibition of polyamine synthesis reduces the growth rate and delays the expression of differential phenotypes in primary cultures of embryonic mesoderm from chick. *Cell Tissue Res*. 249:151-160.

Lu Z.J., Markham G.D. (2002) Enzymatic properties of S-adenosylmethionine synthetase from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem*. 277(19):16624-16631.

Lucius R., Loos-Frank B. (1997) Parasitologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Lüersen K., Walter R.D., Müller S. (1999) The putative gamma-glutamylcysteine synthetase from *Plasmodium falciparum* contains large insertions and a variable tandem repeat. *Mol Biochem Parasitol*. 98(1):131-142.

Maitland K., Marsh K. (2004) Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Trop*. 90(2):131-140.

Makarov V.L., Smirnov I., Dimitrov S.I. (1987). Higher order folding of chromatine is induced in different ways by monovalent and by bivalent cations. FEBS Lett. 212:263-266.

Mamont P.S., Duchesne M.C., Grove J., Bey P. (1978) Anti-proliferative properties of DL-alpha-difluoromethyl ornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. Biochem Biophys Res Commun. 81(1):58-66

Manni A., Badger B., Wechter R., Kunselman S., Rossini A., Demers L. (1995) Biochemical and growth-modulatory effects of the new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor CGP 48664 in malignant and immortalized normal human breast epithelial cells in culture. Int J Cancer. 62(4):485-491.

Markham G.D., Hafner E.W., Tabor C.W., Tabor H. (1980) S-Adenosylmethionine synthetase from *Escherichia coli*. J Biol Chem. 255(19):9082-92.

Markham G.D. (1981) Spatial proximity of two divalent metal ions at the active site of S-adenosylmethionine synthetase. J Biol Chem. 256(4):1903-1909.

Markham G.D. (1984) Structure of the divalent metal ion activator binding site of S-adenosylmethionine synthetase studied by vanadyl(IV) electron paramagnetic resonance. Biochemistry. 23(3):470-478.

Markham G.D. (1986) Characterization of the monovalent cation activator binding site of S-adenosylmethionine synthetase by 205TI NMR of enzyme-bound TI+. J Biol Chem. 261(4):1507-1509.

Marton L.J., Morris D.R. (1987) Molecular and cellular functions of the polyamines. In: Inhibition of polyamine metabolism, biological significance and basis for new therapies. McCann P.P., Pegg A.E. und Sjoerdsma A., (Hrsg.) Academic Press, San Diego, 79-105.

Marton, L. J., Pegg, A. E. (1995) Polyamines as targets for the therapeutic intervention. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35, 55-91.

Mathur M., Sharma N., Sachar R.C. (1993) Differential regulation of S-adenosylmethionine synthetase isozymes by gibberellic acid in dwarf pea epicotyls. Biochim Biophys Acta. 1162(3):283-290.

Mato J.M., Corrales F., Martin-Duce A., Ortiz P., Pajares M.A., Cabrero C. (1990) Mechanisms and consequences of the impaired trans-sulphuration pathway in liver disease: Part I. Biochemical implications. Drugs. 40 Suppl 3:58-64.

Mato J.M., Corrales F.J., Lu S.C., Avila M.A. (2002) S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. FASEB J. 16(1):15-26.

McCann P.P. (1980) Regulation of ornithine decarboxylase in eukaryotes. In: Polyamines in Biomedical Research, edited by J. M. Gaugas. New York: Wiley, 1980, 109-124

McCann P.P., Bitonti A.J., Bacchi C.J., Clarkson A. (1987) Use of difluoromethylornithine (DFMO, eflornithine) for late-stage African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81(4):701-702.

McCann P.P., Pegg A.E., Sjoerdsma A. (eds). Inhibition of polyamine metabolism: Biological significance and basis for new therapies. Academic Press, New York.

McQueney M.S., Markham G.D. (1995) Investigation of monovalent cation activation of S-adenosyl-methionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition. *J Biol Chem.* 270(31):18277-18284.

Meshnick S.R., Taylor T.E., Kamchonwongpaisan S. (1996) Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev.* 60(2):301-315.

Metcalf B.W., Bey P., Danzin C., Jung M.J., Casara P., Vevert J.P. (1978) Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *J. Am Chem. Soc.* 100:2551-2553.

Miller L.H., Good M.F., Milon G (1994) Malaria Pathogenesis. *Science.* 264:1878-1883

Millward M.J., Joshua A., Kefford R., Aamdal S., Thomson D., Hersey P., Toner G., Lynch K. (2005) Multi-centre Phase II trial of the polyamine synthesis inhibitor SAM486A (CGP48664) in patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs.* 23(3):253-256.

