

Funktionelle Analyse des Polyaminstoffwechsels in
Plasmodium falciparum (Welch, 1897)

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

vorgelegt von

Ingrid Burglinde Müller

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
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. M. BÖTTGER
Tag der Disputation: 14. Dezember 2005

Hamburg, den 25. November 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Die Geschichte der Malaria	1
1.1.2	Formen der Malaria beim Menschen	2
1.1.3	Der Malariaerreger	2
1.1.4	Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	3
1.2	Argininkatabolismus	6
1.2.1	Die Funktion von Arginin	6
1.2.2	Arginasen	7
1.2.3	Konkurrenz um das Substrat Arginin	8
1.2.4	Das Wirkungsspektrum von NO	10
1.2.5	Ornithinmetabolismus	10
1.3	Polyaminsynthese	12
1.3.1	Polyamine und ihre Funktion	12
1.3.2	Verschiedene Synthesewege der Polyamine	12
1.3.3	Polyaminsynthese in Plasmodien	16
1.4	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien und Reagenzien	20
2.2	Puffer, Stocklösungen und Medien	23
2.3	Vektoren, Bakterien- und <i>Plasmodium</i>-Stämme	25
2.4	Bioinformatische Hilfsmittel	26
2.5	Molekularbiologische Methoden	27
2.5.1	Extraktion von genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i>	27
2.5.2	Southern-Blot-Analyse – Transfer von DNA (Sambrook et al., 1989)	27
2.5.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>P. falciparum</i> (Kyes et al., 2000)	28
2.5.4	Northern-Blot-Analyse – Transfer von RNA (Kyes et al., 2000)	28
2.5.5	Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	28
2.5.6	Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde	29
2.5.7	Strippen des Northern- oder Southern-Blots	29
2.5.8	DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)	29
2.5.9	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	30
2.5.10	Midi- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA	30
2.5.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
2.5.12	Reverse Transkription	31
2.5.13	Restriktionsverdau von DNA	31
2.5.14	Auftrennung von DNA über Agarosegel-Elektrophorese	32
2.5.15	Elution und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	32
2.5.16	Aufreinigung von DNA über DNA-Affinitätssäulen	32

2.5.17	Auffüllen und Entfernen der 5'- und 3'- DNA-Enden.....	32
2.5.18	Durchführung der <i>E. coli</i> -Transformation.....	33
2.5.19	Entfernung der Plasmid PCR-Vorlage.....	33
2.5.20	Subklonierung in pCR2.1-TOPO.....	33
2.5.21	Klonierung in Expressionsvektoren.....	34
2.5.22	Ortsgerichtete Mutagenese-PCR.....	34
2.5.23	Herstellung kompetenter Zellen.....	34
2.5.24	Einfrieren von <i>E. coli</i> -Stabilaten.....	35
2.5.25	Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
2.5.26	SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen.....	35
2.5.27	Natives Gel.....	35
2.5.28	Färbung der Proteingele mit Coomassie-Blau.....	36
2.5.29	Western-Blot Analyse – Transfer von Proteinen.....	36
2.5.30	Strippen des Western-Blots.....	36
2.6	Zellbiologische Methoden.....	36
2.6.1	Kulturführung von <i>P. falciparum</i>	36
2.6.2	Bestimmung der Parasitämie.....	37
2.6.3	Erstellung von Wachstumskurven.....	37
2.6.4	Einbau von radioaktivem Hypoxanthin.....	37
2.6.5	Transfektion von <i>P. falciparum</i>	38
2.6.5.1	Elektroporation der Plasmodien im Ringstadium.....	38
2.6.5.2	Transfektion der Erythrozyten – spontane DNA-Aufnahme durch den Parasiten.....	38
2.6.6	Selektion der Integration durch Doppelcrossover.....	39
2.6.7	Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer.....	39
2.6.8	Isolierung von Parasitenklonen mittels limitierter Verdünnung.....	40
2.6.9	Anreicherung der infizierten Erythrozyten im Percoll-Alanin Gradienten.....	40
2.6.10	Isolierung der Parasiten mittels Saponin.....	41
2.6.11	Behandlung der infizierten Erythrozyten mit Streptolysin O (SLO).....	41
2.6.12	Synchronisierung mit Sorbitol.....	41
2.6.13	Einfrieren der Plasmodienkultur.....	42
2.6.14	Auftauen der Plasmodienkultur.....	42
2.6.15	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	42
2.7	Methoden zur Charakterisierung der plasmodialen Arginase (PfARG).....	43
2.7.1	Stadienspezifische Transkription (Northern Blot).....	43
2.7.2	Klonierung der PfARG.....	43
2.7.3	Sequenzierung der PfARG.....	44
2.7.4	Herstellung der PfARG-Mutanten.....	44
2.7.5	Expression und Aufreinigung der rekombinanten PfARG.....	45
2.7.6	Gelchromatografie zur Bestimmung der nativen Struktur.....	45
2.7.7	Nachweis der strukturellen Manganabhängigkeit.....	46
2.7.8	Antikörperherstellung im Huhn und Aufreinigung.....	46
2.7.9	Dot-Blot der PfARG-Mutanten.....	47

2.7.10	Western-Blot Nachweis der <i>PfARG</i>	47
2.7.11	Immunlokalisierung der <i>PfARG</i>	47
2.7.12	Aktivitätsnachweis der <i>PfARG</i>	47
2.7.12.1	Colorimetrischer Enzymtest (Archibald, 1945)	47
2.7.12.2	Radioaktiver Enzymtest (Boucher et al., 1994)	48
2.7.13	Testen verschiedener Kationen als Kofaktoren	48
2.7.14	Temperaturstabilität der <i>PfARG</i>	48
2.7.15	Bestimmung des pH-Optimums.....	49
2.7.16	Inhibierung der rekombinant hergestellten <i>PfARG</i>	49
2.7.17	Inhibierung der <i>PfARG</i> in Kultur.....	49
2.8	Klonierung und Expression der putativen LDC von <i>P. falciparum</i>	49
2.9	Erstellung des computerbasierten Strukturmodells der <i>PfARG</i>	50
2.9.1	Herstellung und Bearbeitung des Alignments	50
2.9.2	Erstellung des Strukturmodelles	50
2.9.3	Verifizierung des Modells durch Ramachandran Plot	51
2.10	Wirkung verschiedener ODC-Inhibitoren auf die Plasmodienkultur	51
2.11	Methoden zur genetischen Modifikation der AdoMetDC/ODC	51
2.11.1	Die „Knockout“-Konstrukte pHTK-SO-Ko und pHTK-O-Ko.....	52
2.11.2	Die Mutationskonstrukte pHTK-Om und pHTK-Om-still.....	52
2.11.3	Kompletierung des ODC-Knockouts mit dem Gen der humanen ODC	53
2.11.3.1	Test der Funktionsfähigkeit der hODC.....	53
2.11.3.2	Das Kompletierungskonstrukt p Δ TK-O-hODCV5	53
2.11.3.3	Nachweis der hODC in <i>P. falciparum</i>	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Charakterisierung der <i>PfARG</i>	55
3.1.1	Genomische Struktur	55
3.1.2	Analyse der Primärsequenz	56
3.1.3	Stadienspezifisches Transkriptionsmuster.....	57
3.1.4	Biochemische Charakterisierung der <i>PfARG</i>	58
3.1.4.1	Rekombinante Expression.....	58
3.1.4.2	Kinetische Eigenschaften der rekombinanten <i>PfARG</i>	58
3.1.4.3	Testen verschiedener divalenter Kationen als Kofaktoren	59
3.1.4.4	Manganabhängigkeit der <i>PfARG</i> -Konformation	60
3.1.4.5	Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität des Enzyms	62
3.1.5	Einfluss der Arginaseinhibitoren auf die Plasmodienkultur.....	64
3.1.6	Nachweis der plasmodialen Arginase im Parasiten	65
3.1.7	Computerbasiertes Strukturmodell der <i>PfARG</i>	70
3.1.7.1	Editieren der Primärsequenz am multiplen Sequenz-Alignment.....	70
3.1.7.2	Modellierung der trimeren Struktur von <i>PfARG</i>	72
3.1.7.3	Evaluierung der Qualität des Strukturmodells	74
3.1.7.4	Koordination der Manganionen im aktiven Zentrum.....	75
3.1.8	Mutationsanalyse der Manganbindungsstellen	76

3.2	Homologie-Suche nach Genen der alternativen Polyaminsynthese.....	78
3.3	Bedeutung der PfAdoMetDC/ODC in <i>P. falciparum</i>-Blutstadien	79
3.3.1	Einfluss spezifischer PfODC-Inhibitoren auf das Zellwachstum	79
3.3.2	Genetische Veränderung des PfAdoMetDC/ODC-Genlocus	81
3.3.2.1	Das Knockout-Konstrukt pHTK-SO-Ko.....	82
3.3.2.2	Zerstörung der PfODC durch das Konstrukt pHTK-O-Ko.....	82
3.3.2.3	Einführung einer inaktivierenden Doppelmutation in PfODC.....	83
3.3.2.4	Analyse der transgenen Plasmodien	84
3.3.2.5	PCR- und Restriktionsanalyse der 3D7-hDHFR-Om Transfektanden.....	85
3.3.2.6	Untersuchung der Rekombinationspräferenz anhand einer stillen Mutation.....	87
3.3.3	Genetische Komplementierung des ODC-Knockouts mit der hODC	87
3.3.3.1	Erstellung des Komplementierungskonstrukts p Δ TK-O-hODCV5.....	87
3.3.3.2	Nachweis der Aktivität der hODC und ihre Expression im Parasiten	88
3.3.3.3	Analyse der 3D7- Δ -O-hODC-Klone.....	90
4	Diskussion.....	91
4.1	Essentielle Bedeutung der Polyamine in <i>P. falciparum</i>	92
4.1.1	Inhibierung der Polyaminsynthese im Parasiten	92
4.1.2	Biologische Funktion der PfAdoMetDC/ODC im Parasiten	93
4.1.3	Existiert ein alternativer Polyaminsyntheseweg in <i>P. falciparum</i> ?	99
4.2	Charakterisierung der plasmodialen Arginase.....	101
5	Zusammenfassung	110
6	Literaturverzeichnis.....	115

ABKÜRZUNGEN

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APA	1-Aminoxy-3-Aminopropan
bp	Basenpaare
CDC	Center of Disease Control
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
hDHFR	humane Dihydrofolat-Reduktase
hODC	humane ODC
IC ₅₀	InhibitorKonzentration, bei 50%-iger Hemmung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K _i	InhibitorKonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
NO	Stickoxid
NOHA	N ^ω -Hydroxy-L-Arginin
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pf</i> ARG	<i>P. falciparum</i> Arginase
PlasmoDB	Plasmodium-Datenbank
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

1.1 Malaria

1.1.1 Die Geschichte der Malaria

Malaria geißelte die Menschheit bereits in ältesten Hochkulturen wie in Ägypten, Indien und China. Schon 340 n.C. waren die fiebersenkenden Eigenschaften des Beifußgewächses *Arthemisia annua* in China bekannt. Ihre pharmakologisch wirksame Substanz, das Artemisinin, konnte schließlich 1971 isoliert werden und wird heute derivatisiert meist in Kombination mit anderen Antimalariamitteln verabreicht. Der Name „mal' aria“ stammt aus dem Altitalienischen und bedeutet „schlechte Luft“. Dieser Ausdruck entsprang der Vorstellung, dass die Krankheit durch die Luft übertragen wird. Die Verschleppung der Krankheit nach Amerika erfolgte erst im 16. Jahrhundert durch den Sklavenhandel. Südamerikanischen Ureinwohnern gelang es, mit dem Pulver aus der Rinde des Rötengewächses *Cinchona pubescens* - Chinarinde - das Fieber in Schach zu halten. Das chininhaltige Heilmittel wurde schließlich von Jesuiten nach Europa gebracht und dient auch heute noch zur Behandlung der Malaria (CDC, 2005). Auch in Europa hatte sich die Malaria weiträumig ausgebreitet, vorwiegend in Sumpfgebieten, woher auch der Name Sumpffieber stammt. Eine Epidemie brach 1858 während der Erbauung von Wilhelmshaven aus. Bis 1869 waren 18'000 Menschen davon betroffen. Durch Trockenlegung der Sümpfe konnte der Malaria in Europa schließlich Einhalt geboten werden (Westheide und Rieger, 1996). 1880 entdeckte der französische Arzt Charles Louis Alphonse Laveran erstmals den Malariaerreger *Plasmodium* in den roten Blutzellen. Kurz danach (1886) fand der italienische Neurophysiologe Camillo Golgi heraus, dass die periodisch auftretenden Fieberschübe mit dem Platzen der roten Blutkörperchen und mit dem Freisetzen neuer Parasiten korrelieren. Der Zusammenhang zum Überträger, der *Anopheles*-Mücke, wurde schließlich 1897 vom britischen Arzt Ronald Ross erkannt (CDC, 2005: <http://www.cdc.gov>). Heutzutage ist Malaria mit 300 Millionen Erkrankungen und weit über einer Million Toten pro Jahr neben Tuberkulose und HIV/AIDS eine der meistgefürchteten Krankheiten. Die derzeitige Verbreitung der Malaria erstreckt sich entlang des Äquators, über Afrika, Süd-Ost-Asien und Südamerika (WHO, 2005: <http://www.who.int/en>).

1.1.2 Formen der Malaria beim Menschen

Für den Menschen gefährlich sind vier verschiedene Malariaerreger der Gattung *Plasmodium*. *P. ovale* und *P. vivax* verursachen Malaria tertiana, die durch eine 48 h-Periodizität der Fieberschübe gekennzeichnet ist. Die Parasitämie steigt dabei kaum über 2%. Bei dieser Form können häufig Rezidive beobachtet werden, die durch Ausbildung von Hypnozoiten (bis zu fünf Jahren in Hepatozyten ruhende Parasiten) entstehen. Eine etwas seltenere Erkrankung ist Malaria quartana, die durch *Plasmodium malariae* ausgelöst wird. Die im 72 h-Rhythmus auftretenden Fieberschübe sind für diese Form der Malaria typisch. Auch hier bleibt die Parasitämie niedrig (meist unter 1%) und beeinträchtigt somit den Patienten kaum. Im Gegensatz dazu weist Malaria tropica, welche durch *P. falciparum* verursacht wird, eine sehr hohe Letalitätsrate auf. Aufgrund der bis zu 20%-igen Parasitämie nimmt die Erkrankung einen raschen und gravierenden Verlauf, der meist durch kurze unregelmäßige Fieberabstände gekennzeichnet ist. *Plasmodium falciparum* ist für 50% aller Malariafälle verantwortlich. Die hohe Letalitätsrate resultiert aus der Fähigkeit des Parasiten, sich an Endothelzellen sowie an Erythrozyten anzulagern, was zur Verstopfung von Kapillaren führt. Die Adhäsion beruht auf parasiteneigenen Antigenen, die in sogenannten „knobs“ in die Oberfläche der befallenen roten Blutzelle integriert werden. Sie interagieren mit Rezeptoren von Endothelzellen und Erythrozyten. Die sogenannte Sequestrierung beeinträchtigt die Blutzirkulation, was zur Sauerstoff-Unterversorgung der Organe führt und häufig in schweren Schädigungen besonders der Lunge und des Gehirns endet. Diese Form, die zerebrale Malaria, ist schwer behandelbar und führt fast immer zum Tod des Patienten (Kayser et al., 1997).

1.1.3 Der Malariaerreger

Plasmodien sind parasitische Protozoen, die nach neuerer Einteilung zu der Gruppe der Alveolata gezählt werden. Sie gehören zusammen mit anderen humanpathogenen obligaten Endoparasiten wie *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmose), *Cryptosporidium parvum* (Kryptosporidiose) und den Babesien (Babesiose), letztere vorwiegend bei Immunsuprimierten relevant, zu den Apicomplexa (Abb. 1).

Stamm: Apicomplexa (ehem. Sporozoa)
Klasse: Haematozoa
Ordnung: Haemosporida
Familie: Plasmodiidae
Gattung: *Plasmodium*

Abb. 1. Systematische Einordnung der Gattung *Plasmodium* (Westheide und Rieger, 1996).

Wie der Name schon sagt, zeichnet sich dieser Stamm durch eine besondere apikal gelegene Zellstruktur, dem Apikalkomplex, aus. In ihm befinden sich Organellen wie Mikronemen und Rhoptrien, die Proteine zur Invasion der Wirtszelle beinhalten. Plasmodien sind obligate Endoparasiten mit einem haplohomophasischen Generationswechsel sowie einem Wirtswechsel. In ihrem Lebenszyklus durchlaufen die Parasiten eine ungeschlechtliche Schizogonie im Zwischenwirt, dem Menschen, und eine geschlechtliche Gamogonie sowie eine ungeschlechtliche Sporogonie im Endwirt, der *Anopheles*-Mücke. Affen, Reptilien, Nagetiere sowie Vögel dienen anderen Plasmodienarten als Zwischenwirte. Jedoch ist die Wirtsspezifität der jeweiligen Plasmodienart sehr hoch, wodurch praktisch kein Erregerreservoir vorhanden ist. Bei den nicht humanpathogenen Formen sind neben *Anopheles* auch *Aedes* und *Culex* Endwirte (Mehlhorn und Piekarski, 2002).

1.1.4 Der Lebenszyklus von *P. falciparum*

Bei der Blutmahlzeit des *Anopheles*-Weibchens gelangen etwa 8 - 15 Sporozoiten mit dem Speichel in die Blutbahn oder Lymphe des Menschen, worüber diese innerhalb von 15 - 45 min in die Leber gelangen und dort Hepatozyten befallen. Hier kommt es zur ersten Vielteilung, der sogenannten exoerythrozytären Schizogonie. Beim Eindringen des Sporozoiten in die Leberparenchymzelle wird dieser von der Wirtsmembran umschlossen. In der so entstandenen parasitophoren Vakuole entwickeln sich innerhalb von 6 Tagen bis zu 30'000 Merozoiten pro Zelle, die nach Freisetzung in die Blutbahn gelangen und dort Erythrozyten befallen. Die exoerythrozytäre Vermehrung findet nur einmal statt. Die darauffolgende erythrozytäre Schizogonie hingegen ist ein sich ständig wiederholender Prozess. Hier wächst der Parasit wiederum in einer parasitophoren Vakuole während 48 h vom Ringstadium (8 h post Infektion, p.i.) über den jungen (16 h p.i.) und alten Trophozoiten (24 h p.i.) schließlich zum Schizonten (36 h p.i.) heran. Nach beendeter DNA-Synthese erfolgt die Schizogonie, aus der etwa 16 Merozoiten (48 h p.i.)

hervorgehen, die ihrerseits wieder binnen Sekunden neue Erythrozyten befallen. Im Trophozoiten-Stadium ist die Hauptnahrungsquelle des Parasiten Hämoglobin, welches durch Phagocytose in die Nahrungsvakuole aufgenommen wird. Durch den Verdau von Hämoglobin entsteht das toxische Hämin. Durch Polymerisierung kann der Parasit das Hämin in Form von Hämozoin entgiften. Werden die Merozoitenantigene sowie die Abbauprodukte beim Platzen des Schizonten freigesetzt, so lösen diese die typischen Fieberschübe aus. Nach einigen Schizogoniegenerationen entwickeln sich aus den Merozoiten auch männliche und weibliche Gametozyten (Gamonten). Sie können bis zu 22 Tage im Blut überdauern. Durch eine weitere Blutmahlzeit gelangen die Gametozyten in den Mückendarm, wo aus dem weiblichen Makrogamont ein Makrogamet und aus dem männlichen Mikrogamont 4 - 8 Mikrogameten entstehen, die den Makrogameten befruchten. Der bewegliche Ookinet (Zygote) wandert durch die Mitteldarmwand und nistet sich zwischen Epithelschicht und Basalmembran ein. Hier erfolgt die Umwandlung zur Oozyste, wobei durch Sporogonie tausende von Sporozoiten entstehen. Diese gelangen über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Mücke, von wo sie auf einen neuen Wirt übertragen werden (Westheide und Rieger, 1996; Mehlhorn und Piekarski, 2002) (Abb. 2).