Milovica V., Turchanowa L., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Caspary W.F., Stein J. (2001) Hydroxylamine-containing inhibitors of polyamine biosynthesis and impairment of colon cancer cell growth. *Biochem Pharmacol.* 61(2):199-206.

Mitsui K., Teraoka H., Tsukada K. (1988) Complete purification and immunochemical analysis of S-adenosylmethionine synthetase from bovine brain. *J Biol Chem.* 263(23):11211-11216.

Mittal P.K. (2003) Bolarvicides in vector control: challenges and prospects. *J vector borne dis.* 40(1-2):20-32

Molitor I.M., Knobel S., Dang C., Spielmann T., Allera A., Konig G.M. (2004) Translation initiation factor eIF-5A from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 137(1):65-74.

Moon-Woody A.Y., Eaton S.S., Osumi-Davis P.A., Woody R.W. (1996) Asp537 and Asp812 in bacteriophage T7 RNA polymerase as metal ion-binding sites studied by EPR, flow-dialysis, and transcription. *Biochemistry.* 35(1):144-152.

Morgan D.M. (1990) Polyamine uptake by human vascular endothelial cells. *Biochem Soc Trans.* 18(6):1221-1222.

Morgan J.E., Blankenship J.W., Matthews H.R. (1987) Polyamines and acetylpolyamines increase the stability and alter the conformation of nucleosome core particle. *Biochemistry.* 26 :3646-3649.

Moulinoux J.P., Le Calve M., Quemener V., Quash G. (1984) In vitro studies on the entry of polyamines into normal red blood cells. *Biochimie.* 66(5):385-393.

Mudd S.H., Cantoni G.L. (1958) Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of Bakers' yeast. *J Biol Chem.* 231(1):481-492.

Mudd S.H. (1963) Activation of methionine for transmethylation. VI. Enzyme-bound tripolyphosphate as an intermediate in the reaction catalyzed by the methionine-activating enzyme of Baker's yeast. *J Biol Chem.* 238:2156-2163.

Mukhopadhyay R., Kapoor P., Madhubala R. (1996) Antileishmanial effect of a potent S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor: CGP 40215A. *Pharmacol. Res.* 33:67-70.

Müller I.B., Walter R.D., Wrenger C. (2005) Structural metal dependency of the arginase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem.* 386(2):117-126.

Müller S., Da'dara K., Lüersen K., Wrenger C., Das Gupta R., Madhubala R., Walter, R.D. (2000) In the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Bio. Chem.* 275: 8097-8102.

Nasizadeh S., Jeppsson A., Persson L. (2003) Proteasomal degradation of a trypanosomal ornithine decarboxylase. *Cell Physiol Biochem.* 13(5):321-328.

Ndong J.M., Atteke C., Aubouy A., Bakary M., Lebibi J., Deloron P. (2003) In vitro activity of chloroquine, quinine, mefloquine, and halofantrine against Gabonese isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trop Med Int Health.* 8(1):25-29.

Newton P., White N. (1999) Malaria: new developments in treatment and prevention. *Annu Rev Med.* 50:179-192.

Niemann G., von Besser H., Walter R.D. (1996) Panagrellus redivivus ornithine decarboxylase: structure of the gene, expression in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein. *Biochem J.* 317(Pt 1):135-140.

Ober D., Hartmann T. (1999) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(26):14777-14782.

Oden K.L., Clarke S. (1983) S-adenosyl-L-methionine synthetase from human erythrocytes: role in the regulation of cellular S-adenosylmethionine levels. *Biochemistry*. 22(12):2978-2986.

Okada G., Teraoka H., Tsukada K. (1981) Multiple species of mammalian S-adenosylmethionine synthetase. Partial purification and characterization. *Biochemistry*. 20(4):934-940.

Olliaro P.L., Goldberg D.E. (1995) The plasmodium digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitol Today*. 11(8):294-297.

Olmo M.T., Rodriguez-Agudo D., Medina M.A., Sanchez-Jimenez F. (1999) The pest regions containing C-termini of mammalian ornithine decarboxylase and histidine decarboxylase play different roles in protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 257(2):269-272.

Olmo M.T., Urdiales J.L., Pegg A.E., Medina M.A., Sanchez-Jimenez F. (2000) In vitro study of proteolytic degradation of rat histidine decarboxylase. *Eur J Biochem*. 267(5):1527-1531.

O'Neill P.M., Bray P.G., Hawley S.R., Ward, S. A., Park, B. K. (1998) 4-Aminoquinolines-past, present and future: a chemical perspective. *Pharmacol Ther*. 77(1):29-58.

Ouameur A.A., Tajmir-Riahi H.A. (2004) Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. *J Biol Chem*. 279(40):42041-42054.

Oza S.L., Ariyanayagam M.R., Aitcheson N., Fairlamb A.H. (2003) Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 131(1):25-33.

Pajares M.A., Duran C., Corrales F., Pliego M.M., Mato J.M. (1992) Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *J Biol Chem*. 267(25):17598-17605.

Paridaens R., Uges D.R., Barbet N., Choi L., Seeghers M., van der Graaf W.T., Groen H.J., Dumez H., Buuren I.V., Muskiet F., Capdeville R., Oosterom A.T., de Vries E.G. (2000) A phase I study of a new polyamine biosynthesis inhibitor, SAM486A, in cancer patients with solid tumours. *Br J Cancer*. 83(5):594-601.

Pastorian K.E., Byus C.V. (1997) Tolerance to putrescine toxicity in Chinese hamster ovary cells is associated with altered uptake and export. *Exp Cell Res*. 231(2):284-295.

- Paulin L. (1986) The effects of 1-aminooxy-3-aminopropane and S-(5'-deoxy-5'-adenosyl)-methylthioethylhydroxylamine on ornithine decarboxylase and S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 202(2):323-326.
- Payne D. (1987) Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today. 3(8):241-246.
- Pegg A.E., Williams-Ashman H.G. (1968) Biosynthesis of putrescine in the prostate gland of the rat. Biochem. J. 108:533-539.
- Pegg A.E., Williams-Ashman H.G. (1981) Biosynthesis of putrescine. In: Polyamines in Biology and Medicine, edited by D. R. Morris and L. J. Marton. New York: Dekker, 1981, pp. 3-42.
- Pegg A.E., Hibasami H., Matsui I., Bethell D.R. (1981) Formation and interconversion of putrescine and spermidine in mammalian cells. Adv. Enzyme Reg. 19:427-451.
- Pegg A.E., McCann P.P. (1982) Polyamine metabolism and function. Am. J. Physiol. 243:C212-C221.
- Pegg A.E. (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. Biochem J. 234(2):249-262.
- Pegg A.E., Wechter R., Pajunen A. (1987) Increase in S-adenosylmethionine decarboxylase in SV-3T3 cells treated with S-methyl-5'-methylthioadenosine. Biochem. J. 244(1):49-54.
- Pegg A.E. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. Cancer Res. 48(4):759-774.
- Pegg A.E., Kameji T., Shirata A., Stanley B., Madhubala R., Pajunen A. (1988) Regulation of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase. Adv. Enzyme Regul. 27:43-55.
- Pegg A.E., Jones D.B., Secrist J.A. 3rd. (1988) Effect of inhibitors of S-adenosylmethionine decarboxylase on polyamine content and growth of L1210 cells. Biochemistry. 27(5):1408-1415.
- Pegg A.E., Wechter R., Pakala R., Bergeron R.J. (1989) Effect of N1,N12-bis(ethyl)spermine and related compounds on growth and polyamine acetylation, content, and excretion in human colon tumor cells. J Biol Chem. 264(20):11744-11749.
- Pegg A.E., Pakala R., Bergeron R.J. (1990) Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity in Chinese-hamster ovary cells by N1,N11-bis(ethyl)norspermine (corrected) and related compounds. Biochem J. 267(2):331-338.

- Perez-Pertejo Y., Reguera R.M., Villa H., Garcia-Estrada C., Balana-Fouce R., Pajares M.A., Ordonez D. (2003) *Leishmania donovani* methionine adenosyltransferase. Role of cysteine residues in the recombinant enzyme. *Eur J Biochem.* 270(1):28-35.
- Perryman M.B., Kerner S.A., Bohlmeier T.J., Roberts R. (1986) Isolation and sequence analysis of a full-length cDNA for human M creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 140(3):981-989.
- Persson L., Pegg A.E. (1984) Studies of the induction of spermidine/spermine N₁-acetyltransferase using a specific antiserum. *J. Biol. Chem.* 259, 12364-12367.
- Persson L., Holm I., Stjernborg L., Heby O. (1988) Regulation of polyamine synthesis in mammalian cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 250:261-271.
- Persson L., Khomutov A.R., Khomutov R.M. (1989) Feedback regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase synthesis. *Biochem J.* 257(3):929-931.
- Peterson D.S., Walliker D., Wellems T.E. (1988) Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(23):9114-9118.
- Peterson D.S., Milhous W.K., Wellems T.E. (1990) Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(8):3018-3022.
- Piacentini M., Martinet N., Beninati S., Folk J. E. (1988) Free and protein-conjugated polyamines in mouse epidermal cells. Effect of high calcium and retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 263:3790-3794.
- Piacentini M., Farrace M.G., Imperato M., Piredda L., Autuori F. (1990) Polyamine-dependent post-translational modification of proteins in differentiating mouse epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* 94:694-699.
- Pizzi E., Frontali C. (2001) Low-complexity regions in *Plasmodium falciparum* proteins. *Genome Res.* 11(2):218-229.
- Pless M., Belhdj K., Menssen H.D., Kern W., Coiffier B., Wolf J., Herrmann R., Thiel E., Bootle D., Sklenar I., Muller C., Choi L., Porter C., Capdeville R. (2004) Clinical efficacy, tolerability, and safety of SAM 486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter study. *Clin. Cancer Res.* 10:1299-1305.
- Pohjanpelto P. (1976) Putrescine transport is greatly increased in human fibroblasts initiated to proliferate. *J Cell Biol.* 68(3):512-520.