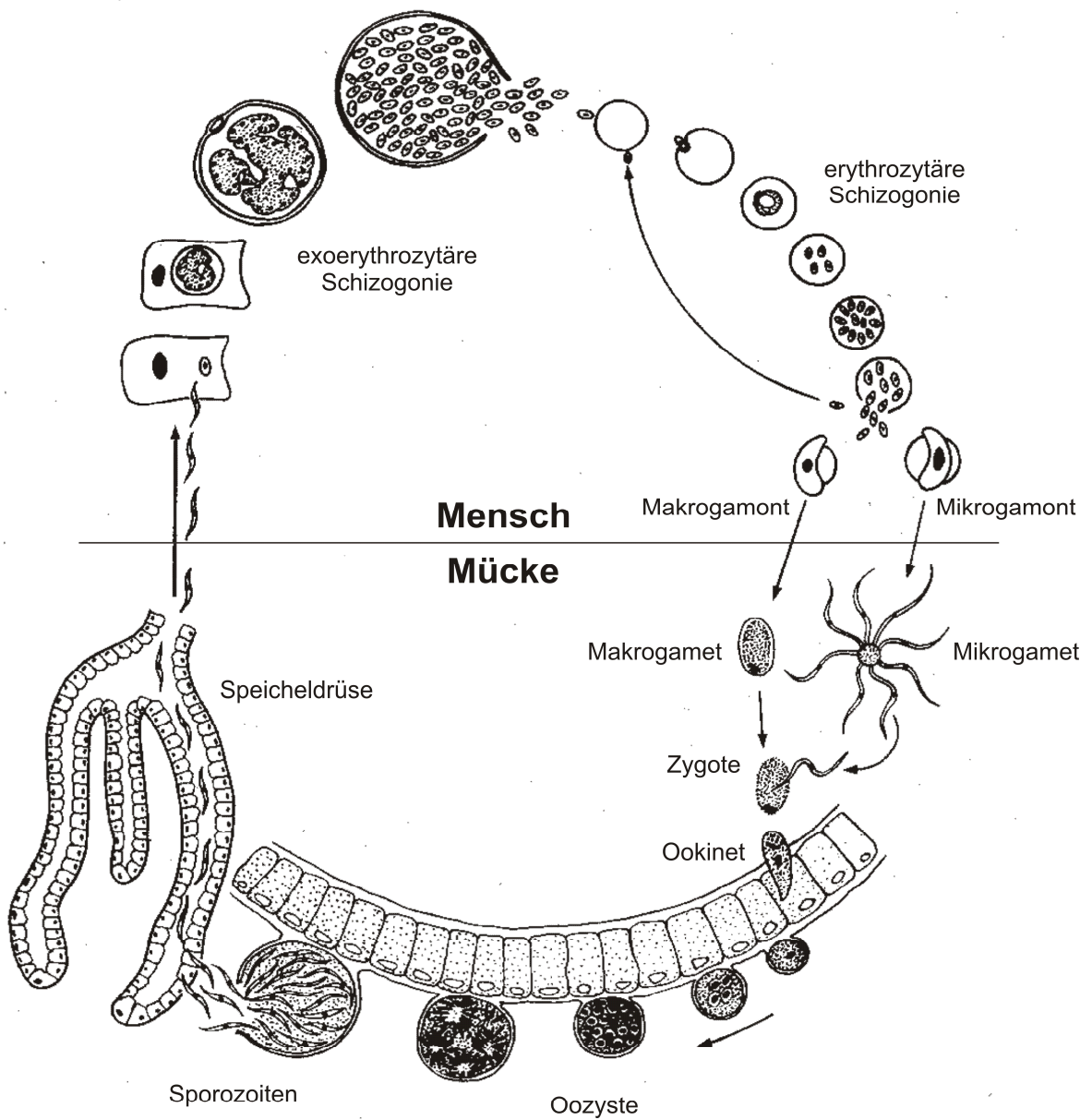


Abb. 2. Lebenszyklus von *P. falciparum*. Exoerythrozytäre und erythrozytäre Schizogonie erfolgen im Zwischenwirt, dem Menschen. Gamogonie und Sporogonie finden im Endwirt, der *Anopheles*-Mücke, statt (nach Vickerman und Cox, 1967).

1.2 Argininkatabolismus

1.2.1 Die Funktion von Arginin

Die Aminosäure Arginin ist aufgrund ihrer Guanidinogruppe positiv geladen, basisch und hydrophil. Gesunde adulte Tiere stellen Arginin in ausreichendem Maße selbst her. Im Wachstumsstadium juveniler Säugetiere sowie bei Verletzungen und Entzündungen ist der Bedarf an Arginin hingegen sehr hoch, weshalb es mit der Nahrung aufgenommen werden muß. Deshalb wird Arginin zu den semi-essentiellen Aminosäuren gezählt (Barbul, 1986; Morris, 2004). Der größte Teil des Arginins wird in Proteine eingebaut. Der Abbau von Arginin führt zu Ornithin, aus welchem anschließend Prolin und Glutamat entstehen können. Letzteres fließt nach Umwandlung zu α -Ketoglutarat in den Krebszyklus ein und dient der Synthese von Carbohydraten, Fettsäuren und weiteren Aminosäuren (Krebs und Henseleit, 1932). Zudem entstehen aus Arginin Agmatin, Creatin, Citrullin und Stickoxid (NO). NO wird durch die NO-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39) gebildet und fungiert als Botenstoff in Immunabwehr, Vasodilatation und Neurotransmission (MacMicking et al., 1997).

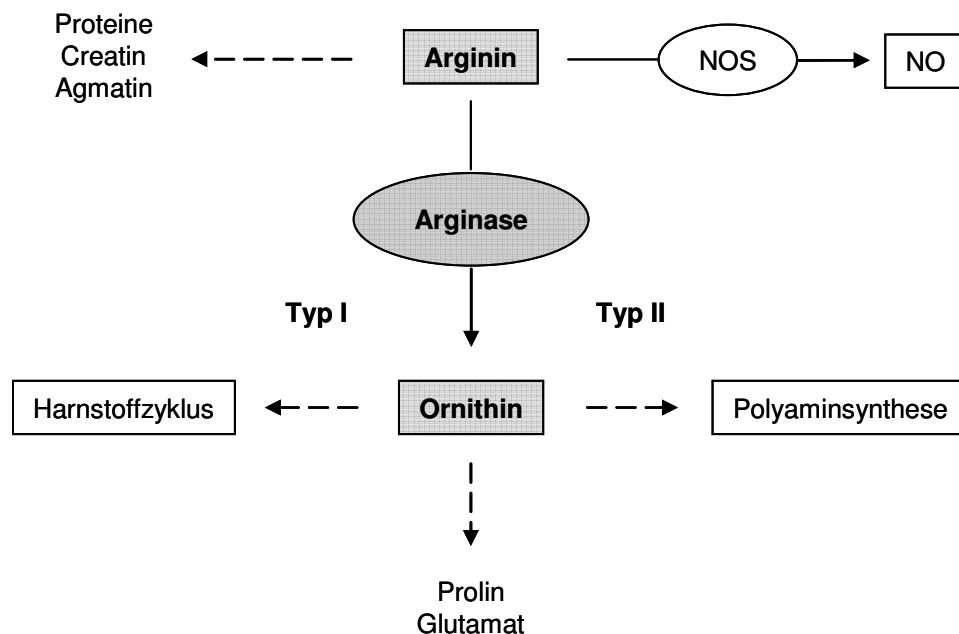


Abb. 3. Schematische Darstellung des Argininkatabolismus. Arginase und NOS akzeptieren beide Arginin als Substrat. Arginase Typ I liefert Ornithin zur Entgiftung von Ammonium in der Leberzelle. Arginase Typ II reguliert die Polyaminsynthese.

Bei Mikroorganismen ist Nahrungsverknappung eine der Strategien, das Wachstum derjenigen Organismen zu beeinflussen, die um die gleiche Nische konkurrieren. So nützen sowohl Bakterien als auch Parasiten die Depletion des Arginins der Umgebung, um ihr Überleben zu sichern (Vincendeau et al., 2003; Bronte und Zanovello, 2005). Die Regulation des Argininhaushalts ist demnach von großer Bedeutung (Abb. 3).

1.2.2 Arginasen

Die Reaktion von Arginin zu Ornithin wird durch die Arginase (EC 3.5.3.1) katalysiert. In höheren Eukaryoten unterscheidet man zwischen zwei Isoenzymen der Arginase, Typ I und Typ II (siehe Abb. 3). Ersterer kommt ausschließlich cytosolisch in der Leber und bei höheren Primaten auch in Erythrozyten vor (Spector et al., 1982; Kim et al., 2002). Die beiden Isoenzyme weisen unterschiedliche biologische Funktion auf. Arginase I dient hauptsächlich dazu, das aus dem Abbau von Amino- und Nukleinsäuren entstandene Ammonium in Form von Harnstoff zu entgiften. Im Gegensatz zum Typ I ist der Typ II vorwiegend mitochondrial in allen Geweben zu finden. Hier reguliert das Enzym die Konzentrationen von Arginin, NO und Ornithin, dem Vorläufer der Polyamine (Grody et al., 1987; Gotoh et al., 1996; Morris et al., 1997; Li et al., 2001). Nach neusten Ergebnissen wird die strikte These der klaren unterschiedlichen Lokalisation der beiden Isoenzyme in Frage gestellt, da die Arginase I auch in anderen Geweben gefunden wurde. Auch besitzen Makrophagen beide Isoenzyme gleichzeitig, regulieren diese jedoch unterschiedlich (Cederbaum et al., 2004).

Arginasen sind Metalloproteine, deren Kofaktoren zweiwertige Kationen sind. Ihre katalytische Wirkungsweise beruht auf der Hydrolyse der Guanidinogruppe des Arginins (Christianson und Cox, 1999) (siehe Abb. 4). Im aktiven Zentrum der Rattenleberarginase sind zwei unterschiedlich koordinierte Manganionen (Mn_A und Mn_B) über ein Wassermolekül an das Substrat gebunden. Die Hydrolyse erfolgt über diesen Metall-aktivierten Hydroxidion-Mechanismus (Christianson und Cox, 1999). Anhand von Kristallstrukturen verschiedener Arginasen konnten die hochkonservierten manganbindenden Aminosäuren identifiziert werden (Kanyo et al., 1996). Des Weiteren werden Arginasen als thermostabil beschrieben (Cavalli et al., 1994), was auf ihre Struktur zurückzuführen ist (Scolnick et al., 1997). Beide Typen der Säugerarginase sind Homotrimere, jedoch weisen die meisten Bakterienarginasen eine homohexamere Struktur auf (Jenkinson et al., 1996; Khangulov et al., 1998; Bewley et al., 1999; Cama

et al., 2003a). Auch Decamere wie die Arginase von *Panax ginseng* wurden beschrieben (Hwang et al., 2001).

Neben den eigentlichen Arginasen umfasst die Familie der Arginasen (EC 3.5.3.1) drei weitere Mitglieder. Die Agmatinasen (EC 3.5.3.11) hydrolysieren Agmatin zu Putrescin und Urea, die Formimidoylglutamasen (EC 3.5.3.8) Formimino-glutamat zu Glutamat und Formamid, und die Proclavaminat-Amidinohydrolase (PAH) von *Streptomyces clavuligerus* (EC 3.5.3.22) Guanidinproclavaminat zu Proclavaminat und Urea (Elkins et al., 2002). Letztere kommen ausschließlich in Bakterien vor. Ihre Verwandtschaft zu Arginasen und Agmatinasen beruht auf der katalytischen Ähnlichkeit, die durch hochkonservierte Aminosäuren bedingt ist (Ouzounis und Kyripides, 1994; Perozich et al., 1998). Formimino-glutamat ist im Abbau von Histidin involviert. PAH hingegen katalysiert einen Zwischenschritt der Clavulansäuresynthese. Clavulansäure inhibiert die β -Laktamasen und wird β -Laktamase-labilen Antibiotika beigefügt, um deren Wirkung aufrechtzuerhalten (Brogden et al., 1981).

1.2.3 Konkurrenz um das Substrat Arginin

Mittels spezifischer Inhibitoren der Arginase konnte gezeigt werden, dass Arginin dadurch vermehrt von der NOS zur Produktion von NO verwendet wird. Umgekehrt beeinflusst die Arginase die NO-Produktion negativ durch Senkung des Argininspiegels, wodurch mehr Ornithin anstatt NO entsteht (Colleluori und Ash, 2001; Berkowitz et al., 2003). N^o-Hydroxy-L-Arginine (NOHA) entsteht als Zwischenprodukt bei der Reaktion von Arginin zu Citrullin und NO und hemmt die Arginase (Boucher et al., 1994 und 1999) (Abb. 4). Im menschlichen Plasma liegt die Konzentration von NOHA bei 9 μ M (Meyer et al., 1997). Der Argininspiegel des Blutes wurde auf 100 μ M bestimmt (Böger et al., 1996). Die K_m-Werte von Arginasen sind jedoch im mM-Bereich, diejenigen der NOS im μ M-Bereich. Vergleicht man die V_{max}-Werte der beiden, so liegt derjenige der Arginase um ein 1'000-faches über dem der NOS, was auf einen ähnlichen Argininverbrauch hindeutet. Eine Konkurrenz der beiden Enzyme um das Substrat ist dementsprechend zu erwarten (Wu und Morris, 1998).

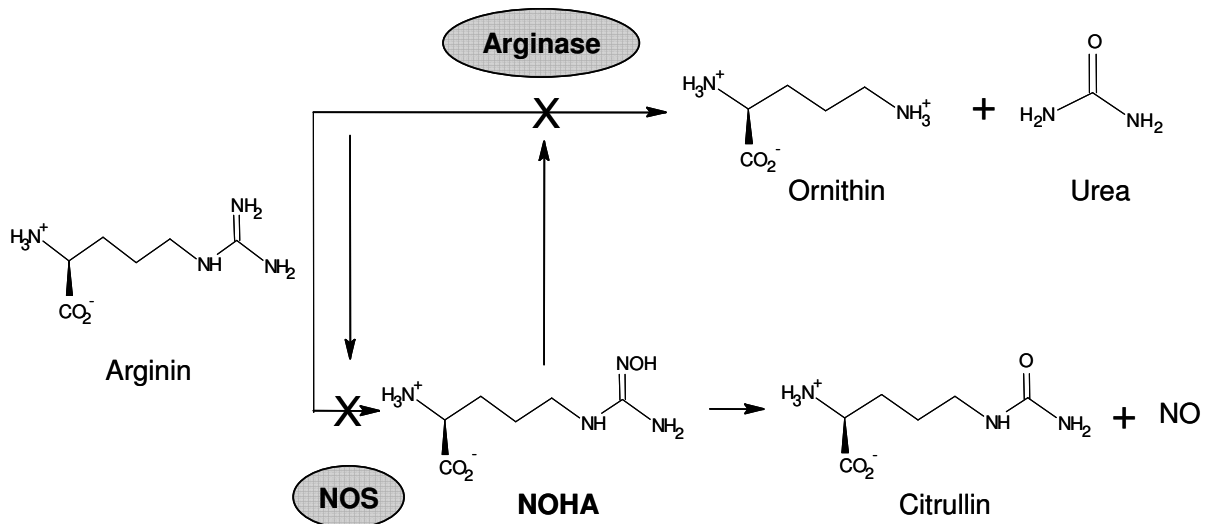


Abb. 4. Konkurrenz um das Substrat Arginin für Ornithin- bzw. NO-Synthese. Gegenseitige Hemmung erfolgt einerseits durch Substratdepletion (Arginase-Weg) oder durch den inhibitorischen Effekt des Zwischenprodukts NOHA (NOS-Weg) (nach Colletuori und Ash, 2001).

Dass die beiden Enzyme um das Substrat Arginin konkurrieren, wird bereits als medizinisch relevant angesehen. Bei Patienten mit Sichelzellanämie wird die Arginase I aus den Erythrozyten vermehrt ins Blutserum sekretiert, um dort die Verfügbarkeit von Arginin für die NO-Synthese zu senken (Morris et al., 2005). Ähnliches wurde auch bei Patienten mit Asthma oder Lungenentzündung beobachtet, bei denen erhöhte Transkriptmengen von Arginase I und II detektiert wurden (King et al., 2004). Die vermehrte Stickoxidproduktion führt auch zur Entspannung der glatten Muskulatur. Darauf beruhend wurden Arginasehemmer wie (S)-2-Amino-6-Boronhexansäure (ABH) und S-(2-Boronethyl)-L-Cystein (BEC) bei erektiler Dysfunktion erfolgreich eingesetzt (Cox et al., 1999; Cama et al., 2003b; Kim et al., 2004). Baggio et al. (1999) zeigten, dass die bekannten Arginaseinhibitoren isozymspezifisch agieren und somit unterschiedlich eingesetzt werden können. Des Weiteren wurde in entzündeten Wunden und in Makrophagenkultur eine erhöhte Arginaseaktivität gemessen, wodurch Arginin in der extrazellulären Flüssigkeit fast komplett depletiert wurde und der Ornithinspiegel stark anstieg (Louis et al., 1999; Luiking et al., 2004). Interessanterweise nützen Mikroorganismen wie *Helicobacter pylori* und *Leishmania major* eine erhöhte Expression der eigenen oder der Wirtsarginase, um dem NO-Druck der Immunantwort des Wirtes zu entgehen (Gobert et al., 2001; Iniesta et al., 2001; Zabaleta et al., 2004; Kropf et al., 2005). Andere pathogene Organismen wie *Giardia lamblia* benutzen die Arginin-Deiminase (EC 3.5.3.6) um Arginin zu depletieren. Arginin-Deiminasen hydrolysieren

Arginin zu Citrullin und kommen ausschließlich in Mikroorganismen vor (Eckmann et al., 2000; Zuniga et al., 1998).

1.2.4 Das Wirkungsspektrum von NO

In vivo beträgt die Halbwertszeit von NO nur wenige Sekunden. Da es aber sowohl lipophilen als auch lipophoben Charakter aufweist, kann es leicht durch Cytoplasma und Plasmamembranen hindurch diffundieren. Seine Effekte erstrecken sich über neuronale Transmission, synaptische Plastizität, vaskuläre Homöostase und Hemmung der Thrombozyten-Aggregation. NO reagiert mit dem Eisenatom im aktiven Zentrum der Guanylcyclase und stimuliert diese zur Produktion von cGMP, einem intrazellulären Mediator, der zur Entspannung glatter Muskulatur und zur Vasodilatation führt (Garbers und Lowe, 1994; Wagner et al., 2005). Zudem hat NO durch posttranslationale S-Nitrosylierung einen regulatorischen Effekt auf verschiedene Proteine (Bauer et al., 2001; Stamler et al., 2001;). Dabei wird NO kovalent an die Thiolgruppe des Cysteins gebunden und bewirkt somit, dass zelluläre Signale weitergegeben werden (Hess et al., 2005). Im extrazellulären Milieu reagiert NO mit Sauerstoff und Wasser zu Nitrat und Nitrit. Die Toxizität von NO ist bedingt durch seine Fähigkeit, mit Superoxidanionen (O_2^-) Peroxynitrit ($ONOO^-$) zu bilden, ein freies Radikal, das DNA-Fragmentierung und Lipidoxidation verursacht. In Mitochondrien interagiert $ONOO^-$ mit den Enzymen der Atmungskette und der Mangansuperoxid-Dismutase, wobei Superoxidanionen und Hydrogenperoxid (H_2O_2) entstehen (Torreilles et al., 1999; Meij et al., 2004).

1.2.5 Ornithinmetabolismus

Ornithin gehört zu den Aminosäuren, die nicht in Peptide eingebaut werden. Es trägt einerseits zur Entgiftung des durch Protein- und Nukleinsäureabbau entstandenen Ammonium und CO_2 bei (Harnstoffzyklus; Krebs und Henseleit, 1932). Andererseits dient Ornithin als Vorläufersubstanz zur Herstellung von Polyaminen, Prolin und Glutamat (Abb. 3). Bei ureotelischen Tieren ist ausschließlich die Arginase I zuständig für Entgiftung von Ammonium. Ammonotelische und uricotelische Tieren sowie Pflanzen, Pilze und Mikroorganismen besitzen meist die Enzyme des Harnstoffzyklus (Jenkinson et al., 1996). Jedoch ist hier die Aufgabe zum einen die Bildung von Urea, das Pflanzen und

Mikroorganismen als Stickstoffquelle dient (Polacco und Holland, 1993; Mobley et al., 1995), und zum anderen die Regulation der Arginin- und Ornithin-Homöostase.