- Pohjanpelto P., Virtanen I., Höllta E. (1981) Polyamine starvation causes disappearance of actin filaments and microtubules in polyamine-auxotrophic CHO cells. *Nature London* 293:475-476.
- Porter C.W., Sufrin J.R., Keith D.D. (1984) Growth inhibition by methionine analog inhibitors of S-adenosylmethionine biosynthesis in the absence of polyamine depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 122(1):350-357.
- Porter C.W., Sufrin J.R. (1986) Interference with polyamine biosynthesis and/or function by analogs of polyamines or methionine as a potential anticancer chemotherapeutic strategy. *Anticancer Res.* 6(4):525-542.
- Price R.N., Nosten F., Luxemburger C., ter Kuile F.O., Phaipun L., Chongsuphajaisiddhi T., White N.J. (1996) Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet.* 347(9016):1654-1658.
- Price R.N., Nosten F., Luxemburger C., van Vugt M., Phaipun L., Chongsuphajaisiddhi T., White N.J. (1997) Artesunate/mefloquine treatment of multi-drug resistant *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 91(5):574-577.
- Price R.N., Luxemburger C., van Vugt M., Nosten F., Kham A., Simpson J., Looareesuwan S., Chongsuphajaisiddhi T., White N.J. (1998) Artesunate and mefloquine in the treatment of uncomplicated multidrug-resistant hyperparasitaemic falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92(2):207-211.
- Rahiala E.L., Kekomaki M., Janne J., Raina A., Raiha N.C. (1971) Inhibition of pyridoxal enzymes by L-canaline. *Biochim Biophys Acta.* 227(2):337-343.
- Rathaur S., Walter R.D. (1987) *Plasmodium falciparum*: S-adenosyl-L-methionine decarboxylase. *Exp Parasitol.* 63(2):227-232.
- Rechsteiner M., Rogers S., Rote K. (1987) Protein structure and intracellular stability. *TIBS* 12:390-394.
- Reczkowski R.S., Markham G.D. (1999) Slow binding inhibition of S-adenosylmethionine synthetase by imidophosphate analogues of an intermediate and product. *Biochemistry.* 38(28):9063-9068.
- Reeder J.C., Brown G.V. (1996) Antigenic variation and immune evasion in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Cell Biol.* 74(6):546-554.
- Regenass U., Caravatti G., Mett H., Stanek J., Schneider P., Muller M., Matter A., Vertino P., Porter C.W. (1992) New S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors with potent antitumor activity. *Cancer Res.* 52(17):4712-4718.

- Regenass U., Mett H., Stanek J., Mueller M., Kramer D., Porter C.W. (1994) CGP 48664A, a new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor with broad spectrum antiproliferative and antitumor activity. *Cancer Res.* 52:3210-3217.
- Reguera R.M., Balana-Fouce R., Perez-Pertejo Y., Fernandez F.J., Garcia-Estrada C., Cubria J.C., Ordonez C., Ordonez D. (2002) Cloning expression and characterization of methionine adenosyltransferase in *Leishmania infantum* promastigotes. *J Biol Chem.* 277(5):3158-3167.
- Rinehart C.A. Jr, Chen K.Y. (1984) Characterization of the polyamine transport system in mouse neuroblastoma cells. Effects of sodium and system A amino acids. *J Biol Chem.* 259(8):4750-4756.
- Ringwald P., Bickii J., Basco L.K. (1996) In vitro activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg.* 55(3):254-258.
- Rogers S., Wells R., Rechsteiner M (1986) Aminoacid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 234:364-368.
- Rosenheim O. (1924) The isolation of spermine phosphate from semen and testis. *Biochem. J.* 1259-1263.
- Rouillon A., Surdin-Kerjan Y., Thomas D. (1999) Transport of sulfonium compounds. Characterization of the s-adenosylmethionine and s-methylmethionine permeases from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 274(40):28096-28105.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732):1350-1354.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sanchez C.P., McLean J.E., Rohrbach P., Fidock D.A., Stein W.D., Lanzer M. (2005) Evidence for a pfCRT-associated chloroquine efflux system in the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry.* 44(29):9862-9870.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-5467.
- Sarhan S., Seiler N. (1989) On the subcellular localization of the polyamines. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370:1279-1284.