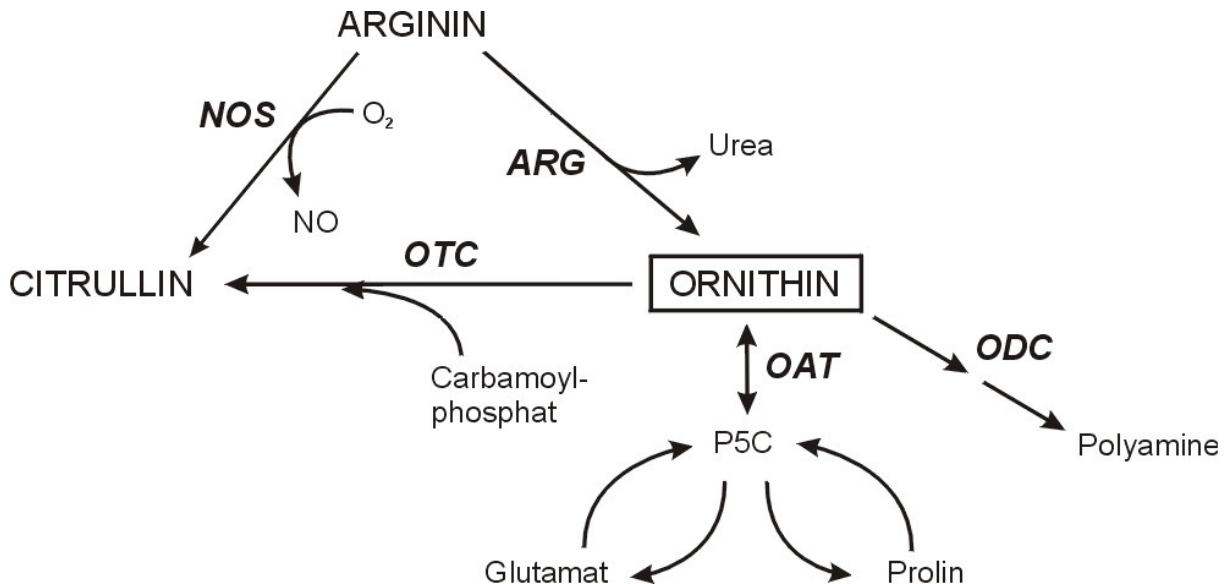


Abb. 5. Ornithinstoffwechsel. ARG, Arginase; OAT, Ornithin-Aminotransferase; ODC, Ornithin-Decarboxylase; OTC, Ornithin-Carbamoyltransferase; P5C, Pyrrolin-5-carboxylat. P5C steht mit Glutamat-5-semialdehyd über eine spontane nichtenzymatische Reaktion im chemischen Gleichgewicht (nach Morris, 2004).

Ornithin kann des Weiteren durch die Rückreaktion der Ornithin-Aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13) aus Prolin oder Glutamat über Pyrrolin-5-carboxylat und Glutamat-5-semialdehyd gebildet werden (Wu und Morris, 1998). Pflanzen, Bakterien und Hefen können zudem acetyliertes Glutamat in Ornithin umwandeln. Dieser Reaktionsmechanismus wird durch die Verfügbarkeit von Arginin reguliert, da Arginin inhibierend wirkt (Michal et al., 1999). Bei *Saccharomyces cerevisiae* reguliert die Arginase die Arginin- und Ornithinsynthese, indem sie mit der Ornithin-Carbamoyltransferase (OTC, EC 2.1.3.3) einen Enzymkomplex bildet, durch den die OTC inhibiert wird, während die Arginaseaktivität erhalten bleibt (El Alami et al., 2003). In *P. falciparum* konnte außer der Carbamoylphosphat-Synthase (Flores et al., 1994) bis jetzt kein weiteres Enzym des Harnstoffzyklus entdeckt werden. Gafan et al. (2001) zeigten, dass *P. falciparum* Ornithin aus Prolin über die Ornithin-Aminotransferase generieren kann, dieses aber nur in geringem Maßstab geschieht. Demnach muss der Parasit entweder Ornithin aufnehmen oder aber mittels Arginase aus Arginin herstellen. Ornithin dient *P. falciparum* zur Synthese von Polyaminen (Müller et al., 2000).

1.3 Polyaminsynthese

1.3.1 Polyamine und ihre Funktion

Das Diamin Putrescin und die Polyamine Spermidin und Spermin sind aliphatische Kohlenwasserstoffe (Tabor und Tabor, 1984a und 1984b; Seiler, 1994). Sie werden in fast allen sowohl prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gebildet und gespeichert (Cohen, 1998). Ihre Aminogruppen liegen unter physiologischen Bedingungen protoniert vor, wodurch Polyamine sich an negativ geladene Makromoleküle wie Nukleinsäuren und Phospholipide sowie Phenolsäuren anlagern können (Galston, 1985). Hierin beruht auch ihre Funktion. Tabor und Tabor (1976) zeigten, dass Polyamine durch die Interaktion mit DNA diese stabilisieren und dadurch einen Schutz vor Hitzedenaturierung bieten. Höhere Konzentrationen an Polyaminen induzieren die Veränderung von einer entspannten zu einer aufgewundenen DNA-Konformation. Sie spielen darüber hinaus eine Rolle in der Genexpression (Childs et al., 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten, dass die Senkung des endogenen Polyaminspiegels zur Blockierung der Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus führt, die jedoch durch Zugabe von Polyaminen wieder aufgehoben werden kann (Pegg et al., 1986; Seiler und Heby, 1988; Seiler et al., 1994). Polyamine sind essentiell für Differenzierung und Proliferation (Hölltä und Pohjanpelto, 1982; Svensson und Persson, 1996; Seiler, 2005). Große Bedeutung in der Antwort auf osmotischen, mechanischen oder chemischen Stress hat der Polyaminstoffwechsel vor allem bei Pflanzen. Die Akkumulation von Putrescin kann durch saures Milieu, Nahrungsmangel, UV-Strahlung und Umweltgifte stimuliert werden (Galston und Sawhney, 1990; Watson und Malmberg, 1996).

1.3.2 Verschiedene Synthesewege der Polyamine

Bei der Polyaminsynthese katalysiert die Ornithin-Decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) die Reaktion von Ornithin zu Putrescin. Parallel dazu verläuft die Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin (AdoMet) durch die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (AdoMetDC, EC 4.1.1.50). Vom decarboxylierten AdoMet (dcAdoMet) wird anschließend eine Aminopropylgruppe auf Putrescin übertragen, wodurch Spermidin entsteht. Diese Reaktion wird von der Spermidin-Synthase (SpdSyn, EC 2.5.1.16) katalysiert. Durch die Übertragung einer weiteren Aminopropylgruppe von dcAdoMet auf Spermidin durch die

Spermin-Synthase (SpmSyn, EC 2.5.1.22) entsteht Spermin (Abb. 6). Die ODC ist das Schlüsselenzym des Syntheseweges. In höheren Eukaryoten wird dieses Enzym durch ein Antizym (Murakami et al., 1976), welches bei hohen Polyaminkonzentrationen durch einen +1 „frame shift“ induziert wird, und einen Antizyminhibitor reguliert (Nilsson et al., 2000). Das zweite Schlüsselenzym, die AdoMetDC, wird durch Putrescin stimuliert, wodurch eine Koordinierung der beiden Enzyme besteht (Stanley et al., 1994; Svensson und Persson, 1996). Darüber hinaus können die Polyaminmengen durch zwei weitere Enzyme feinreguliert werden. Hierbei wird Spermin erst durch eine N-Acetyltransferase acetyliert und anschließend durch die Polyaminoxidase oxidiert, wodurch Spermidin entsteht. Dieser Reaktionsweg wird als Interkonversion bezeichnet. Die gleichen Enzyme katalysieren auch die Interkonversion von Spermidin zu Putrescin (Pegg et al., 1981; Seiler et al., 1981).

Bei Pflanzen und Bakterien sind alternative Wege zur Herstellung von Putrescin beschrieben worden (Morris und Pardee, 1966; Khan und Minocha, 1989; Nakada und Itho, 2003;). Hierbei wird Putrescin statt aus Ornithin aus Agmatin gebildet. Agmatin entsteht durch die Decarboxylierung von Arginin; eine Reaktion, die von der Arginin-Decarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) katalysiert wird (Blethen et al., 1968, Hanfrey et al., 2001). Die anschließende Hydrolyse von Agmatin zu Putrescin erfolgt durch die Agmatinase. Manche Arginasen, so auch die Rattenleber-Arginase, akzeptieren auch Agmatin als Substrat, jedoch in einem weit geringeren Maße (Reczkowski und Ash, 1994). Pflanzliche und bakterielle ADCs sind meist durch Stress induzierbar (Richard und Foster, 2003; Urano et al., 2004). Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde erstmals die Deiminierung von Agmatin zu N-Carbamoylputrescin durch die Agmatin-Deiminase (AguA) und die anschließende Abspaltung des N-Carbamoyls vom Putrescin durch die N-Carbamoylputrescin-Aminohydrolase (AguB) beschrieben (Mercenier et al., 1980; Nakada et al., 2001). Dieser Weg ist bisher nur in einigen Bakterien und wenigen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* gefunden worden (Yanagishawa et al., 1982; Schoeb et al., 1994; Piotrowski et al., 2003) (Abb. 6).

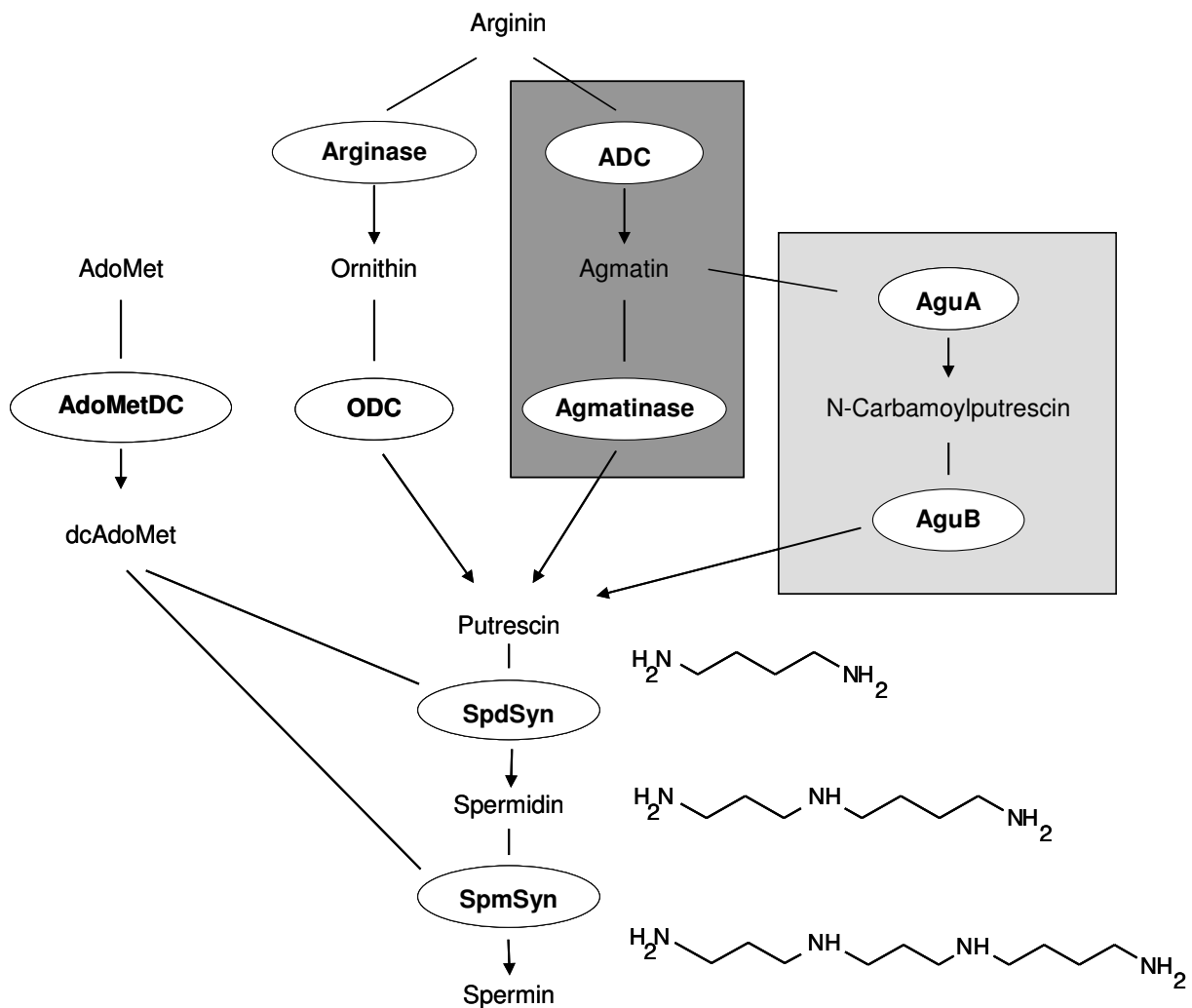


Abb. 6. Syntheseweg von Polyaminen in verschiedenen Organismen. Pflanzen, Bakterien sowie Pilze besitzen einen alternativen Syntheseweg über Agmatin anstelle von Ornithin (dunkelgrau). Seltener, nur bei wenigen Pflanzen und einigen Bakterien, erfolgt die Polyaminsynthese über das Zwischenprodukt N-Carbamoylputrescin (hellgrau).

Klein et al. (1999) gelang es die ADC von *Escherichia coli* und von *Avena sativa* im ODC-defizienten *S. cerevisiae*-Stamm zu rekonstituieren. Damit konnte gezeigt werden, dass der ADC-Weg den ODC-Weg ersetzen kann. Während die meisten Tiere und Pflanzen entweder den ODC- oder den ADC-Stoffwechselweg verwenden, kommen in vielen Bakterien beide Wege gleichzeitig vor (Tabor und Tabor, 1972; Cunin et al., 1986; Glansdorff, 1996). Jedoch kann keine strikte Regelung aufgestellt werden. So besitzt zum Beispiel *Lotus japonicus* nicht nur eine ODC, sondern zusätzlich sogar zwei ADC-Isoenzyme. Mittels „real time“ PCR konnte gezeigt werden, dass die Transkripte der drei Gene zudem unterschiedliche organspezifische Expressionsmuster aufweisen (Flemetakis et al., 2004). *Arabidopsis thaliana* besitzt hingegen nur zwei ADC-Gene, die

bei Stress unterschiedlich induziert werden (Urano et al., 2004). Ob Säugetiere auch eine ADC besitzen, ist immer noch umstritten. Das Vorkommen der Agmatinsynthese im Säugerhirn wurde erstmals von Regunathan et al. (1994) beschrieben. Anschließend konnten Morrissey et al. (1997) Teile des Gens aus der Leber klonieren und als ADC identifizieren. Jedoch konnten Coleman et al. (2004) diese experimentellen Daten nicht reproduzieren und schlussfolgerten, dass es sich wohl eher um eine bakterielle Kontamination als um eine humane ADC handelt. Somit ist weiterhin offen, ob eine alternative Polyaminsynthese in Säugetieren überhaupt existiert. Die Funktion der von Mistry et al. (2002) charakterisierten humanen Agmatinase liegt demnach weniger in der Synthese von Polyaminen als in der Regulation des Agmatinspiegels. Im Gegenteil, Agmatin wirkt sogar inhibierend auf die Polyaminsynthese (Satriano, 2003).

Auch einzelligen Parasiten kann kein einheitlicher Polyaminsyntheseweg zugeordnet werden. Keithly et al. (1997) zeigten, dass *Cryptosporidium parvum* Polyamine über den ADC-Weg herstellen. Die Zellen waren sensitiv gegen den ADC-Inhibitor α -Difluormethylarginin (DFMA) jedoch nicht gegen α -Difluormethylornithin (DFMO). *Trypanosoma cruzi* ist im Gegensatz zu seinen nahen Verwandten *Trypanosoma brucei* und *Leishmania major* ausschließlich auf die Aufnahme von Putrescin angewiesen, da dieser Parasit nur eine AdoMetDC aber keine ODC besitzt (Persson et al., 1998; Müller et al., 2001). Auch das Promastigotenstadium von *Leishmania donovani* scheint gegen DFMO nicht sensitiv zu sein. Die Promastigoten gleichen die blockierte Putrescinbildung jedoch durch aktiven Putrescinimport aus (Kandal und Tekwani, 1997). Das in der Krebstherapie verwendete DFMO ist ein potenter ODC-Inhibitor (Seiler et al., 1998). Rajam et al. (1985) zeigten, dass DFMO einen negativen Effekt auf das Wachstum und die Morphologie verschiedener phytopathogener Pilze hat. Es wird in Form von Eflornithin erfolgreich gegen *T. brucei* und *T. gambiense*, dem Erreger der Westafrikanischen Schlafkrankheit, nicht jedoch gegen *T. rhodesiense* (Bacchi et al., 1983; Schlechter und Sjoerdsma, 1986; Wang et al., 1995; Burri und Brun, 2003) eingesetzt. Trotz der hohen Wirksamkeit von Eflornithin gegen *T. gambiense* wird dieses in Afrika aus wirtschaftlichen und logistischen Gründen nicht vertrieben, da es in sehr hohen Dosen (4 x 400 mg/kg/Tag, intravenös) verabreicht werden müsste. Die Verwendung von Eflornithin in der westlichen Welt als Haarentfernungsmittel erscheint daneben als absurd. Als diese Diskrepanz schließlich auch der Öffentlichkeit bewusst wurde, konnte der Hersteller Aventis dazu bewogen werden, der WHO 25 Millionen Dollar für die Bekämpfung der Afrikanischen Schlafkrankheit zu überlassen (Bacchi, „Polyamines in Parasites“, New York, 2004).

1.3.3 Polyaminsynthese in Plasmodien

Wie auch bei allen anderen Organismen, deren Polyaminsynthese über den ODC-Weg erfolgt, sind sowohl ODC als auch AdoMetDC die beiden Schlüsselenzyme des Stoffwechselweges in *P. falciparum*. Jedoch unterscheidet sich der Syntheseweg im Malaria-Parasiten von dem aller anderen Organismen, da die Schlüsselenzyme durch einen gemeinsamen offenen Leserahmen kodiert sind und als bifunktionelles Protein auftreten. Die Enzyme sind über eine sogenannte „hinge“-Region miteinander verknüpft. Durch diese Anordnung werden die beiden Enzyme gleichzeitig exprimiert. Das bifunktionelle Protein AdoMetDC/ODC weist in Blutstadien des Erregers ein Expressionsmaximum im Trophozoitenstadium auf (Müller et al, 2000). Wrenger et al. (2001) zeigten, dass die Halbwertszeit der plasmodialen ODC im Vergleich zu jener der humanen ODC (15 - 35 min, Heby und Persson, 1990) deutlich über 2 h beträgt. Des Weiteren wird die ODC des Parasiten durch Putrescin inhibiert und die AdoMetDC im Gegensatz zum humanen Enzym nicht stimuliert. Die beiden enzymatischen Regionen des bifunktionellen Enzyms sind rekombinant hergestellt unabhängig voneinander aktiv. Anhand von Mutationen essentieller Aminosäuren beider Enzymdomänen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der jeweils anderen Domäne im bifunktionellen Protein nicht beeinträchtigt wird (Krause et al., 2000; Wrenger et al., 2001) (Abb. 7).

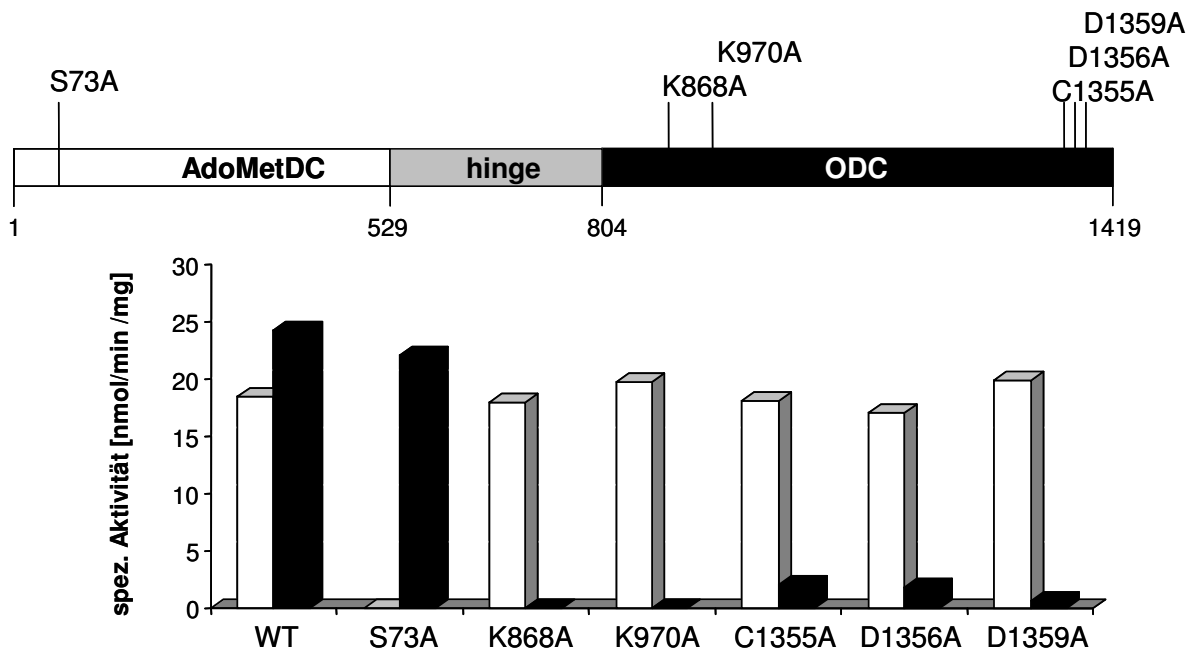


Abb. 7. Das bifunktionelle AdoMetDC/ODC-Protein und der Einfluss verschiedener Mutationen auf die Aktivität der beiden Enzyme des rekombinanten Proteins (nach Wrenger et al., 2001). ODC-Aktivität (schwarze Balken) und AdoMetDC-Aktivität (weiße Balken). Wildtyp Protein (WT).

Plasmodium falciparum besitzt des Weiteren eine funktionale SpdSyn, jedoch keine SpmSyn (Haider et al., 2005). Darüber hinaus fehlen *P. falciparum* die Enzyme des Interkonversionweges (Müller et al., 2001). DFMO wirkt cytotatisch auf die Plasmodienkultur und blockiert den Parasiten im Trophozitenstadium. Dieser Effekt kann durch Zugabe von Putrescin wieder aufgehoben werden (Assaraf et al., 1987). Bei *P. berghei*, dem Erreger der Malaria im Nagetier, wirkt DFMO vorwiegend im Insektenstadium, was zur Hemmung der Sporozitenbildung führt und schließlich die Übertragung auf den Säugerwirt blockiert (Gillet et al., 1983). Auch das Leberstadium dieser Parasiten wird durch DFMO stark beeinträchtigt (Gillet et al., 1982). Hingegen zeigten Bitonti et al. (1987), dass die Wirkung von DFMO auf die erythrozytäre Schizogonie zwar zur Senkung der Parasitämie infizierter Mäuse führt, eine vollständige Heilung der Mäuse jedoch ausbleibt. Generell werden die extrazellulären Polyaminkonzentrationen sehr niedrig gehalten, da Polyamine durch die im Serum vorliegende Polyamin-Oxidase in cytotoxische Derivate umgewandelt werden (Seiler, 2005). Im Vergleich zum Plasma weisen Erythrozyten deutlich höhere Polyaminkonzentrationen auf (Takagi et al., 2004). In Krebspatienten akkumulieren Polyamine in Tumorzellen und Körperflüssigkeit. Quemener et al. (1995) zeigten, dass die erhöhte Polyaminkonzentration in Erythrozyten als diagnostisches Mittel zur Krebsbestimmung verwendet werden kann. Die erhöhte Konzentration im Blut dient zudem der Evaluierung des Erfolgs einer Krebstherapie (Bachrach, 2004).

1.4 Zielsetzung

Aufgrund der rapiden Entstehung und Ausbreitung von Medikamentenresistenzen ist die Forschung ständig gefordert, neue Substanzen zur Bekämpfung der Malaria zu entwickeln. Dazu gehört auch die Aufdeckung von Unterschieden zwischen dem Stoffwechsel des Erregers und dem des Menschen, wodurch sich neue potentielle Angriffspunkte ergeben. Polyamine sind für alle Organismen essentiell. Schnell proliferierende Zellen – Plasmodien ebenso wie Tumorzellen - zeigen im Gegensatz zu solchen im ausdifferenzierten Gewebe einen stark erhöhten Bedarf an Polyaminen. Die Hemmung der Polyaminsynthese wird deshalb für die Tumorthherapie und –prophylaxe ausgenützt. Das für die Krebstherapie entwickelte DFMO ist auch gegen Pilzbefall von Pflanzen wirksam. Zudem hemmt DFMO die Polyaminsynthese von *T. gambiense* und wird erfolgreich gegen die westafrikanische Schlafkrankheit eingesetzt (Burri und Brun, 2003).

Der Polyaminstoffwechsel von *P. falciparum* ist sehr viel einfacher organisiert als der komplexere humane Stoffwechsel. Dem Parasiten fehlen neben der SpmSyn zudem die Enzyme der Interkonversion. Auch werden die Schlüsselenzyme AdoMetDC und ODC, die als gemeinsames bifunktionelles Protein kodiert sind, anders reguliert. Die Halbwertszeit der PfAdoMetDC/ODC ist deutlich länger als die der humanen Enzyme (Müller et al., 2001). Diese Unterschiede könnten erfolgsversprechende Ansätze für die Entwicklung von Medikamenten gegen Malaria sein. Anhand von Inhibitorstudien mit Leitstrukturen aus der Krebsforschung konnten sowohl die plasmodiale ODC als auch AdoMetDC gehemmt und deren Einfluss auf Polyaminspiegel und Wachstum der Plasmodien bestätigt werden (Das Gupta et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die Polyaminsynthese für den Parasiten im Blutstadium essentiell ist. Hierfür sollte das Gen der Schlüsselenzyme zerstört werden. Um einen möglichen polyaminauxotrophen Phänotyp der PfAdoMetDC/ODC-Knockout-Zellen charakterisieren zu können, sollten diese mit Putrescin und Spermidin komplementiert werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass Plasmodien einen alternativen Polyaminsyntheseweg über Agmatin besitzen. In der Genomdatenbank von *P. falciparum* befindet sich eine Sequenz mit hoher Homologie zur Familie der Arginasen und Agmatinasen. Dieses Gen sollte kloniert, das Protein rekombinant hergestellt und biochemisch charakterisiert werden. Erst über die Substratspezifität des Enzyms kann entschieden werden, ob es

sich um eine Arginase oder um eine Agmatinase handelt. Im Falle einer Agmatinase würde der Parasit über ein Enzym verfügen, mit dem er Putrescin unabhängig von der ODC herstellen könnte. Sollte es sich um eine Arginase handeln, wäre dieses Protein der Eingangsschritt zur Polyaminsynthese. Da Arginasen über die Produktion von Ornithin für die Polyaminsynthese hinaus ein breites Funktionsspektrum besitzen, sollten in dieser Arbeit weitere biologische Funktionen aufgeklärt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alexis

N^ω-Hydroxy-nor-L-Arginin (nor-NOHA).

Amersham Biosciences

U[¹⁴C]Arginin, [α -³²P]dATP (3'000 Ci mmol⁻¹), [α -³⁵S]dATP (1'000 Ci mmol⁻¹), ECL plus Western-Blotting Detection System, [³H]Hypoxanthin (1 mCi ml⁻¹), HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis, U[¹⁴C]Ornithin (50 mCi mmol⁻¹), Percoll.

Becton Dickinson (Cockeysville)

BBL Agar, BBL Hefeextrakt, BBL Trypticase Pepton.

Biomol (Hamburg)

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactosid (X-Gal), Glycerin, Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG).

Bio-Rad Laboratories (München)

Elektrophorese-Standards für SDS-PAGE, Gelfiltration Standard.

DakoCytomation

Fluorescent Mounting Medium.

Dianova (Hamburg)

Kaninchen-Anti-Huhn-Antikörper HRP gekoppelt,
Ziege-Anti-Maus-Antikörper HRP gekoppelt,
Esel-Anti-Huhn-Antikörper FITC gekoppelt.

Fluka (Ulm)

Putrescin, Spermidin.

Gibco (Invitrogen)

RPMI-HEPES Medium, Albumax II.

Institut für Bioanalytik (IBA, Göttingen)

Anhydrotetracyclin (AHT), Desthiobiotin in Puffer E, *Strep-Tactin* Sepharose (*Strep-tag*[®]-Aufreinigung).

Invitrogen (Karlsruhe)

Accu Prime Polymerase, chemisch kompetente BL21-DE3-RIL *E. coli*-Zellen, Maus-Anti-V5-Antikörper, TOPO-BAD Cloning Kit, TOPO TA Cloning Kit, Trizol-Reagenz.

Laboratoire de Chimie et Biochimie, Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris, France (Prof. Jean-Luc Boucher)

2(S)-Amino-6-Boronoheptansäure (ABH), S-(2-Boronoethyl)-L-Cystein (BEC).

Merck (Darmstadt)

Calciumchlorid-Dihydrat, Chloroform, Coomassie Brilliant Blue G-250, Essigsäure, Ethanol (Ethanol), Formamid, Giemsa-Lösung, Guanidiniumthiocyanat, Glucose, Harnstoff, Immersionsöl (d=1,02), Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, *di*-Kaliumhydrogenphosphat, Methanol, Methylenblau, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumhydrogencarbonat, *di*-Natriumhydrogenphosphat, Natriumpyrophosphat (NaPP_i), Perchlorsäure, Polyethylenglykol 6'000 (PEG 6'000), Salzsäure.

New England Biolabs

Restriktionsenzyme, T4-DNA Ligase, Proteinase K.

Novartis

CGP 52622A, CGP 54169A.

Packard Bioscience

ULTIMA Gold Scintillationsflüssigkeit.

Promega

RNA-Standard.

Rathburn Chemicals (Walkerburn)

Dimethylsulfoxid (DMSO).

Ratiopharm

Gentamicin.

Roche

Alkalische Phosphatase (CIAP), Ampicillin, DAPI, DNase, DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), Expand Long Template Polymerase, Glycogen, Heringssperma-DNA, Random Primed DNA Labeling Kit, Restriktionsenzyme, Rinderserumalbumin (BSA), RNase A.

Serva (Heidelberg)

Acrylamid, L-Alanin, Dextranblau, Bromphenolblau-Natriumsalz, N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES), Natriumdodecylsulfat (SDS), Saponin, N', N', N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED).

Sigma - Aldrich

Chloramphenicol, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Dithiothreitol (DTT), Enhanced Avian RT-PCR Kit, Ethidiumbromid, Freund's Adjuvant (complete), Freund's Adjuvant (incomplete), Ganciclovir, Glucose, Glycerin, α -Isonitroso-Propiophenon (1-Phenyl-1,2-Propandion-2-Oxim), Kanamycin, Kodak Biomax MR, Mineralöl, N^o-Hydroxy-L-Arginin (NOHA), NZAmine (Caseinhydrat), Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v), Protease-Inhibitoren-Cocktail, Siliziumoxid, D-Sorbitol, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Polyoxyethylensorbitan-Monooleat (Tween), Xylencyanol.

Stratagene

Site Directed Mutagenesis Kit, chemisch kompetente XL-Gold *E. coli*-Zellen, *Pfu*-DNA-Polymerase.

USB

Sequenase Version 2.0.

2.2 Puffer, Stocklösungen und Medien

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.

Coomassie-Färbung

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

Cytomix (100 ml):

6 ml 2 M KCl	2,98 g/20 ml
7,5 µl 2 M CaCl ₂	2,94 g/10 ml (Stocklösung bei -20 °C lagern)
1 ml 1 M K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ :	
(8,66 ml 1 M K ₂ HPO ₄ +	2,28 g/10 ml
1,34 ml 1 M KH ₂ PO ₄ ,	1,36 g/10 ml
pH 7,6)	
10 ml 250 mM HEPES/20mM EGTA:	5,96 g HEPES (free acid)
pH 7,6 mit 10 M KOH	0,76 g EGTA, ad 80 ml dH ₂ O
	1,4 ml 10 M KOH pH 7,6, ad 100 ml dH ₂ O
500 µl MgCl ₂	2,03 g/10 ml
ad 90 ml dH ₂ O, pH 7,6 mit ca. 350 µl 1 M KOH, ad 100 ml dH ₂ O, sterilfiltriert bei 4 °C lagern.	

Ganciclovir [2 mM]

5,1 mg in 10 ml 0,1 N HCl, sterilfiltriert bei 4 °C lagern.

HT-PBS

2,85 g Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0,625 g NaH₂PO₄ · 2H₂O, 7,4 g NaCl, pH 7,2, ad 1 l dH₂O.

Hybridisierungslösungen

20-fach SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0.
100-fach Denhardt's: 2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% BSA.

Lösungen für DNA-Präparationen

STET-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 5% (v/v) Triton X-100, 8% (v/v) Sucrose.
New Wash: 50% Ethanol, 10 mM Tris, pH 7,5, 0,05 mM Na⁺-EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0.
Glasmilch: 12% (w/v) Siliziumoxid, 0,12% HCl (v/v) in H₂O.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

1,0% Trypticase Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1,0% NaCl (für LB-Agar zusätzlich 1,5% Agar).

NZY-Medium

0,5% NaCl, 0,2% MgSO₄·7H₂O, 0,5% Hefeextrakt, 1,0% NZAmine (Caseinhydrat) (für NZY-Agar zusätzlich 1,5% Agar, für NZY-Topagar 0,8% Agar).

Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) Ethanol, 8,0% (w/v) H₃PO₄.

PBS-Puffer

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

Pyrimethamin [200 µM]

0,012 g in 5 ml 1% Eisessig, 300 µl davon in 15 ml HT-PBS, sterilfiltriert bei 4 °C ein Monat haltbar.

RPMI 1640 Medium (1 l)

15,9 g RPMI 1640-HEPES, 1 g Natriumbicarbonat, 2 g D-Glucose in 800 ml dH₂O, 5 g Albumax II in 100 ml dH₂O (bei 37 °C lösen), 27,2 mg Hypoxanthin in 2 ml 1 N NaOH, pH 7,4 mit 10 N NaOH, ad 1 l dH₂O, 20 mg Gentamycin, sterilfiltriert bei 4 °C einen Monat haltbar.

RPMI 1640 Mangelmedium (BioChemica)

(ohne L-Arginin-HCl, ohne Pyridoxin-HCl ohne Thiamin-HCl)

Angesetzt wie RPMI 1640, ergänzt durch sterilfiltriertes Thiamin-HCl [1 mg l⁻¹] und Pyridoxin-HCl [1 mg l⁻¹].

SDS-PAGE

10% Trenngel: 1,5 ml Trenngel-Puffer, 2,5 ml H₂O, 2 ml 30% Acrylamid, 60 µl Natriumdodecylsulfat (SDS), 25 µl 10% Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED.

5% Sammelgel: 1,0 ml Sammelgel-Puffer, 2,3 ml H₂O, 667 µl 30% Acrylamid, 40 µl 10% SDS, 40 µl 10% Ammoniumpersulfat, 10 µl TEMED.

SDS-Probenpuffer

2xSDS-Probenpuffer: 70 mM Natriumdodecylsulfat (SDS), 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 125 mM Tris, pH 6,8, 1 Spatelspitze Bromphenolblau.

TE-Puffer

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

WR99210 [20 µM]

8,6 mg WR99210 in 1 ml DMSO gelöst, bei -70 °C gelagert (20 mM Stock). Eingesetzte Lösung ist 1:1'000 in RPMI-HEPES verdünnt und sterilfiltriert bei 4 °C einen Monat stabil.

2.3 Vektoren, Bakterien- und Plasmodium-Stämme

Vektoren

pASK-IBA3	IBA, Göttingen
pASK-IBA7	IBA, Göttingen
pJC40	J. Clos, BNI, Hamburg
pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pBAD-TOPO	Invitrogen
pHTK	Prof. A. F. Cowman, WEHI, Melbourne, Australia

Bakterienstämme (*E. coli*-Zellen)

BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Stratagene

BL21 (DE3)-pAPlac	Stratagene
BL21 Star (DE3)-pLysS	Invitrogen
DH5 α	Stratagene
EWH 331	Prof. H. Tabor, NIH, Bethesda, USA
One-Shot TOP10	Invitrogen
Rosetta Gami B	Novagen
XL-Gold	Stratagene

P. falciparum-Stamm

3D7	S. Müller, Wellcome Trust, Dundee
-----	-----------------------------------

2.4 Bioinformatische Hilfsmittel

CINEMA 5	(Parry-Smith et al., 1998)
ClustalW	(Chenna et al., 2003)
Generunner	(Hasting Software Inc., 1994)
GraphAlign	(Spalding und Lammers, 2004)
GraphPadPrism	(San Diego, CA, USA)
JOY	(Mizuguchi et al., 1998)
MitoProt II	(Claros und Vincens 1996)
MODELLER	(Marti-Renom et al., 2000)
PATS	(Zuegge et al., 2001)
PlasMit	(Bender, 2002)
Predotar	(Small, Genoplante, INRA,France)
PROCHECK	(Laskowski et al., 1993)
Programm ProFIT	(Bowie et al., 1991)
PSORT II	(Nakai und Horton, 1999)
PyMOL Viewer	(DeLano Scientific, 2000)
SignalP	(Nielson et al., 1997)
T-Coffee	(Notredame et al., 2000)
NCBI-BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
ExpASy	www.expasy.org
PlasmoDB	www.plasmodb.org

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Extraktion von genomischer DNA aus *P. falciparum*

Um genomische DNA (gDNA) aus 10 ml Plasmodienkultur zu gewinnen, wurden die Zellen bei 1'500 rpm (Megafuge 1.0 R, Heraeus) für 5 min pelletiert. Anschließend wurden die Parasiten mittels Saponinlyse isoliert (siehe 2.6.10). Das Pellet wurde mit 0,5 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 2% SDS) aufgeschlossen. Der Ansatz wurde mit 10 µl Proteinase K (10 mg ml⁻¹) über Nacht bei 37°C behandelt. Danach wurden die Zelltrümmer mit einer gesättigten NaCl-Lösung 10 min auf Eis gefällt und bei 5'000 rpm (Eppendorfzentrifuge) für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA mit 2 µl RNase A (10 mg ml⁻¹) für 15 min bei 37°C zerstört. Danach wurden die Proteine mit 1 vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die wässrige Lösung wiederum in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mit 1 vol Chloroform wurde das restliche Phenol entfernt, bevor die gDNA in 2,5 vol 100% Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt wurde. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurde die gDNA in 50 µl TE-Puffer mit einer abgeschnittenen Pippettenspitze gelöst und die DNA-Menge in einem Spectrophotometer Uvicon 933 bei 260 nm gemessen.