Satishchandran C., Taylor J.C., Markham G.D. (1993) Isozymes of S-adenosylmethionine synthetase are encoded by tandemly duplicated genes in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 9(4):835-846.

Schalk-Hihi C., Markham G.D. (1999) The conformations of a substrate and a product bound to the active site of S-adenosylmethionine synthetase. Biochemistry. 38(8):2542-2550.

Schofield L. (1991) On the function of repetitive domains in protein antigens of Plasmodium and other eukaryotic parasites. Parasitol Today. 7(5):99-105.

Schuber F. (1989) Influence of polyamines on membrane functions. Biochem. J. 260:1-10.

Schröder G., Eichel J., Breinig S., Schröder J.. (1997) Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetases from *Catharanthus roseus*: molecular and functional characterization. Plant Mol Biol. 33(2):211-222.

Seely J.E., Pegg A.E. (1983) Changes in mouse kidney ornithine decarboxylase activity are brought about by changes in the amount of enzyme protein as measured by radioimmunoassay. J. Biol. Chem. 258:2496-2500.

Seely J.E., Pösö H., Pegg A.E. (1982) Effect of androgens on turnover of ornithine decarboxylase in mouse kidneys. Studies using labeling of the enzyme by reaction with [¹⁴C] α-Difluoromethylornithine. J. Biol. Chem. 257:7549-7553.

Seiler N., Knödgen B. (1978) Determination of di- and polyamines by high-performance liquid chromatographic separation of their 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl derivatives. J Chromatogr. 145(1):29-39.

Seiler N., Bolkenius F.N., Knödgen B. (1981) The determination of N₁-acetylspermine in mouse liver. Biochim. Biophys. Acta 633:181-190.

Seiler N. (1987) Functions of polyamine acetylation. Can. J. Physiol. Pharmacol. 65:2024-2035.

Seiler N., Heby O. (1988) Regulation of cellular polyamines in mammals. Acta Biochim Biophys. Hung. 23:1-36.

Seiler N. (1990) Polyamine metabolism. Digestion 46:319-330.

Seiler N. (1994) Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. In: Neuropharmacology of polyamines. Academic Press, Orlando, San Diego, New York, pp. 1-36.

Seiler N. (2003) Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Curr. Drug Targets* 4:537-564.

Seiler N. (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids*. 26(3):217-33.

Seppanen P., Alhonen-Hongisto L., Janne J. (1996) Polyamine deprivation-induced enhanced uptake of methylglyoxal bis(guanylhydrazone) by tumor cells. *Biochemistry*. 35(18):5655-5661.

Shantz L.M., Stanley B.A., Secrist J.A. III, Pegg A.E. (1992) Purification of human S-adenosylmethionine decarboxylase expressed in *Escherichia coli* and use of this protein to investigate the mechanism of inhibition by the irreversible inhibitors, 5'-deoxy-5'-[(3-hydrazinopropyl)methylamino]adenosine and 5'-[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino-5'-deoxy-adenosine. *Biochemistry*. 31(29):6848-6855.

Shantz L.M., Pegg A.E. (1999) Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 31(1):107-122.

Siimes M., Seppanen P., Alhonen-Hongisto L., Janne J. (1981) Synergistic action of two polyamine antimetabolites leads to a rapid therapeutic response in childhood leukemia. *Int J Cancer*. 28(5):567-570.

Singh S., Puri S.K., Singh S.K., Srivastava R., Gupta C., Pandey V.C. (1997) Characterization of simian malarial parasite (*Plasmodium knowlesi*)-induced putrescine transport in rhesus monkey erythrocytes. *J. Biol. Chem*. 272:13506-13511.

Sjoerdsma A., Schechter P.J. (1984) Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis inhibition. *Clin Pharmacol Ther*. 35(3):287-300.

Sjoerdsma A., Golden J.A., Schechter P.J., Barlow J.L., Santi D.V. (1984) Successful treatment of lethal protozoal infections with the ornithine decarboxylase inhibitor, alpha-difluoromethylornithine. *Trans Assoc Am Physicians*. 97:70-79.

Slapeta J., Stejskal F., Keithly J.S. (2003) Characterization of S-adenosylmethionine synthetase in *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiol Lett*. 225(2):271-277.

Slater A.F. (1993) Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*. 57(2-3):203-235.

Slocum R.D., Kaur-Swahney R., Galston A. (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys*. 235:283-303.

Smith T.A. (1985) Polyamines. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 36:117-143.

Snewin V.A., England S.M., Sims P.F., Hyde J.E. (1989) Characterisation of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamin. *Gene.* 76(1):41-52.

Stanek J., Frei J., Mett H., Schneider P., Regenass U. (1992) 2-substituted 3-(aminoxy)-propanamines as inhibitors of ornithine decarboxylase: synthesis and biological activity. *J Med Chem.* 35(8):1339-1344.

Stanek J., Caravatti G., Capraro HG, Furet P, Mett H, Schneider P, Regenass U. (1993) S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors: new aryl and heteroaryl analogues of methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *J Med Chem.* 36(1):46-54.

Stanek J., Caravatti G., Frei J., Furet P., Mett H., Schneider P., Regenass U. (1993) 4-Amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone: a new potent and selective inhibitor of S-Adenosylmethionine decarboxylase. *J Med Chem.* 36(15):2168-2171.

Stanley B.A., Pegg A.E., Holm I. (1989) Site of pyruvate formation and processing of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme. *J Biol Chem.* 264(35):21073-21079.

Steglich C., Scheffler I.E. (1981) An ornithine decarboxylase-deficient mutant of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 257:4603-4609.

Sternowsky H.J., Raiha N.C., Gaull G. (1976) Methionine adenosyltransferase and transmethylation in fetal and neonatal lung of the human, monkey, and rabbit. *Pediatr Res.* 10(5):545-550.

Stjernborg L., Heby O., Mamont P., Persson L. (1993) Polyamine-mediated regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase expression in mammalian cells. Studies using 5'-((Z)-4-amino-2-butenyl)-methylamino)-5'-deoxyadenosine, a suicide inhibitor of the enzyme. *Eur J Biochem.* 214(3):671-676.

Storch V., Welsch U. (1991) *Systematische Zoologie.* 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York

Sträter N., Klabunde T., Tucker P., Witzel H., Krebs B. (1995) Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science* 268(5216):1489-1492.

Suelter C.H. (1970) Enzymes activated by monovalent cations. *Science.* 168(933):789-795.

Sufrin J.R., Lombardini J.B. (1982) Differences in the active-site region of tumor versus normal isozymes of mammalian ATP:L-methionine S-adenosyltransferase. *Mol Pharmacol.* 22(3):752-759.

Sufrin J.R., Lombardini J.B., Alks V. (1993) Differential kinetic properties of L-2-amino-4-methylthio-cis-but-3-enoic acid, a methionine analog inhibitor of S-adenosylmethionine synthetase. *Biochim Biophys Acta.* 1202(1):87-91.

Sullivan D.M., Hoffman J.L. (1983) Fractionation and kinetic properties of rat liver and kidney methionine adenosyltransferase isozymes. *Biochemistry.* 22(7):1636-1641.

Suma Y., Shimizu K., Tsukada K. (1986) Isozymes of S-adenosylmethionine synthetase from rat liver: isolation and characterization. *J Biochem (Tokyo).* 100(1):67-75.

Svensson F., Mett H., Persson L. (1997) CGP 48664, a potent and specific S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor: effects on regulation and stability of the enzyme. *Biochem J.* 322(Pt 1):297-302.

Tabor C.W., Rosenthal S. M. (1956) Pharmacology of spermine and spermidine; some effects on animals and bacteria. *J Pharmacol Exp Ther.* 116 (2):139-155.

Tabor C.W., Tabor H. (1966) Transport systems for 1,4-diaminobutane, spermidine, and spermine in *Escherichia coli*. : *J Biol Chem.* 241(16):3714-3723.

Tabor H., Tabor C.W. (1969) Formation of 1,4-diaminobutane and of spermidine by an ornithine auxotrophe of *Escherichia coli* grown on limiting ornithine or arginine. *J. Biol. Chem.* 244, 2286-2292.

Tabor C.W., Tabor H. (1976) 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Annu. Rev. Biochem.* 45:285-306.

Tabor C.W., Tabor H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53:749-790.

Tabor C.W., Tabor H. (1984) Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 56:251-282.

Tabor C.W., Tabor H. (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev.* 49(1):81-99.

Takusagawa F., Kamitori S., Misaki S., Markham G.D. (1996a) Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase. *J Biol Chem.* 271(1):136-147.

Takusagawa F., Kamitori S., Markham G.D. (1996b) Structure and function of S-adenosylmethionine synthetase: crystal structures of S-adenosylmethionine synthetase with ADP, BrADP, and PPI at 28 angstroms resolution. *Biochemistry.* 35(8):2586-2596.