2.5.2 Southern-Blot-Analyse – Transfer von DNA (Sambrook et al., 1989)

Zur Untersuchung der gDNA mittels einer Southern-Blot-Analyse wurden 10 µg gDNA von *P. falciparum* in 50 µl Restriktionsenzym-puffer für 24 - 72 h mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten. Der Verdau wurde auf einem 0,8%-igem Agarosegel (150 ml TBE, ohne Ethidiumbromid) für mehrere Stunden bei < 80 V aufgetrennt. Das Gel wurde in 0,5 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid für 20 min gefärbt und mit angelegtem Lineal fotografiert. Danach folgte die Depurinierung der DNA in 0,25 M HCl für 10 min, die Denaturierung in 0,5 M NaOH, 1 M NaCl für 30 min und schließlich die Neutralisierung in 1 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,2 für weitere 30 min. Nach der Behandlung des Gels wurde die DNA über Nacht in 20xSSC durch Kapillarkraft auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) geblottet und mit dem UV Stratalinker 1800 (Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

2.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *P. falciparum* (Kyes et al., 2000)

Trophozoiten einer zuvor synchronisierten 50 ml Plasmodienkultur wurden mittels Saponinlyse isoliert. Das Zellpellet wurde anschließend in 0,5 ml Trizol resuspendiert und bei -80 °C bis zur RNA-Isolierung eingefroren. Das Trizol-Lysat wurde bei 37 °C für 5 min aufgetaut und mit 0,2 ml Chloroform pro ml eingesetztem Trizol versehen. Die Proben wurden gut gemischt und bei 10'000x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Rotor F45-24-11, Eppendorf). Der wässrige Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro ml eingesetztem Trizol gemischt. Die RNA wurde mindestens 2 h auf Eis gefällt, dann bei 12'000x g für 30 min abzentrifugiert und luftgetrocknet.

2.5.4 Northern-Blot-Analyse – Transfer von RNA (Kyes et al., 2000)

Die für den Northern-Blot verwendeten Lösungen wurden mit 0,01% DEPC behandeltem dH₂O angesetzt. Die Gelkammer, -träger und -kamm wurden zuvor einige Stunden in 3% H₂O₂ eingelegt. Das gefällte und isolierte RNA-Pellet wurde in 10 µl Formamid bei 60 °C für 10 min gelöst und mit einer Pipettespitze resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde im Spectrophotometer UVICON 933 bei 260 nm bestimmt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Volumina der RNA-Proben und des RNA-Standards mit Formamid angeglichen und 2 min bei 60 °C denaturiert. Jeweils 25 µg RNA wurden in einem 1,2%-igen Agarosegel, welches 5 mM Guanidiniumthiocyanat enthielt, und in 1xTBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (Kyes et al., 2000). Anschließend wurde die RNA auf dem Gel in 0,5 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Als Skalierung diente ein Lineal. Vor dem Blotten des Gels wurde dieses 10 min in 7,5 mM NaOH equilibriert und dann ebenfalls in 7,5 mM NaOH über Nacht im Kapillarblotverfahren auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Die RNA wurde durch UV-Bestrahlung mit dem UV-Stratalinker kovalent an die Membran gebunden.

2.5.5 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

25 ng eines gewünschten DNA-Abschnittes wurden 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend mit dCTP, dGTP, dTTP, Hexanukleotiden und Klenow Polymerase aus dem Random Primed Labeling Kit für 30 min bei 37 °C mit 50 µCi α-³²P-dATP radioaktiv

markiert. Die Sonde wurde von den nicht eingebauten dNTP's mit Hilfe einer MicroSpin™ S-200 HR Säule (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

2.5.6 Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde

Der Northern-Blot wurde für mindestens 3 h in 7% SDS, 0,5 M NaH₂PO₄, pH 7,2 und 2% Dextransulfat bei 55 °C prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde die mit α -³²P-dATP radioaktiv markierte DNA-Sonde vor Zugabe zur Prähybridisierungslösung für 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55 °C. Anschließend wurde die Membran folgendermaßen gewaschen: 2x20 min in 2xSSC, 0,1% SDS bei 55 °C; 20 min in 1xSSC, 0,1% SDS bei 55 °C; falls nötig weitere 20 min in 0,5xSSC, 0,1% SDS bei 55 °C. Anschließend wurde auf die Membrane ein Röntgenfilm gelegt, in einer Filmkassette je nach Signal für 2 - 72 h bei -80 °C exponiert und durch Autoradiographie (Biomax, Kodak) detektiert.

2.5.7 Strippen des Northern- oder Southern-Blots

Die Sonde wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,1 M NaOH, 0,1% SDS (Northern Blot) oder 0,4 M NaOH, 0,1% SDS (Southern-Blot) für 15 min bei 37 °C entfernt. Anschließend wurde der Blot mit einem Müller-Geiger-Zähler überprüft und vor der Prähybridisierung mit 2xSSC gewaschen.

2.5.8 DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit Sequenase Version 2.0 (USB) und [α -³⁵S]dATP durchgeführt. Die doppelsträngige DNA wurde in 0,2 M NaOH für 10 min bei 37 °C denaturiert, dann mit 10% Ammoniumacetat (3 M, pH 4,6) und 2,5 Vol 100% Ethanol für 30 min bei -20 °C gefällt. Danach wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und für die Sequenzierungsreaktion in 7 μ l dH₂O aufgenommen. Die Reaktion wurde nach Anweisung des Herstellers (USB) durchgeführt und in einem 12%-igem Polyacrylamidgel

bei maximal 2'000 V während 1,5 - 3 h elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde über Nacht bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak) exponiert und anschließend entwickelt.

Alternativ wurde auch mit dem ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach den Angaben des Herstellers sequenziert. Die Sequenzierungsprodukte wurden mit dem Gerät ABI 377 der Firma Applied Biosystems aufgetrennt. Die Analyse der Sequenz erfolgte mit dem Programm GeneRunner Version 3.05.

2.5.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Eine *E. coli*-Kolonie wurde in 3 ml LB angeimpft und schüttelnd bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde 2 ml einer Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 10'000x g (Eppendorfszentrifuge) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl Stet-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 8% Sucrose, 50 mM EDTA, 5% Triton-X-100) resuspendiert mit 100 µg Lysozym 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 90 sec im Wasserbad gekocht und anschließend für 15 min bei 10'000x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl 6 M Natriumjodidlösung gemischt. Um die Plasmid-DNA zu isolieren, wurden 7 µl Glasmilch beigefügt und die Suspension für 5 min bei RT geschüttelt. Danach wurde das Pellet mit 1 ml New Wash gewaschen, bei 56°C getrocknet und in 50 µl dH₂O aufgenommen. Die DNA wurde für 5 min bei 56°C von der Glasmilch gelöst und diese für 1 min bei 10'000x g abzentrifugiert.

2.5.10 Midi- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA

Die Durchführung der Midi- beziehungsweise Maxi-Plasmid-Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Qiagen Plasmid Maxi/Midi Kit, Qiagen oder Nucleobond PC 100 Kit, Macherey und Nagel). Bei der Midi-Präparation wurden, ausgehend von einer 100 ml *E. coli*-Übernachtskultur, maximal 150 µg Plasmid-DNA gewonnen. Ausgehend von einer 500 ml-Übernachtskultur erhielt man mit der Maxi-Präparations-Methode maximal 500 µg Plasmid-DNA.

2.5.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurden nach Vorschrift des jeweiligen DNA-Polymerase-Herstellers durchgeführt. Benutzt wurden entweder *Pfu*-Polymerase (Promega), die die Fähigkeit zum 3'-„Proofreading“ besitzt, Elongase Enzym-Mix (Life Technologies), der eine Mischung der hitzestabilen und daher effizienten *Taq*- und der *Pfu*-Polymerase darstellt, Expand Long Template Polymerase (Roche), geeignet für besonders lange DNA-Fragmente und Accu-Prime (Invitrogen), bei der eine vollständige Übereinstimmung von Oligonukleotiden und Template-DNA Voraussetzung für eine erfolgreiche Amplifikation ist. Neben den Puffern des Herstellers enthielten die Reaktionsansätze in einem Volumen von 50 µl 0,2 mM Desoxyribonukleosid 5'-Triphosphat (Pharmacia), 10 - 30 pmole des Oligonukleotids, 1 - 2 Einheiten der jeweiligen DNA-Polymerase und 100 ng DNA. Nach einem einleitenden Denaturierungsschritt wurden die PCR-Ansätze in einem UNO II Thermocycler (Biometra) 30 Zyklen unterzogen, wobei jeder Zyklus aus einem Denaturierungsschritt (95°C für 1 min), einem „Annealing“-Schritt (meist 48°C für 1 min, je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide) und einem Extensionsschritt (60 - 72°C für 1 - 2 min/kb des zu amplifizierenden Fragments, abhängig von der Effizienz der verwendeten Polymerase) bestand.

2.5.12 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde der Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma) verwendet. Hierbei erfolgt die cDNA-Synthese und anschließende PCR mit spezifischen Oligonukleotiden in einem Schritt. Die Reaktion wurde nach Anweisung des Herstellers vorgenommen. Als Vorlage wurde dazu 20 ng plasmodiale oder humane Gesamt-RNA eingesetzt. Die Erststrang-Synthese erfolgte für 50 min bei 48°C und die anschließende PCR verlief wie bereits 2.5.11 beschrieben, allerdings wurden in diesem Fall 35 Zyklen durchgeführt.

2.5.13 Restriktionsverdau von DNA

Für einen Restriktionsverdau wurden 1 - 10 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs oder Roche) in dem vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer für 2 - 14 h (bei gDNA für Southern-Blots bis zu 72 h)

inkubiert. Das Reaktionsvolumen lag zwischen 10 µl für analytische und 50 - 150 µl für präparative sowie Southern-Blot Ansätze.

2.5.14 Auftrennung von DNA über Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Flachgel-Apparaturen (Gibco BRL) zu analytischen wie präparativen Zwecken. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden die Proben in 0,8 - 1,5%-igen Agarosegelen in TBE-Puffer aufgetrennt. Präparative Gele wurden unter der Verwendung von TAE hergestellt. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (Life Technologies) verwendet. Die Agarosegele enthielten 0,5 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid, um die aufgetrennte DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen.

2.5.15 Elution und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde aus dem TAE-Gel ausgeschnitten und das Gewicht bestimmt. Anschließend wurde aus dem Agarosestück mittels Gel Purification Kits von Qiagen die DNA isoliert und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.5.16 Aufreinigung von DNA über DNA-Affinitätsäulen

Für die Aufreinigung von homologen PCR-Produkten oder linearisierten DNA-Fragmenten wurde der Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder MicroSpin™ S-300 HR Columns (Amersham Bioscience) nach Angaben der Hersteller benutzt. Mit dieser Methode wurden Enzyme und Salze sowie freie Nukleotide und kleine DNA-Fragmente bis zu einer maximalen Größe von 100 bp von dem gewünschten DNA-Fragment separiert.

2.5.17 Auffüllen und Entfernen der 5'- und 3'- DNA-Enden

Nach einem bidirektionalen Verdau wurde mittels T4 DNA Polymerase (NEB) der 3'-Überhang entfernt und das 5'-Ende aufgefüllt. Etwa 500 ng geschnittener DNA wurden mit 3 U T4 DNA Polymerase und 200 µM dNTP (je 50 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP)

versehen und in 1xT4 DNA Polymerase Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und ligiert.

2.5.18 Durchführung der E. coli-Transformation

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen zusammen mit 5 - 10 µl eines Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 60 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nachdem die Zellen kurz auf Eis abgekühlt worden waren, wurden 800 µl LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 30 - 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Platten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausgestrichen (Ampicillin: 50 µg ml⁻¹, Kanamycin: 10 µg ml⁻¹, Chloramphenicol: 34 µg ml⁻¹) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Fall von Transformationsvektoren, die eine Blau-Weiß-Selektion erlauben, wurden zuvor 70 µl 0,1 M IPTG und 100 µl 20 mg ml⁻¹ X-Gal (in 2% Dimethylformamid gelöst) auf der LB-Agar-Platte verteilt. Weiße Kolonien tragen eine Insertion im Vektor, während blaue Kolonien nur leere Plasmide besitzen.

2.5.19 Entfernung der Plasmid PCR-Vorlage

Nach einer PCR, bei der ein Plasmid als Vorlage diente, sollte vor Ligation und Transformation in *E. coli*-Zellen die Vorlage entfernt werden. Hierzu wurden nach der PCR 1 µl *Dpn* I (20 U) direkt zum PCR-Ansatz gegeben und für 1 h bei 37°C behandelt. Anschließend wurde das entstandene PCR-Fragment mittels PCR Purification Kit aufgereinigt.

2.5.20 Subklonierung in pCR2.1-TOPO

Mit *Taq*-Polymerase hergestellte PCR-Produkte wurden in einem Gesamtvolumen von 5 µl mit 1 µl des pCR2.1-TOPO-Vektors (Invitrogen) und 1 µl der vom Hersteller mitgelieferten Salzlösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Produkt nach Angaben des Herstellers in chemisch kompetente One Shot *E. coli*-Zellen transformiert und auf mit 50 µg ml⁻¹ Ampicillin versehenen LB-Agar-Platten ausgestrichen.

2.5.21 Klonierung in Expressionsvektoren

Sowohl die Plasmidvektoren als auch die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen verdaut. Im Falle eines Einzelverdaus wurden die 5'-Phosphat-Enden des Vektors mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt, um eine Selbstligation des Vektors in der anschließenden Ligationsreaktion zu verhindern. Für die Ligation wurden in einem Gesamtvolumen von 15 - 20 µl etwa 50 ng des Plasmidvektors mit einem mindestens dreifach molaren Überschuss an aufgereinigtem PCR-Produkt, 20 U T4-DNA Ligase und 1xLigationspuffer zusammengegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert und am nächsten Tag in *E. coli*-Zellen transformiert.

2.5.22 Ortsgerichtete Mutagenese-PCR

Punktmutationen wurden mit dem Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene eingeführt. Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl mit *Pfu* DNA-Polymerase unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 30 sec bei 95°C, 16x (30 sec bei 95°C, 1 min bei 48°C, min = 2x Anzahl der kb der Template-DNA bei 68°C). Gleich danach wurde das Template mit 20 U *Dpn* I für 1 h bei 37°C verdaut. Von der Reaktion wurde 1 µl für die Transformation in chemisch-kompetente XL Gold *E. coli*-Zellen verwendet.

2.5.23 Herstellung kompetenter Zellen

Eine Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis gestellt, dann bei 4°C für 10 min bei 2'000x g abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem 80 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach weiteren 30 min auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, anschließend in 5 ml 20% Glycerol in 80 mM CaCl₂ aufgenommen, auf 100 µl-Aliquots verteilt und bei -80°C gelagert.

2.5.24 Einfrieren von E. coli-Stabilaten

Für die längere Aufbewahrung von *E. coli*-Zellen wurde eine Glycerin-Kultur hergestellt. Hierbei wurde 1 ml der Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 sec bei 10'000 rpm (Eppendorfszentrifuge) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 500 µl sterilem LB-Medium (mit dem entsprechendem Selektions-Antibiotikum) aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend mit 250 µl sterilem 100%-igem Glycerin gemischt und bei -20°C oder -80°C gelagert.

2.5.25 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Als Eichsubstanz wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Die Messung erfolgte bei 595 nm im Spectrophotometer (Uvicon 932).

2.5.26 SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Lämmli (1970) durchgeführt. Die aufzutragenden Proben (aufgereinigtes Protein oder Zellextrakt) wurden mit 4-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer gemischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und bei 10'000x g für 5 min bei RT abzentrifugiert. Für die Trennung wurden Mighty Small Gel Kammern (Hoefer) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 20 - 35 mA durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente der Prestained Proteinmarker (Biorad).

2.5.27 Natives Gel

Hierzu wurde etwa 30 µg Protein unter nicht-denaturierenden Bedingungen auf ein 4% - 20% Tris-Glycin Precast Gel (Novagen und BIOZYM) geladen und bei 10 mA über Nacht bei 4°C aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt. Um die Färbung zu verstärken, wurde das Gel vorher für 10 min in 0,1% SDS eingelegt.

2.5.28 Färbung der Proteingele mit Coomassie-Blau

Das Polyacrylamidgel wurde für 30 min in 0,1% (w/v) Coomassie-Blau R-250 in 10% (v/v) Essigsäure und 50% (v/v) Ethanol gefärbt und anschließend mit der Entfärbelösung (10% Essigsäure, 20% Ethanol) behandelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

2.5.29 Western-Blot Analyse – Transfer von Proteinen

Aufgereinigte Proteine oder Zellextrakte wurden in einem 10%-igem Trenngel aufgetrennt und nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) bei 2,5 mA cm⁻³ für mindestens 45 min auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der Blot wurde anschließend in 3% BSA in 1x PBS über Nacht bei 4°C geblockt. Der erste Antikörper wurde 1:2'000 bis 1:20'000 (in 1x PBS, 1% BSA verdünnt) eingesetzt. Der zweite Antikörper wurde im Falle der Detektion mittels HRP 1:10'000 (in 1x PBS, 1% BSA verdünnt) verwendet. Die Inkubationszeiten waren jeweils 1 h bei RT. Dazwischen und danach wurde der Blot jeweils für 3x10 min in 1x PBS, 0,05% Tween gewaschen. Die Nachweisreaktion wurde nach Anweisungen des Enhanced Chemiluminescence (ECL) Plus Western-Blot Detectionssystem (Amersham) durchgeführt. Der Blot wurde anschließend auf einem Röntgenfilm (Retina) exponiert und entwickelt.

2.5.30 Strippen des Western-Blots

Der Western-Blot wurde in 1x PBS eingeweicht. Zum Entfernen der Antikörper wurde der Blot in 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 2,5 für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 1 N NaOH (1:250) wurde die Reaktion gestoppt. Der Blot wurde mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 3% BSA (in 1x PBS gelöst) geblockt.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kulturführung von *P. falciparum*

Die Plasmodien wurden in RPMI-HEPES Medium bei einem Hämatokritwert von 2% - 5% bis zu einer Parasitämie von maximal 30% kultiviert. Dabei wurde die Kultur alle 2 Tage

1:5 bzw. 1:10 verdünnt. Für die Kultivierung der Plasmodien wurde Erythrozyten-Konzentrat der Blutgruppe A⁺ verwendet. Die Plasmodien wurden in Petrischalen (Durchmesser 9,2 cm, Nunclon) oder Kulturflaschen (150 cm², Nerbe) in einer Atmosphäre aus 90% N₂, 5% O₂, 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert (Trager und Jensen, 1976; Jensen und Trager, 1977).

2.6.2 Bestimmung der Parasitämie

Zur Bestimmung der Parasitämie wurden Blutausstriche mit Giemsa-Lösung (1:10 verdünnt in dH₂O) gefärbt und mikroskopisch ausgezählt. Dazu wurden getrocknete Ausstriche zunächst für 30 sec in Methanol fixiert und anschließend für 10 min in einer 10%-igen (v/v) Giemsa-Lösung in Giemsa-Puffer (3,6 mM KH₂PO₄, 6,1 mM Na₂HPO₄) gefärbt. Die Objektträger wurden mit Leitungswasser abgespült, getrocknet und bei 1'000-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch (Zeiss, Jena) untersucht. Die Parasitämie wurde als Prozentwert der infizierten Erythrozyten aus 1'000 ausgezählten Zellen bestimmt.

2.6.3 Erstellung von Wachstumskurven

Um die Parasitämie während einiger Tage zu verfolgen, wurde die Kultur jeden Tag ausgestrichen und mit Giemsa gefärbt. Anschließend wurde wie oben beschrieben die Parasitämie dreifach bestimmt. Ab einer Parasitämie von über 5% wurde die Kultur verdünnt und der Verdünnungsfaktor mit in die Kurvenberechnung einbezogen.

2.6.4 Einbau von radioaktivem Hypoxanthin

Zur Bestimmung des inhibitorischen Effektes einer Substanz auf die Plasmodienkultur wurden jeweils 5 µl des Inhibitors (50-fache Lösung in 50% Ethanol) in 96-Well Mikrotiterplatten (NUNC) vorgelegt; pro Substanz mindestens 4 Ansätze. In jedes Well wurden 250 µl Plasmodienkultur (2% Hämatokrit, 2% Parasitämie, vorwiegend Ringstadien) dazupipettiert und für 24 h oder 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 10 µl [³H]Hypoxanthin-Lösung (10 µCi µl⁻¹, 1:1'000 in H₂O verdünnt) dazugeben und für weitere 24 h inkubiert. Die Ansätze wurden mit einem Vakuumgerät

(Inotech) durch mehrmaliges Absaugen und Fluten auf ein bereits vorgefeuchtetes Filterpapier transferiert. Anschließend wurde das Filterpapier bei 80°C für 20 min getrocknet. Der Filter wurde in eine Plastiktüte überführt, mit 4 ml Scintillatorflüssigkeit versehen und luftblasenfrei eingeschweißt. Die Messung des [³H]Hypoxanthineinbaus erfolgte jeweils für 1 min pro Ansatz in einem Scintillationszähler.