- Tavares J., Ouaisi A., Lin P.K., Tomas A., Cordeiro-da-Silva A. (2005) Differential effects of polyamine derivative compounds against *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Int J Parasitol.* 35(6):637-646.
- Taylor J.C., Markham G.D. (1999) The bifunctional active site of s-adenosylmethionine synthetase. Roles of the active site aspartates. *J Biol Chem.* 274(46):32909-32914.
- Taylor J.C., Takusagawa F., Markham G.D. (2002) The active site loop of S-adenosylmethionine synthetase modulates catalytic efficiency. *Biochemistry.* 41(30):9358-9369.
- Terui Y., Ohnuma M., Hiraga K., Kawashima E., Oshima T. (2005) Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem J.* 388(Pt 2):427-433.
- Thomas D., Surdin-Kerjan Y. (1997) Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(4):503-532.
- Thomas T., Faaland C.A., Adhikarakunnathu S., Thomas T.J. (1996) Structure-activity relations of S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors on the growth of MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 39(3):293-306.
- Tian, A.G., Zhao J.Y., Zhang J.S., Gai J.Y., Chen S.Y. (2004) Genomic characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean. *Theor Appl Genet.* 108(5):842-850.
- Tibbits T.T., Murphy J.E., Kantrowitz E.R. (1996) Kinetic and structural consequences of replacing the aspartate bridge by asparagine in the catalytic metal triad of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J Mol Biol.* 257(3):700-715.
- Tidwell R.R., Boykin D.W. (2002) Dicationic DNA minor-groove binders as antimicrobial agents. In: *DNA and RNA Binders: From small molecules to drugs.* Demeunynck M., Bailly C., Wilson W.D., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, Germany. 414-460.
- Tolbert W.D., Zhang Y., Cottet S.E., Bennett E.M., Ekstrom J.L., Pegg A.E., Ealick S.E. (2003) Mechanism of human S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme processing as revealed by the structure of the S68A mutant. *Biochemistry* 42(8):2386-2395.
- Toney M.D., Hohenester E., Cowan S.W., Jansonius J.N. (1993) Dialkylglycine decarboxylase structure: bifunctional active site and alkali metal sites. *Science.* 261(5122):756-759.
- Trager W., Jensen J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 193(4254):673-675.

- Triglia T., Cowman A.F. (1994) Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 91(15):7149-7153.
- Van Geldre E., Vergauwe A., Van den Eeckhout E. (1997) State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. Plant Mol Biol. 33(2):199-209.
- Van Vugt M., Brockman A., Gemperli B., Luxemburger C., Gathmann I., Royce C., Slight T., Looareesuwan S., White N.J., Nosten F. (1998) Randomized comparison of artemether-benflumetol and artesunate-mefloquine in treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. Antimicrob Agents Chemother. 42(1):135-139.
- Van Vugt M., Angus B.J., Price R.N., Mann C., Simpson J.A., Poletto C., Htoo S.E., Looareesuwan S., White N.J., Nosten F. (2000) A case-control auditory evaluation of patients treated with artemisinin derivatives for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg. 62(1):65-69.
- van Zuylen L., Bridgewater J., Sparreboom A., Eskens F.A., de Bruijn P., Sklenar I., Planting A.S., Choi L., Bootle D., Mueller C., Ledermann J.A., Verweij J. (2004) Phase I and pharmacokinetic study of the polamine synthesis inhibitor SAM486A in combination with 5-fluorouracil/leucovorin in metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 10(6):1949-1955.
- Varnado B.L., Voci C.J., Meyer L.M., Coward J.K. (2000) Circular dichroism and NMR studies of metabolically stable α -methylpolyamines: spectral comparison with naturally occurring polyamines. Biorg Chem. 28(6):395-408.
- Vickerman K., Cox F.E.G. (1967). The Protozoan. Murray.
- Wagner J., Danzin C., Mamont P. (1982) Reversed-phase ion-pair liquid chromatographic procedure for the simultaneous analysis of S-adenosylmethionine, its metabolites and the natural polyamines. J Chromatogr. 227(2):349-368.
- Wagner M.A., Andemariam B., Desai S.A. (2003) A two-compartment model of osmotic lysis in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Biophys J. 84(1):116-123.
- Wang C.C. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35:93-127.
- Wang S.H., Kuo S.C., Chen S.C. (2003) High-performance liquid chromatography determination of methionine adenosyltransferase activity using catechol-O-methyltransferase-coupled fluorometric detection. Anal Biochem. 319(1):13-20.