2.6.5 Transfektion von *P. falciparum*

Die genetische Manipulation von *Plasmodium falciparum* erfolgt im Blutstadium. Um Fremd-DNA in den Parasiten zu schleusen, müssen vier Membranen überwunden werden: die Erythrozytenmembran, die Membran der parasitophoren Vakuole, die Parasiten- und die Kernmembran. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Transfektionstechniken angewendet.

2.6.5.1 Elektroporation der Plasmodien im Ringstadium

Eine 5%-ige hochsynchronisierte Plasmodienkultur im Ringstadium wurde bei 1'500 rpm (Heraeus) für 5 min pelletiert. 100 µg zirkulärer DNA wurde in 15 µl TE gelöst, mit 385 µl Cytomix gemischt und zu 200 µl Zellpellet gegeben. Die DNA-Zellsuspension wurde in eine 0,2 cm Küvette (Biorad) überführt und in einem GenePulser (EquiBio) bei 0,31 kV und 900 µF elektroporiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen sofort in frisches RPMI-Medium mit 2% Hämatokrit überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und mit 200 nM Pyrimethamin oder 10 nM WR99210 versehen. Die Transfektanden wurden an den ersten beiden Tagen mit 200 nM, danach mit 100 nM Pyrimethamin selektiert. Während der ersten 10 Tage nach der Transfektion wurde täglich das Medium gewechselt. Danach alle 2 Tage, bis erste Transfektanden sichtbar waren.

2.6.5.2 Transfektion der Erythrozyten – spontane DNA-Aufnahme durch den Parasiten

Diese Methode ist weitaus schonender für die Plasmodien, da nur nichtinfizierte Erythrozyten dem elektrischen Impuls ausgesetzt werden. Frische Erythrozyten wurden in 10 vol kaltem Cytomix gewaschen und bei 1'500 rpm für 5 min bei 4°C (Heraeus)

abzentrifugiert. 100 µg zirkulärer DNA wurde in 50 µl TE resuspendiert. Von den gewaschenen Erythrozyten wurden 450 µl zu der DNA pipettiert, das Gemisch in eine 0,2 cm Küvette überführt und bei 310 V und 900 µF im GenePulser elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml RPMI-Medium gegeben. Eine 10%-ige hochsynchrone Plasmodienkultur im Schizontenstadium wurde bei 1'500 rpm (Heraeus) pelletiert und jeweils 50 µl gepackte Zellen zu den transfizierten Erythrozyten gegeben. Die Selektion wurde wie in der vorangehenden Methode (siehe 2.6.5.1) vorgenommen.

2.6.6 Selektion der Integration durch Doppelcrossover

Zellen, die mit DNA-Konstrukten transfiziert wurden, welche eine virale Thymidinkinase trugen, konnten durch negative Selektion mittels Ganciclovir auf ein Doppelcrossover-Ereignis selektiert werden. Diese Methode (Duraisingh et al., 2002) nutzt die Phosphorylierungsaktivität der viralen Thymidinkinase aus, wodurch aus dem Guanin-Analogon Ganciclovir ein toxisches Nukleosid entsteht. Wird dieses in die DNA eingebaut, kommt es zu deren Kettenabbruch. Nur die Transfektanden, welche die Transfektionskassette in ihr Genom integriert haben, überleben. Alle die das Episom noch nicht verloren haben, gehen ein. Sobald die ausreichende Menge Transfektandenkultur vorhanden war, wurde die Hälfte der Kultur mit 4 µM Ganciclovir selektioniert.

2.6.7 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer

Um die absolute Anzahl Erythrozyten in einer Kultur zu ermitteln, wurde die Kultur zuerst 1:20 in RPMI-Medium verdünnt. Anschließend wurden 10 µl dieser Verdünnung in eine Neubauerkammer von 0,1 mm x 0,0025 mm² pro Kleinquadrat (Assistent) gegeben und lichtmikroskopisch ausgezählt. Ein Großquadrat entspricht 16 Mittelquadraten und 256 Kleinquadraten und hat somit ein Volumen von 0,0064 µl. Die Anzahl ausgezählter Zellen multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 20, multipliziert mit 15625, ergibt die Anzahl Zellen pro ml.

2.6.8 Isolierung von Parasitenklonen mittels limitierter Verdünnung

Um Einzelklone aus einer gemischten Kultur zu erhalten, wird zuerst die Parasitämie durch Auszählen eines Giemsa-gefärbten Ausstriches ermittelt und die Gesamtzellzahl der Kultur in einer Neubauerkammer bestimmt. Von der Plasmodienkultur werden 1×10^6 Zellen in 10 ml RPMI-Medium überführt. Mit Hilfe der Parasitämie kann die absolute Anzahl der Parasiten in diesen 10 ml berechnet werden. Um die Parasiten zu vereinzeln, wurden die Zellen in RPMI-Medium mit 2% Erythrozyten so verdünnt, dass ein Parasit pro 1 ml vorliegt. Anschließend wurden je 200 μ l der verdünnten Zellsuspension auf eine 96-Well Rundbodenplatte (Falcon) verteilt, so dass sich in jedem fünften Well ein Parasit befand. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt und dabei dessen Färbung beobachtet. Verfärbt sich das Medium gelblich, deutet dies auf eine Ansäuerung des Kulturmediums und damit auf Wachstum der Plasmodien hin. Die Zellen verfärbter Wells wurden ausgestrichen und mikroskopisch untersucht.

2.6.9 Anreicherung der infizierten Erythrozyten im Percoll-Alanin Gradienten

Die infizierten und nichtinfizierten Erythrozyten sowie Plasmodien in verschiedenen Stadien können nach Behandlung mit 3%-igem Alanin aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte voneinander getrennt werden. Je älter der Parasit, desto mehr Alanin kann vom Erythrozyt aufgenommen werden. Zur Erstellung des Dichtegradienten diente Percoll, ein mit Polyvinylpyrrolidon beschichtetes Kieselgel (Aley et al., 1986; Kanaani und Ginsburg, 1989). Als erstes wurde eine 90%-ige Percoll-RPMI Lösung mit 3% Alanin (Percoll-Alanin) hergestellt und 5 ml davon in ein 50 ml-Falcongefäß gegeben. Anschließend wurden 2 ml von 80%-igem Percoll-Alanin vorsichtig darüber geschichtet, gefolgt von einer 70%-igen Percoll-Alanin-Schicht. Die Lösungen wurden jeweils von dem 90%-igem Percoll-Alanin ausgehend mit 3% Alanin (in 0,9% NaCl gelöst) verdünnt. Um die 200 ml Kultur auf den Gradienten aufzutragen, wurde diese zuerst für 5 min bei 1'500 rpm (BS4402/A-Rotor, Heraeus) pelletiert und in 1 vol 0,9% NaCl resuspendiert. Die nichtinfizierten Erythrozyten befanden sich nach dem Zentrifugationsschritt von 2'500 rpm (Heraeus) für 10 min bei RT und ohne Bremse in der untersten, 90%-igen Lösung, gefolgt von den mit Ringstadien infizierten Zellen. Alte Ringstadien befanden sich in der 80%-igen Schicht und Trophozoiten sowie Schizonten zwischen dem 80%- und 70%-igen Percoll-Alanin. Nach dem Auftrennen wurden die jeweiligen Plasmodienstadien mit einer 1 ml-Pipette in ein

neues 50 ml-Falcongefäß überführt und zweimal mit kaltem 0,9%-igem NaCl für 5 min bei 2'000 rpm und 4 °C gewaschen.

2.6.10 Isolierung der Parasiten mittels Saponin

Mittels Saponin werden die Membranen der Wirtszelle denaturiert. Dazu wurde die Kultur bei 1'500 rpm (Heraeus) für 10 min bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 vol 0,2% Saponin (in HT-PBS gelöst) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3'000 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert, mit kaltem HT-PBS gewaschen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Parasitenpellet wurde in einer Eppendorfsentrifuge bei 5'000 rpm kurz abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die isolierten Parasiten wurden bei -70 °C gelagert.

2.6.11 Behandlung der infizierten Erythrozyten mit Streptolysin O (SLO)

Die Behandlung infizierter Erythrozyten mit SLO führt zur Ausbildung von Poren in der Erythrozytenmembran, wodurch das Cytosol der Erythrozyten ausfließt, die Membranstrukturen sowie die parasitophore Vakuole des Parasiten jedoch erhalten bleiben (Bhakdi et al., 1985; Ansorge et al., 1997). Die Kultur wurde bei 1'500 rpm (Heraeus) für 10 min abzentrifugiert, je 20 µl des Pellets in 180 µl HT-PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 16 µl SLO-Lösung (100 µg/1,12 ml eiskaltem 2,33 mM KH₂PO₄, 8,33 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, aliquotiert und bei -70 °C gelagert) versehen. Der Ansatz wurde für 6 min bei RT inkubiert und alle 2 min vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die Zellen bei 5'000 rpm in einer Eppendorfsentrifuge für 5 min pelletiert und der Überstand für weitere Untersuchungen in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde zweimal in HT-PBS gewaschen.

2.6.12 Synchronisierung mit Sorbitol

Um mit Ringstadien infizierte Erythrozyten zu erhalten, wurde die Kultur bei 1'500 rpm (Heraeus) für 5 min bei RT pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 vol 5% Sorbitol (in HT-PBS gelöst) resuspendiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden wie

oben beschrieben abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und zurück in die Kulturschale gegeben.

2.6.13 Einfrieren der Plasmodienkultur

Zum Einfrieren von Plasmodien sollten mindestens 3% der Erythrozyten mit Ringstadien infiziert sein. Die Kultur wurde bei 1'500 rpm (Heraeus) für 10 min pelletiert und in 1 vol RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 2 vol sterilem 30%-igem Glycerin (in HT-PBS) gemischt und die Suspension in ein Kryo-Röhrchen (1,8 ml Nunclon) transferiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff (bei -196 °C) gelagert wurden.

2.6.14 Auftauen der Plasmodienkultur

Das tiefgekühlte Stabilat wurde im Wasserbad bei 37 °C langsam unter leichtem Schütteln aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 2 vol kaltes 27%-igem Sorbitol (in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4) tropfenweise dazugegeben. Die Zellsuspension wurde für 13 min auf Eis gestellt, bevor 2 vol kaltes 5%-iges Sorbitol (in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4) auf die gleiche Weise dazupipettiert und die Zellen weitere 10 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen bei 1'500 rpm (Heraeus) für 5 min und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 2 vol 5%-igem Sorbitol vorsichtig resuspendiert und weitere 8 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen wiederum pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in frischem RPMI-Medium aufgenommen und in eine Kulturschale überführt.

2.6.15 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Von einer mindestens 5%-igen Plasmodienkultur wurden Ausstriche für 5 min in eiskaltem Methanol fixiert und anschließend an der Luft getrocknet. Ausstriche, die erst später analysiert wurden, wurden in Papiertücher eingerollt und luftdicht eingeschweißt bei -80 °C gelagert. Auf dem Objektträger wurden mit einem Fettstift Bereiche abgegrenzt, damit auf einem Ausstrich verschiedene Antikörperkonzentrationen getestet

werden konnten. Anschließend wurden die Ausstriche für 10 min in HT-PBS equilibriert. Der erste Antikörper (in HT-PBS verdünnt) wurde auf den Objektträger gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem, 10-minütigem Waschen mit HT-PBS wurde für eine weitere Stunde mit dem zweiten Antikörper und DAPI (beides 1:2'000 in HT-PBS verdünnt) inkubiert und wiederum dreimal 10 min mit HT-PBS gewaschen. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt, ein bis zwei Tropfen Fluorescent Mounting Medium aufgetragen und nach Auflegen des Deckglases mit Nagellack fixiert. Die Ausstriche wurden anschließend in einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus) bei 1'000-facher Vergrößerung analysiert.

2.7 Methoden zur Charakterisierung der plasmodialen Arginase (PfARG)

2.7.1 Stadienspezifische Transkription (Northern Blot)

Plasmodium falciparum wurde mit 5% Sorbitol synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen 14 ± 4 h (Ringstadien und junge Trophozoiten), 28 ± 4 h (alte Trophozoiten) und 38 ± 4 h (Schizonten) post Infektion abgeerntet. Die Parasiten wurden hierzu mittels Saponinlyse isoliert und die Gesamt-RNA durch Trizolbehandlung extrahiert. Es wurden 25 µg RNA in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und mittels Northern-Blot (Kyes et al., 2000) analysiert.

2.7.2 Klonierung der PfARG

Mittels RT-PCR wurde der offene Leserahmen der *PfARG* nach Angaben des Herstellers mit dem Enhanced Avian RT-PCR Kit von Plasmodien Gesamt-RNA amplifiziert. Hierzu wurden die folgenden Oligonukleotide synthetisiert, Sense: 5'-GCGCGCGGTCTCCAATGTTGGATACTATAGAAAGTTACATC-3' und Antisense: 5'-GCGCGCGGTCTCCGCGCTCACTATATCGTATCCTAACACTCGGG-3'. Das per PCR amplifizierte Gen der *PfARG* wurde vorerst in den pCR 2.1-TOPO Vektor nach Anweisungen des TOPO TA Cloning Kit kloniert. Anschließend wurde auf diesem Konstrukt eine weitere PCR durchgeführt. Das Produkt wurde mit *Bsa* I geschnitten und in den *Eco31I* verdauten Vektor pASK-IBA3 mittels T4-DNA Ligase ligiert. Das Plasmid

besitzt einen C-terminalen *Strep*-tag zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Die Ligation wurde in chemisch-kompetente DH5 α *E. coli*-Zellen transformiert.

2.7.3 Sequenzierung der PfARG

Die Sequenzierung wurde auf dem pTOPO-PfARG Konstrukt, wie unter 2.5.8 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet: (Arg-1-s) 5'-TATTGGTTCTCCTCTTGCCGC-3', (Arg-2-s) 5'-GGAAATATGAAGATATAGGC-3', (Arg-3-s) 5'-GTTATATTCCCAATGGTG-3', (Arg-4-s) 5'-GAATAATGTAATATCAACAAACG-3', (Arg-5-s) 5'-GTATTAATATAGGGGGTG-3', (Arg-6-s) 5'-CCTGAAACATCTCCTTCAGG-3', (Arg-7-s) 5'-GAAAATACAGCTATTATAGG-3', (Arg-8-s) 5'-GATCCAAATTCAAATTGCC-3', (Arg-9-s) 5'-AGCTGAAACAAAAGAGTTGTC-3', (Arg-10-s) 5'-GCCTATATTGGATAATGCAACG-3'.

2.7.4 Herstellung der PfARG-Mutanten

Zur Untersuchung konservierter Aminosäuren in der plasmodialen Arginase wurden Mutationen mittels ortsgerichteter Mutagenese-PCR, wie unter 2.5.22 beschrieben, eingeführt. Hierzu wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet, wobei die unterstrichenen Nukleotide der jeweiligen Mutation entsprechen:

ArgE347Q-s	5'-GGGGGGATTAAATTATAGACA <u>AA</u> ATTAATTTATTAATGAAAATATTAGC-3'
ArgE347Q-as	5'-GCTAATATTTTCATTAATAAATTAAT <u>TT</u> GTCTATAATTTAATCCCCC-3'
ArgH193A-s	5'-GTATTAATATAGGGGGTGAC <u>GC</u> AGGTGTAGCTTTTAGTAGTATCCTG-3'
ArgH193A-as	5'-CAGGATACTACTAAAAGCTACACCT <u>GC</u> GTACCCCCTATATTTAATAC-3'
ArgH218A-s	5'-GAGTTATATGGATTGATGC <u>GC</u> AGGTGATATAAACATACCTGAAAC-3'
ArgH218A-as	5'-GTTTCAGGTATGTTTATATCACCT <u>GC</u> TGCATCAATCCATATAACTC-3'
ArgH233A-s	5'-CATCTCCTTCAGGTAATTAT <u>GC</u> AGGTATGACTTTAGCACACACCTTAG-3'
ArgH233A-as	5'-CTAAGGTGTGTGCTAAAGTCATACCT <u>GC</u> CATAATTACCTGAAGGAGATG-3'
ArgD216A-s	5'-CAGAATTTAAGAGTTATATGGATT <u>GC</u> AGCACATGGTGATATAAACATACCT-3'
ArgD216A-as	5'-AGGTATGTTTATATCACCATGTGCT <u>GC</u> AATCCATATAACTCTTAAATTCTG-3'
ArgD220A-s	5'-GTTATATGGATTGATGCACATGGT <u>GC</u> AATAAACATACCTGAAACATCT-3'
ArgD220A-as	5'-AGATGTTTCAGGTATGTTTAT <u>GC</u> ACCATGTGCATCAATCCATATAAC-3'
ArgD323AD325A-s	5'-TGCCCTATTCACATCTCTTTAG <u>CA</u> ATAG <u>CA</u> AGTGTGATAATGTCTTTGCT-3'
ArgD323AD325A-as	5'-AGCAAAGACATTATCAACACT <u>GC</u> TATT <u>GC</u> TAAAGAGATGTGAATAGGGCA-3'

2.7.5 Expression und Aufreinigung der rekombinanten PfARG

Die in das Plasmid pASK-IBA3 klonierte *PfARG* wurde in BL21-Codon-Plus DE3-RIL Expressionszellen transformiert. Eine einzelne Kolonie wurde für eine Übernachtskultur in LB-Medium angesetzt. Diese Vorkultur wurde 1:50 verdünnt für die 500 ml-Expressionskultur verwendet. Als die Kultur eine A_{600} von 0,5 erreicht hatte, wurde die Expression mit 200 ng ml^{-1} Anhydrotetracyclin (AHT) induziert und die Zellen für 4 h bei 37°C kultiviert. Die Kultur wurde pelletiert und in 100 mM TrisHCl Puffer pH 8,0 aufgenommen. Nach Zugabe von Lysozym wurde das Zellhomogenat 20 min auf Eis inkubiert, beschallt (Branson Sonifier 250) und anschließend bei $100'000 \times g$ (Ultrazentrifuge) abzentrifugiert. Aufgrund des C-terminal an das rekombinante Protein fusionierten *Strep*-tags konnte das entstandene Protein mittels Affinitätschromatographie über eine *Strep*-Tactin-Säule nach Angaben des Herstellers (IBA, Göttingen) bei 4°C aufgereinigt werden. Um die Aktivität der Arginase zu bestimmen wurde das aufgereinigte Protein über Nacht in 1'000-fachem Volumen gegen einen EDTA-freien Puffer bei 4°C dialysiert.

2.7.6 Gelchromatografie zur Bestimmung der nativen Struktur

Um die oligomere Konformation der plasmodialen Arginase zu ermitteln, wurde diese affinitätschromatographisch aufgereinigt und anschließend auf eine „Fast Protein Liquid Chromatography“ (FPLC) gegeben. Es wurden drei unterschiedliche Säulen (Amersham) eingesetzt. Für native Proteine mit einer molekularen Masse über 75 kDa wurde eine Superdex S-200 (2,6 x 60 cm), für kleinere als 75 kDa eine Superdex S-75 (1,6 x 60 cm), beide mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml min^{-1} verwendet. Für analytische Studien wurde zusätzlich eine Superdex S-200 (1 x 30 cm) bei $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ benutzt. Die Elution wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 mM DTT sowie entweder mit 2 mM EDTA oder mit 1 mM MnCl_2 durchgeführt. Die *PfARG* enthaltenden Fraktionen wurden entweder über Proteinbestimmung nach Bradford, über die Bestimmung der Arginaseaktivität oder über Western-Blot Analyse identifiziert.

2.7.7 Nachweis der strukturellen Manganabhängigkeit

Hierzu wurde etwa 30 µg der rekombinanten PfARG in An- und Abwesenheit von MnCl₂ unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einem 4% - 20%-igem Tris-Glycin Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

2.7.8 Antikörperherstellung im Huhn und Aufreinigung

Vor der Immunisierung des Huhns wurde dieses zuerst auf Kreuzreaktion mit Plasmodienextrakt getestet. Das Huhn wurde mit 100 - 200 µg Protein subkutan immunisiert. Hierzu wurde das Protein vor der Injektion auf 100 µl eingeeengt und mit 100 µl Freund's Adjuvant (complete) gut gemischt. Nach zwei Wochen wurde eine weitere Injektion vorgenommen, wobei das Protein in gleichem Volumen mit Freund's Adjuvant (incomplete) versehen war. Diese Immunisierung wurde nach zwei weiteren Wochen nochmals wiederholt. Nach drei Wochen wurde die erste Aufreinigung des Huhnantisera vorgenommen. Hierbei wurde das Eigelb von dem Eiweiß getrennt und mit dH₂O gespült. Die Dotterhaut wurde mit einem Skalpell aufgeritzt und der Inhalt in einem 50 ml-Falcongefäß aufgefangen. Das Eigelb wurde mit 1 Vol 10 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH 7,2, 100 mM NaCl (KP-Puffer) gemischt. Anschließend wurden 2 Dottervolumen 7% PEG 6'000 in KP-Puffer dazugegeben und der Ansatz für 30 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Emulsion wurde für 10 min bei 10'000 rpm (Sorvall) und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde im Überstand die Menge an PEG 6'000 gelöst, die eine Endkonzentration von 12% PEG 6'000 (w/v) ergab. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 min bei 10'000 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml KP-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde der Suspension 1 Vol 24% PEG 6'000 in KP-Puffer zugegeben und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml KP-Puffer resuspendiert und für 15 min bei 10'000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Antiserum) wurde vorsichtig abpipettiert und durch Zugabe von NaN₃ 0,02% (v/v) konserviert.

2.7.9 Dot-Blot der PfARG-Mutanten

Um die Konformation der verschiedenen PfARG-Mutanten zu analysieren, wurden diese nach Aufreinigung über eine Superdex S-200 (1x30 cm) fraktioniert und mit einer Dot™ Apparatur (Biorad) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde diese per Western-Blot analysiert.

2.7.10 Western-Blot Nachweis der PfARG

Das rekombinante Protein sowie Zellpellet und -überstand der Saponin- und SLO-Behandlung wurden in einem 10%-igem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Als erster Antikörper wurde für den Nachweis der plasmodialen Arginase der Anti-PfARG-Antikörper (1:2'000 in 1x PBS, 1% BSA verdünnt) verwendet. Als zweiter Antikörper wurde ein HRP gekoppelter Maus-Anti-Huhn-Antikörper (1:10'000 in 1x PBS, 1% BSA, 0,05% Tween verdünnt) eingesetzt.

2.7.11 Immunlokalisierung der PfARG

Die Lokalisierung der plasmodialen Arginase in der Parasit-Wirt Einheit wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Der Anti-PfARG-Antikörper aus dem Huhn wurde hierfür 1:200 in 1xHT-PBS verdünnt eingesetzt. Als zweiter Antikörper diente der 1:2'000 verdünnte FITC markierte Esel-Anti-Huhn-Antikörper. Als Kernfärbung wurde DAPI (1:2'000) verwendet.

2.7.12 Aktivitätsnachweis der PfARG

2.7.12.1 Colorimetrischer Enzymtest (Archibald, 1945)

Der Enzymtest beruht auf dem Nachweis des bei der Reaktion entstehenden Harnstoffes. Im Test wurden 3 µg rekombinant hergestellte PfARG in einem Endvolumen von 750 µl (50 mM Tris-HCl, 30 mM L-Arginin, 1 mM MnCl₂ und 1 mM DTT bei pH 8) eingesetzt. Der Ansatz wurde in einem Eppendorfgefäß 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde 10 min bei 95 °C gestoppt und kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurden 700 µl des Ansatzes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl H₂SO₄:H₃PO₄:H₂O (1:3:1 v/v/v) und 40 µl α-Isonitroso-Propiophenon gemischt und 1 h bei 100 °C gekocht. Nach

Inkubation im Dunkeln für 15 min bei RT wurde die Harnstoffmenge bei 540 nm im Photospektrometer bestimmt.

2.7.12.2 Radioaktiver Enzymtest (Boucher et al., 1994)

Beim radioaktiven Enzymtest wurde die Aktivität anhand des Umsatzes von uniform markiertem [^{14}C]Arginin zu radioaktivem Ornithin und Urea gemessen. Das über *Strep-tactin* Sepharose aufgereinigte Enzym wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, dialysiert und mit 1 mM MnCl_2 , 3 mM Arginin und 100 nCi U[^{14}C]Arginin in einem Endvolumen von 100 μl bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen für 5 min gestoppt und bei 12'000x g 2 min abzentrifugiert. 10 μl des Reaktionsansatzes wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie (Linaer-K Silika Gel, Whatman) für 2,5 h analysiert. Dabei erfolgte eine Trennung der entstandenen Reaktionsprodukte. Als Kontrolle wurden Ornithin sowie Citrullin separat mit aufgetragen. Das Laufmittel bestand aus einem Gemisch aus Chloroform:Methanol:Ammoniak:H₂O (1:4:2:1 v/v/v/v). Die entstandenen Punkte wurden durch Autorografie visualisiert und anschließend mittels Liquid Scintillation Analyser (TRI-CARB 2'000 CA, United Instruments Packard) quantifiziert.

2.7.13 Testen verschiedener Kationen als Kofaktoren

Die Aktivität der Arginase wurde in Anwesenheit verschiedener divalenter Kationen (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+}) in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM und 5 mM nach der Methode von Archibald (1945) getestet.

2.7.14 Temperaturstabilität der PfARG

Das aufgereinigte und dialysierte Enzym wurde bei verschiedenen Temperaturen (0°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C und 80°C) in Tris-HCl, 1 mM MnCl_2 , 1 mM DTT, bei pH 8,0 sowie bei pH 9,0 für 10 min präinkubiert. Anschließend wurde die Arginaseaktivität im Colorimetrischen Enzymtest bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde wie folgt berechnet: gebildetes Urea [μMole] pro min pro eingesetztem Enzym [mg].

2.7.15 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des optimalen pH-Bereichs wurden zwei unterschiedliche Puffersysteme verwendet. Für den unteren pH-Bereich von pH 6,5 bis pH 8,5 wurde ein 100 mM Tris-HCl Puffer und für den oberen von pH 8,0 bis pH 10,5 ein 100 mM Glycin-NaOH Puffer eingesetzt. Der Aktivitätstest erfolgte nach Archibald (1945).

2.7.16 Inhibierung der rekombinant hergestellten PfARG

Um den K_m -Wert der Arginase sowie die K_i -Werte zweier Arginaseinhibitoren zu bestimmen, wurde der Aktivitätstest nach Archibald (1945) angewandt. Hierzu wurden bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM L-Arginin) die folgenden, in dH₂O gelösten Arginaseinhibitoren NOHA und nor-NOHA von 0 - 20 μ M eingesetzt. Anschließend wurden der K_m -Wert und die K_i -Werte per GraphPadPrism 1.02 bestimmt.

2.7.17 Inhibierung der PfARG in Kultur

Die Hemmung der plasmodialen Arginase in der Zellkultur wurde mittels Einbau von radioaktivem Hypoxanthin ermittelt. Vor dem Ansetzen des Testes wurde sowohl die Kultur als auch die nichtinfizierten Erythrozyten in argininfreiem Medium (RPMI 1640 Mangelmedium) gewaschen. Die Inhibitoren NOHA, nor-NOHA, ABH und BEC wurden in 50% Ethanol gelöst, in den Konzentrationen 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M und 500 μ M eingesetzt und für 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Testansatz auf ein Filterpapier transferiert und im Triluxgerät gemessen.

2.8 ***Klonierung und Expression der putativen LDC von *P. falciparum****

Der ORF von PFD0285c (PlasmoDB) wurde mittels RT-PCR nach Angaben des Herstellers mit dem Enhanced Avian RT-PCR Kit von Plasmodien Gesamt-RNA isoliert. Mittels PCR auf die erzielte cDNA mit den Oligonukleotiden Sense 5'-GCGCGCCTCGAGAAGTTATCCAATGAC-3' (*Xho* I-Schnittstelle unterstrichen) und Antisense 5'-GCGCGCGGGCCCTCACTTGTGTTTGGTTTC-3' (*Apa* I-Schnittstelle

unterstrichen) wurden 7'248 kb amplifiziert, mit *Apa* I und *Xho* I geschnitten und in den ebenso verdauten Vector pJC40 kloniert. Nach Isolierung des richtig integrierten Klons wurde dieser in verschiedenen *E. coli*-Zellen BL21(DE3)-RIL, BL21 (DE3)-pAPlac, Rosetta GamiB, EWH 331 und BL21(DE3)-pLys transformiert. Die Expression wurde durch IPTG induziert und erfolgte für 4h bei 37 °C und bei RT sowie über Nacht bei 19 °C und bei RT.

2.9 Erstellung des computerbasierten Strukturmodells der PfARG

2.9.1 Herstellung und Bearbeitung des Alignments

Da Strukturmodelle auf der Kristallstruktur eines sehr homologen Proteins basieren, musste als erstes ein multiples Sequenz-Alignment von Aminosäuresequenzen verschiedener Organismen erstellt werden. Hierzu wurden die durch das Internet zugänglichen Programme ClustalW und T-Coffee verwendet. Die Sequenzidentitäten wurden mit GraphAlign ermittelt. Anhand des multiplen Sequenz-Alignments wurde die Aminosäuresequenz der *PfARG* mit CINEMA 5 editiert. Das editierte Alignment wurde anschließend auf sekundäre Strukturelemente wie α -Helix und β -Faltblatt untersucht. Das Programm JOY überträgt anhand eines Alignments Strukturinformationen bereits bekannter Aminosäuresequenzen (im PDB-Format) auf die zu untersuchende Sequenz. Dabei werden unter anderem Seitenketten ermittelt, die potentielle Wasserstoffbrücken mit Amid- oder Carbonylgruppen der Hauptkette bilden können, wodurch ein Strukturmotiv stabilisiert wird.

2.9.2 Erstellung des Strukturmodells

Das Strukturmodell der editierten *PfARG*-Sequenz wurde mit der Software MODELLER berechnet. MODELLER ist ein Programm, das kein Interface benutzt, die Eingaben werden ausschließlich auf Befehlsebene geführt. Dies ermöglicht das Einfügen von Substraten, Inhibitoren und, wie im Falle der *PfARG*, des Kofaktors Mangan. Nach dem Erstellen des Modells wurde dieses im PyMOL Viewer visualisiert. Anschließend wurden die beiden Strukturen mit dem Programm ProFIT aufeinander abgestimmt.

2.9.3 Verifizierung des Modells durch Ramachandran Plot

Jede Berechnung einer Struktur führt zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen. Um die am besten passende Struktur zu ermitteln, wurden 20 Modelle der PfARG erstellt. Mittels PROCHECK, einem Programm, welches die stereochemische Qualität eines Strukturmodelles bemisst, wurden alle Aminosäuren anhand ihrer Phi- und Psi-Winkelstellungen jeweils einer der typischen Sekundärstrukturen β -Faltblatt, α -Helix oder „3-turn“ Helix zugeordnet. Das beste Modell ist demnach dasjenige, bei welchem alle Aminosäuren einer jeweiligen Sekundärstruktur zuzuordnen sind. Die graphische Darstellung geschieht in einem sogenannten Ramachandran Plot, der die Aminosäuren anhand der Phi- und Psi-Winkelstellungen den Sekundärstrukturen zuweist.

2.10 Wirkung verschiedener ODC-Inhibitoren auf die Plasmodienkultur

Hierzu wurde die Plasmodienkultur in zwölf 5 ml-Schalen bei 4% Hämatokrit und einer Ausgangs-Parasitämie von ca. 1% kultiviert. Jeweils drei Schalen wurde mit den spezifischen ODC-Inhibitoren 2 μ M 1-Aminoxy-3-Aminopropan (APA), 5 μ M CGP 52622A und 5 μ M CGP 54169A behandelt. Drei weitere Schalen dienten zur Kontrolle (ohne Inhibitoren). Nach 24 h und 48 h wurde in jeweils eine der behandelten Kulturschalen 1 mM Putrescin zugefügt. Die Parasitämie wurde bis zu 120 h durch tägliches Auszählen von Giemsa-gefärbten Ausstrichen mittels Lichtmikroskop bestimmt.

2.11 Methoden zur genetischen Modifikation der AdoMetDC/ODC

Zur Modifikation des AdometDC/ODC Genes in *P. falciparum* wurden 5 Konstrukte hergestellt und in die Parasiten transfiziert: (1) pHTK-SO-Ko (Knockout des gesamten Genes), (2) pHTK-O-Ko (Deletion der ODC-Domäne), (3) pHTK-Om (ODC inaktivierende Doppelmutation), (4) pHTK-Om-still (Stille Mutation der ODC als Kontrolle) und (5) p Δ TK-O-hODCV5 (Knockout der ODC und gleichzeitige Komplementierung durch die humane ODC).

2.11.1 Die „Knockout“-Konstrukte pHTK-SO-Ko und pHTK-O-Ko

Da die 3'-flankierende Sequenz für alle Konstrukte ausser p Δ TK-O-hODCV5 dieselbe ist, wurde das Vorläuferkonstrukt pHTK-3'fl erstellt. Hierzu wurde durch PCR der 3'-Bereich (1056 bp) des AdometDC/ODC-Genes mit dem Primerpaar Sense 5'-CCATCGATTGAGGCGTTAAATATTATTGG-3' (*Cla* I Schnittstelle unterstrichen) und Antisense 5'-GGCCTAGGCAAGTGGTGTGCTAACCAGGT-3' (*Avr* II Schnittstelle unterstrichen) amplifiziert, mit *Cla* I und *Avr* II verdaut und in den bereits geschnittenen pHTK Vektor ligiert. Für die 5'-Flanke (870 bp) des pHTK-SO-Ko wurden die Oligonukleotide Sense 5'-TCCCCGCGCCTTATTGCCCTAGCGTTTAAATGG-3' (*Sac* II unterstrichen) und Antisense 5'-GGACTAGTGGGATAATTTTCGATATATGGATCT-3' (*Spe* I unterstrichen) verwendet, für die 5'-Flanke (848 bp) von pHTK-O-Ko das Primerpaar 5'-TCCCCGCGGCTTCCACATGTTACTCCATATTC-3' (*Sac* II unterstrichen, „TA-frameshift“ fett gedruckt) und 5'-GGACTAGTGGCCTGAAAAGTTGGACGTCTCTTCC-3' (*Spe* I unterstrichen). Die 5'-flankierenden Sequenzen wurden jeweils von genomischer DNA mittels PCR amplifiziert, mit *Sac* II und *Spe* I verdaut und in den ebenso geschnittenen pHTK-3'fl kloniert. In die 5'-Flanke des pHTK-O-Ko Konstruktes wurde zusätzlich ein „TA-frameshift“ (im Sense-Primer fett gedruckt) eingefügt, der ein Stop-Codon generiert.

2.11.2 Die Mutationskonstrukte pHTK-Om und pHTK-Om-still

Um die Doppelmutation in dem pHTK-Om Konstrukt zu erstellen, wurden vorher mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR die Mutationen C1355A und D1356A in das von Krause (2000) hergestellte Konstrukt pASK-IBA7-PfODC eingeführt. Hierzu wurde das Primerpaar 5'-GTATTTGGACAATCAGCAGCAGGCTTGGATATGATC-3' und 5'-GATCATATCCAAGCCTGCTGCTGATTGTCCAAATAC-3' (Mutationen unterstrichen) verwendet. Durch das Einfügen der Doppelmutation wurde an derselben Stelle eine *Fnu*4H I Schnittstelle generiert, die bei positiver Integration zur Analyse verwendet werden sollte. Anschließend wurde durch eine weitere PCR die Doppelmutation tragende 5'-Flanke (910 bp) mit den Oligonukleotiden Sense 5'-TCCCCGCGGGTCGCTGCTTCGTCAACATTAGCT-3' (*Sac* II unterstrichen) und Antisense 5'-GGACTAGTTTACCAATGTTTGGTTGCCCC-3' (*Spe* I unterstrichen) amplifiziert. Die 5'-Flanke sowie pHTK-3'flank wurden jeweils mit *Sac* II und *Spe* I verdaut und ligiert. Das pHTK-Om-still Konstrukt wurde durch ortsspezifische Mutagenese-PCR mit dem Primerpaar 5'-GTATTTGGACAATCATGTGACGGCTTGGATATGATC-3' und 5'-GATCATATCCAAGCCGTCACATGATTGTCCAAATAC-3'

(Mutationen unterstrichen) aus pHTK-Om hergestellt. Anstelle der *Fnu4H* I Schnittstelle wurde durch die stille Mutation eine *Mae* III Schnittstelle generiert, welche wiederum zur Analyse der Integration verwendet werden sollte.

2.11.3 Kompletierung des ODC-Knockouts mit dem Gen der humanen ODC

2.11.3.1 Test der Funktionsfähigkeit der hODC

Die humane ODC (hODC) wurde mittels RT-PCR auf humaner RNA (eine freundliche Schenkung von Dr. Zita Krnajski) gewonnen. Dem amplifizierten Gen der hODC wurde am 3'-Ende ein V5-Epitop Durch eine Expand Long Template Polymerase PCR und dem Primerpaar 5'-GCGCACGCGTCCATGAACAACCTTTGGTAATGAAG-3' (*Mlu* I Schnittstelle unterstrichen) und 5'-GAGAGCGCGCTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATA **GGCTTACCC**CACATTAATACTAGCCGAAGCAC-3' (*BssH* II Schnittstelle unterstrichen und V5-Epitop fett gedruckt) angehängt. Anschließend wurde hODC-V5 in den pBAD-TOPO Vektor nach Anweisungen des TOPO TA Cloning Kit kloniert und sequenziert. Das Konstrukt pBAD-TOPO-hODC-V5 wurde im ODC-defizienten *E. coli*-Stamm EWH331 rekombinant exprimiert. Hierzu wurde eine Übernachtskultur 1:50 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Expression wurde mit 0,02% Arabinose induziert und für 4 h bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurde als Kontrolle der leere pBAD-TOPO Vektor in EWH331 transformiert und exprimiert. Jeweils 400 ml der Kultur wurden abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml 50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA und 0,02% Brij resuspendiert. Die Aktivität wurde im Zellextrakt durch den Umsatz von 250 nCi U[¹⁴C]-Ornithin nach Krause et al. (2000) bestimmt.

2.11.3.2 Das Komplementierungskonstrukt pΔHTK-O-hODCV5

Für die Herstellung des pΔHTK-O-hODCV5 Konstrukts wurde zuerst die 3'-Flanke aus pHTK-O-Ko mit den Restriktionsenzymen *Cla* I und *Avr* II ausgeschnitten. Die Vektorenden wurden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und mit T4-DNA Ligase ligiert. Das so entstandene Konstrukt pHTK-O-Δ3'fl wurde anschließend mit *Mlu* I und *BssH* II verdaut. Mittels PCR wurde die humane ODC von pBAD-TOPO-hODC-V5 mit dem Primerpaar Sense 5'-GCGCACGCGTCCATGAACAACCTTTGGTAATGAAG-3' (*Mlu* I Schnittstelle unterstrichen) und Antisense 5'-GAGAGCGCGCTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACC

CACATTAATACTAGCCGAAGCAC-3' (*Bss*H II Schnittstelle unterstrichen und V5-Epitop fett gedruckt) amplifiziert, ebenfalls mit *Mlu* I und *Bss*H II verdaut und in pHTK-0- Δ 3'fl kloniert. Dadurch wurde die virale Thymidinkinase des pHTK-Vektors durch die humane ODC inklusive V5-Epitop ersetzt.