- Warters R.L., Newton G.L., Olive P.L., Fahey R.C. (1999) Radioprotection of human cell nuclear DNA by polyamines: radiosensitivity of chromatin is influenced by tightly bound spermine. *Radiat Res.* 151(3):354-362.
- Westheide W., Rieger R. (1996) *Spezielle Zoologie. Teil 1: Einzeller und wirbellose Tiere.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Whaun J.M., Brown N.D. (1985) Ornithine decarboxylase inhibition and the malaria-infected red blood cell: a model for the polyamine metabolism and growth. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233:507-511.
- White N.J. (1996) Malaria. In: *Manson's tropical diseases.* Cook, G. C. (ed), W. B. Saunders Company Ltd, London, 1087-1164
- White N.J. (1998) Drug resistance in malaria. *Br Med Bull.* 54(3):703-715.
- White N.J. (1998) Qinghaosu in combinations. *Med Trop (Mars).* 58(3 Suppl):85-88.
- Whitney P.A., Morris D.R. (1978) Polyamine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 134(1):214-220.
- Wilairatana P., Krudsood S., Chokejindachai W., Bussaratid V., Silachamroon U., Viriyavejakul P., Hendriksen C., Scheiwe M.W., Looareesuwan S. (1998) A clinical trial of combination of artesunate and mefloquine in the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria: a short and practical regimen. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 29(4):696-701.
- Williams-Ashman H.G., Schenone A. (1972) Methyl glyoxal bis(guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylases. *Biochem Biophys Res Commun.* 46(1):288-295.
- Williams-Ashman H.G., Seidenfeld J. (1986) Aspects of the biochemical pharmacology of methyl glyoxal bis(guanylhydrazone). *Biochem Pharmacol.* 35(8):1217-1225.
- Wolff E.C., Wolff J., Park M.H. (2000) Deoxyhypusine synthase generates and uses bound NADH in a transient hydride transfer mechanism. *J Biol Chem.* 275(13):9170-9177.
- Wrenger C., Luersen K., Krause T., Müller S., Walter R.D. (2001) The *Plasmodium falciparum* bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosyl-L-methionine decarboxylase, enables a well balanced polyamine synthesis without domain-domain interaction. *J Biol Chem.* 276(32):29651-29656.

Wright P.S., Byers T.L., Cross-Doersen D.E., McCann P.P., Bitonti A.J. (1991) Irreversible inhibition of S-adenosylmethionine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: growth inhibition *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 41:1713-1718.

Xie X., Gillies R.J., Gerner E.W. (1997) Characterization of a diamine exporter in Chinese hamster ovary cells and identification of specific polyamine substrates. *J Biol Chem.* 272(33):20484-20489.

Xiong H., Pegg A.E. (1999) Mechanistic studies of the processing of human S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme. Isolation of an ester intermediate. *J Biol Chem.* 274(49):35059-35066.

Xue G.P., Snoswell A.M., Fishlock R.C. (1989) Partial purification and properties of the isozymes of S-adenosylmethionine synthetase from sheep liver. *Biochem Int.* 18(3):525-535.

Yarlett N., Garofalo J., Goldberg B., Ciminelli M.A., Ruggiero V., Sufrin J.R., Bacchi C.J. (1993) S-adenosylmethionine synthetase in bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta.* 1181(1):68-76.

Yayon A., Cabantchik Z.I., Ginsburg H. (1984) Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J.* 3(11):2695-2700

Zhang C., Markham G.D., LoBrutto R. (1993) Coordination of vanadyl(IV) cation in complexes of S-adenosylmethionine synthetase: multifrequency electron spin echo envelope modulation study. *Biochemistry.* 32(37):9866-9873.

Zolg J.W., Plitt J.R., Chen G.X., Palmer S. (1989) Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 36(3):253-262.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Rolf D. Walter für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu können, für die Bereitstellung des Themas und für zahlreiche angeregte und anregende Diskussionen.

PD Dr. Sylke Müller, Institute of Biomedical and Life Sciences, Division of Infection and Immunity, Glasgow, danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Ein großer Dank gilt darüber hinaus meinen Kolleg(inn)en Ingrid B. Müller, Dr. Zita Krnajski und Dr. Kai Lüersen, die diese Arbeit - teilweise mehrere Male - durchgelesen haben und für viele gute Verbesserungsvorschläge verantwortlich sind.

Allen Mitgliedern der Abteilung Biochemie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor danken. Eine besonderer Dank gilt Marie-Luise Eschbach und Bärbel Bergmann, die immer einen Ratschlag, einen Handgriff oder einen Puffer übrig hatten.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht und ihr Vertrauen in mich danken, meiner Freundin Anke Klein für viel Verständnis und Geduld.