2.11.3.3 Nachweis der hODC in *P. falciparum*

Um das humane Protein im Parasiten nachzuweisen, wurde eine asynchrone 10 ml Kultur mit Saponin lysiert und das Plasmodienpellet anschließend mit SDS-Probenpuffer gemischt. Die Suspension wurde 2 min bei 100°C gekocht, kurz auf Eis abgekühlt und 5 min bei 12'000 rpm (Eppendorfszentrifuge) abzentrifugiert. Der Nachweis erfolgte anschließend mittels Western-Blot Analyse. Der Anti-V5-Antikörper wurde 1:5'000 und der zweite Antikörper (Ziege-Anti-Maus-Antikörper HRP) wurde 1:10'000 eingesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der PfARG

3.1.1 Genomische Struktur

Ein offener Leserahmen (ORF) wurde aufgrund hoher Homologie zu Arginasen verschiedener Organismen (siehe 3.1.2) in der Plasmodien-Datenbank (PlasmoDB) gefunden. Das Gen (PFI0320w) liegt auf Chromosom 9 und besteht aus einem 1'236 bp großen Exon, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz 411 aa beträgt. Auf dem Antisense-Strang liegt 3'325 bp genauwärts ein weiterer offener Leserahmen (PFI0315c) von 2'514 bp (siehe Abb. 8). Das entsprechende Protein weist Homologie zur leichten Kette von Dynein auf. Ein Gen von 2'532 bp (PFI0325c), dessen hypothetisches Protein eine Zinkfingerstruktur besitzt, liegt 1'269 bp genabwärts von PFI0320w auf dem Antisense-Strang.

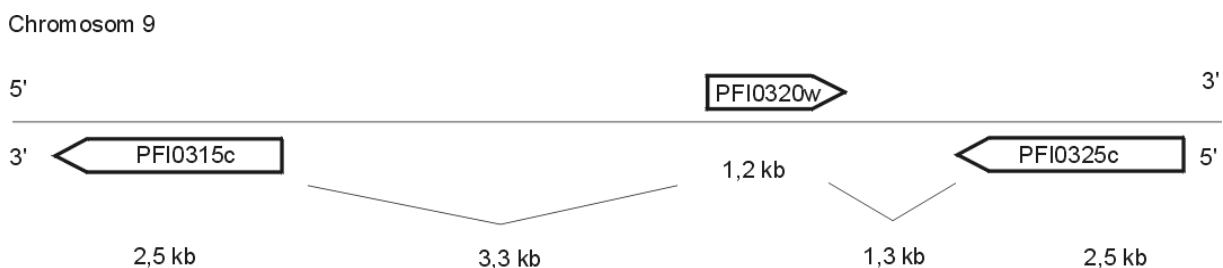


Abb. 8. Ausschnitt des Chromosom 9 von *P. falciparum*. Auf dem Sense-Strang befindet sich das Gen der plasmodialen Arginase (PFI0320w), auf dem Antisense-Strang liegt genauwärts der ORF (PFI0315c), welcher Homologie zur leichten Kette des Dyneins zeigt und genabwärts der ORF eines Zinkfingerproteins (PFI0325c). Die Daten und Bezeichnungen entstammen PlasmoDB.

In den 3,3 kb zwischen PFI0320w und PFI0315c befinden sich die Promotoren beider Gene. Der nur halb so große Abstand zu PFI0325c beinhaltet die 3'-regulatorischen Sequenzen, welche die Transkription des jeweiligen Gens beenden. Die beiden Gene sowie die 5'- und 3'-regulatorischen Regionen sind bis anhin noch nicht weiter untersucht worden.

3.1.2 Analyse der Primärsequenz

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der plasmodialen Arginase (*PfARG*) weist folgende Sequenzidentitäten (berechnet mittels GraphAlign) auf: 24% mit der humanen Typ I Arginase (Haraguchi et al., 1987), 22% mit der Typ I und der Typ II Arginase der Maus (Iyer et al., 1998), 26% mit der Arginase von *Schizosaccharomyces pombe* (Van Huffel et al., 1994), 25% mit der Arginase von *Bacillus caldovelox* (Bewley et al., 1996) sowie 28% mit derjenigen von *Bacillus subtilis* (Gardan et al., 1995). Abb. 9 zeigt das multiple Alignment der *PfARG* mit den oben genannten Sequenzen.

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
<i>Hs1</i>	-----	---MSAKSRTIGIIG	APFSK GG PRGGVVEEG	PTVLRKAGLLEKLKE	QECDDVKDYGDLPFAD	IP-NDSFFQ-----		65
<i>Mm1</i>	-----	---MSSKPKSLEIIG	APFSK GG PRGGVVEEG	PAALRKAGLLEKLKE	TEYDVRDHGDLAFVD	VP-NDSFFQ-----		65
<i>Mm2</i>	MFLRSSASRLHGHQI	PCVLTRSVHSAIVG	APFSR GG KKLGVEYEG	PAAIRKAGLLKRLSR	LGCHLKDFGDLSTFN	VP-QDDFYNN-----		84
<i>Bc</i>	-----	-----MKPISIIG	VPMDL GG TRRGVDMG	PSAMRYAGVIERLER	LHYDIEDLGDIPIGK	AERLHEQGDS-----		63
<i>Bs</i>	-----	-----MDKTISVIG	MPMDL GG ARRGVDMG	PSAIRYAHLLERLSD	MGYTVVEDLGDIPINR	EK---LKNDE-----		61
<i>Sp</i>	--MSPHKIPEVHRHI	MSSRYMEGNAVSIIN	MPFS GG PKDGAELA	PEMIEAAGLPEDLER	LGYSVNVVQNPFFKS	RPLKEGPNQA-----		83
<i>Pf</i>	--MLDTIESYIKSHK	EKENLYVKKNVSIIG	SPLA GG PLGGVQLA	CDDLRLKGLHNVIDV	LGWKYEDIGNIDNGD	NEMKQEKKTNNYINN		88
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180	
<i>Hs1</i>	-----	-----	-----	-----	-----IVKNPR	SVGKASEQLAGKVAE		86
<i>Mm1</i>	-----	-----	-----	-----	-----IVKNPR	SVGKANEELAGVVAE		86
<i>Mm2</i>	-----	-----	-----	-----	-----LVVYPR	SVGLANQELAEVVS		105
<i>Bc</i>	-----	-----	-----	-----	-----RLRNLK	AVAEANEKLAADVQ		84
<i>Bs</i>	-----	-----	-----	-----	-----ELKNLN	SVLAGNEKLAQKVNK		82
<i>Sp</i>	-----	-----	-----	-----	-----LMKNPL	YVSNVTRQVRNIVQQ		104
<i>Pf</i>	NDNNNDNNNDNNNDN	NNNCYIPNGVIKEKK	HDLSNNKMGYVNVHN	FYGNYEENNVISTND	KYKNNCYVDNIRNIK	EIGIFSKNLFDTMSN		178
	181	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270	
<i>Hs1</i>	VKKNGRISLV GGDH	SLAIGSISGHARVHP	DLGVIWVD DAHTDINT	PLTTT SGNLHG QPV	FLLKELKGGKIPDVPG	FSWVTPCISAKDIVY		176
<i>Mm1</i>	VQKNGRVSVV GGDH	SLAVGSISGHARVHP	DLCVIWVD DAHTDINT	PLTT SSGNLHG QPV	FLLKELKGGKFPDVPG	FSWVTPCISAKDIVY		176
<i>Mm2</i>	AVSGGYSCV TMGGDH	SLAIGTIIIGHARHRP	DLCVIWVD DAHADINT	PLTTV SGNIHG QPL	FLIKELQDKVQPLPG	FSWIKKCLSPENIVY		195
<i>Bc</i>	VVQRGRFPLV GGDH	SLAIGTLAGVAKHYE	RLGVIWVD DAHGVDNT	AETSP SGNIHG MPLA	ASLGFHPALTAQIGG	Y--S-PKIKPEHVVL		171
<i>Bs</i>	VIEEKFPPLV GGDH	SLAIGTLAGTAKHYD	NLGVWVD DAHGDLNT	LETSP SGNIHG MPLA	VSLGIGHESLVNLEG	Y--A-PKIKPENVVI		169
<i>Sp</i>	ELEKQRIAVN IGGDH	SLAIGTVEGVQAVYD	DACVLWID DAHADINT	PDS SPSKNLHG CPLS	FSLGYAEPLPEEFAW	TR--RVIEERRLAF		191
<i>Pf</i>	ELRKKNEVLN IGGDH	GVAFSSILSSLQMYQ	NLRVWID DAHGDINI	PETSP SGNYHG MTLA	HTLGLFKKKVPYFEW	SEN-LTYLKPENTAI		267
	271	285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360	
<i>Hs1</i>	IGLRD VDPGEHYIILK	TLGIKYFSMTEVDRL	GIGK VMEETLSYLLG	RKKRPI HL SFDVDGL	DF SFT PATGT FPV GG	LYRE GLYITEEIIYK		266
<i>Mm1</i>	IGLRD VDPGEHYIILK	TLGIKYFSMTEVDKL	GIGK VMEETFSYLLG	RKKRPI HL SFDVDGL	DE APT PATGT FPV GG	LSYRE GLYITEEIIYK		266
<i>Mm2</i>	IGLRD VEPPPEHFILK	NYDIQYFSMREIDRL	GIQK VMEQTFDRLLG	KRQRPI HL SFDIDAF	DE KLAPAT GT FPV GG	LYRE GVYITEEIIHN		285
<i>Bc</i>	IGVRS LDEGEKFKFIR	ERGIKIYTMHEVDRL	GMTR VMEETIAYLKE	RTDG-V HL SLDLDGL	DF SDAP GVGT FPV GG	LYRE SHLAMEMLAE		260
<i>Bs</i>	IGARS LDEGEKRYIK	ESGMKYVTMHEIDRL	GMTK VIEETLDYLSA	CDG--V HL SLDLDGL	DE NDAP GVGT FPV GG	ISYRE SHLAMEMLYD		257
<i>Sp</i>	IGLRD LDEMERAFRL	ERSITAYTMHDVDKY	GIAR VVEMALEHINP	GRRRPI HL SFDVDAC	DE IVAPAT GT RV FGG	LTRE AMYICESVAE		281
<i>Pf</i>	IGLRD IDAYEKIILK	KCNINYYTTFDIEKN	GIYNT ICTALEKIDP	NSNCP HL S LD IDSV	DN VFAP GT TVAK GG	LN YREINLMLKILAE		357
	361	375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450	
<i>Hs1</i>	TGLLSGLDIMEV NPS	LG KTPPEV T -----	-----RTVNTAVAIT	LAC FGL AREGNHKP-	IDYLN PPK -----	-----		322
<i>Mm1</i>	TGLLSGLDIMEV NPT	LG KTAEV K -----	-----STVNTAVALT	LAC FGT QREGNHPG	TDYLN KPPK -----	-----		323
<i>Mm2</i>	TGLLSALDLVEV NPH	LAT SEEEAK-----	-----ATARLAVDVI	ASS FG Q T REGGHIVY	DHLPT PSS PHESENE	ECVRI		354
<i>Bc</i>	AQIITSAEFV EVNPI	LD ERNK-----	-----TASVAVALM	GS LFG EK LM -----	-----	-----		299
<i>Bs</i>	AGIITSAEFV EVNPI	LD HKNK-----	-----TGKTAVELV	ES LLG K LL -----	-----	-----		296
<i>Sp</i>	TGSLVAVDVMEV NPL	LGN KEE-AK-----	-----TTVDLARSIV	RT CLG Q TLL -----	-----	-----		323
<i>Pf</i>	TKRVVSDMLVEV NPS	LDE VDKK VHG DSLEPI	LDNATKT GK LCELELI	AR VLG Y DIV -----	-----	-----		411

Abb. 9. Multiples Alignment der plasmodialen Arginase (*Pf*) mit den Arginasen von *Homo sapiens* Typ 1 (*Hs1*), *Mus musculus* Typ 1 (*Mm1*) und Typ 2 (*Mm2*), *B. caldovelox* (*Bc*), *B. subtilis* (*Bs*) und *S. pombe* (*Sp*). Arginasetypische Motive (unterstrichen), hochkonservierte aa (schwarz), manganbindende aa (blau), His für Protonenübertragung (grün), an Strukturbildung beteiligtes Glu (rot). Austausch von N256 zu K256 in *PfARG* (*).

Wie auch bei anderen plasmodialen Proteinen beschrieben (Wrenger et al., 2001) weist die plasmodiale Arginase zwei charakteristische Insertionen auf, deren Funktion noch

nicht bekannt ist. Es handelt sich vorwiegend um Asn-, Asp-, Gln-, Glu-, Ser- und Lys-reiche Segmente. Die größere Insertion in der PfARG besteht zu 41% aus Asparagin. Die von Bewley et al. (1999) als typisch für Arginasen beschriebenen Motive GGDHS, SXDXDXDP und DAHXD sind auch in der PfARG konserviert. Des Weiteren besitzt PfARG alle Aminosäurereste, welche bei der Rattenleber-Arginase (RLA) für die Metallbindung oder für die Ausrichtung des Substrates verantwortlich sind (Christianson und Cox, 1999).

3.1.3 Stadienspezifisches Transkriptionsmuster

Das Expressionsmuster der plasmodialen Arginase während der erythrozytären Schizogonie wurde mittels Northern-Blot evaluiert. Hierzu wurde die Plasmodienkultur synchronisiert und jeweils Gesamt-RNA aus den Zellen der verschiedenen Stadien - Ringe, Trophozoiten und Schizonten - isoliert. Es wurden 25 µg RNA in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer spezifischen PfARG-Sonde hybridisiert. Abb. 10 zeigt eine hohe Expression im Ringstadium und in jungen Trophozoiten (14 ± 4 h post Infektion). Dieses Ergebnis stimmt gut mit den auf PlasmoDB angegebenen Daten für die identische Sequenz PFI0320w überein, welche ein Expressionsmaximum zwischen 11 h und 19 h zeigen (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003). Das Transkript von etwa 4,1 kb ist mehr als dreimal so groß wie der ORF von 1,2 kb. Wie bereits erwartet (siehe 3.1.1) ist vorwiegend der 5'-, aber auch der 3'-untranslatierte Bereich größer als das Gen selbst.

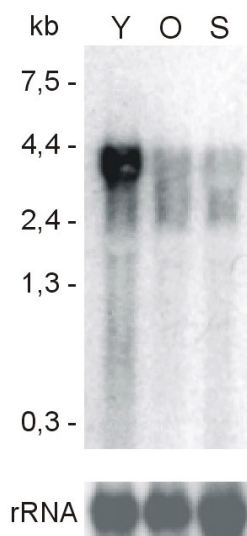


Abb. 10. Expressionsmuster der plasmodialen Arginase. Je 25 µg Gesamt-RNA aus Ringen und jungen Trophozoiten (Y), alten Trophozoiten (O) und aus Schizonten (S) wurden mit einer radioaktiv markierten PfARG-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle diente 18 S rRNA.

3.1.4 Biochemische Charakterisierung der PfARG

3.1.4.1 Rekombinante Expression

Das Gen der *PfARG* wurde mittels reverser Transkription aus Gesamt-RNA von *P. falciparum* isoliert, in pCR2.1-TOPO kloniert, sequenziert und annotiert (GenBank/EBI Datenbank AC, AJ313518). Hierbei ergab sich, dass in der isolierten Sequenz im Vergleich zu jener aus PlasmoDB eine Transversion von Thymidin768 zu Adenosin768 zur Veränderung der Aminosäuresequenz von Asp256 zu Lys256 führte. Das Gen wurde anschließend in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert und als C-terminales Strep-tag-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 RIL-Zellen exprimiert. Das erhaltene Protein zeigte eine maximale Ausbeute von 600 µg l⁻¹ Bakterienkultur. *PfARG* wurde durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 11). Das Monomer ist 48 kDa groß, wovon 1,2 kDa dem Strep-tag entsprechen.

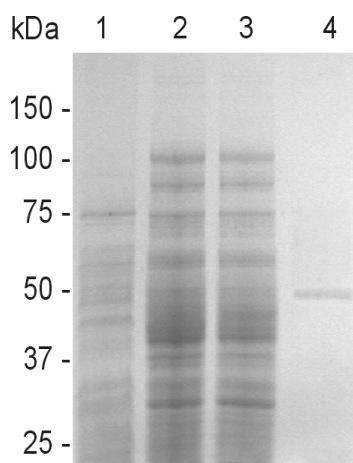


Abb. 11. Aufreinigungsschritte der rekombinant hergestellten *PfARG*. (1) Pellet des Bakterienhomogenats nach Zentrifugation bei 100'000x g, (2) Überstand vor der Affinitätsaufreinigung, (3) Durchfluss nach Aufreinigung, (4) eluierte *PfARG*. Coomassie gefärbtes 10%-iges SDS-Gel.

3.1.4.2 Kinetische Eigenschaften der rekombinanten *PfARG*

Die *PfARG* weist eine spezifische Aktivität von $31 \pm 6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein ($n = 5$) auf, was zu einem K_{cat} -Wert von 24 s^{-1} führt. Nur Arginin dient als Substrat für das plasmodiale Enzym. Agmatin wird von der *PfARG* nicht umgesetzt. Der K_{m} -Wert des Enzyms für L-Arginin beträgt $5,7 \pm 0,8 \text{ mM}$ ($n = 6$).

Die rekombinante *PfARG* war bei 4 °C gelagert eine Woche stabil. Durch Einfrieren bei -20 °C blieb die Aktivität erhalten. Das Enzym verlor jedoch innerhalb von zwei Tagen nach Auftauen seine Aktivität. Die Temperaturbeständigkeit der *PfARG* wurde im Standardtest bei zwei verschiedenen pH-Werten (8,0 und 9,0) untersucht. Hierzu wurde das Enzym jeweils für 10 min bei verschiedenen Temperaturen von 0 - 80 °C präinkubiert

und anschließend die Aktivität bei 37 °C bestimmt (siehe Abb. 12). Daraus ergab sich, dass die Enzymaktivität bei einer Erhöhung der Präinkubationstemperatur von 50 °C auf 60 °C drastisch abfällt. Darüber hinaus war keine temperaturbedingte Aktivierung der PfARG, wie es Schimke (1963) für das Rattenenzym beschrieben hat, notwendig.

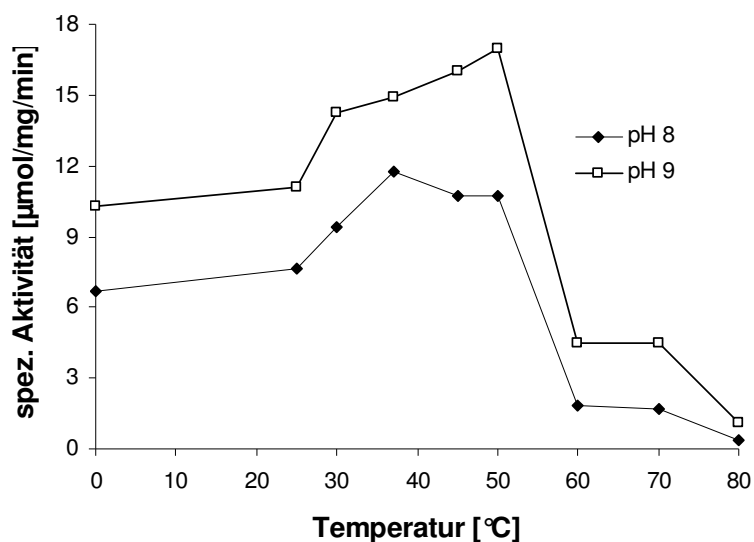


Abb. 12. Hitzebeständigkeit der PfARG. Das Enzym wurde vor der Aktivitätsbestimmung für 10 min bei verschiedenen Temperaturen von 0 - 80 °C präinkubiert. Der Test wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten, pH 8,0 (♦) und pH 9,0 (□), durchgeführt.

Um den optimalen pH-Bereich der PfARG zu ermitteln, wurde ihre Aktivität in zwei verschiedenen Puffersystemen getestet. Für den Bereich zwischen pH 6,0 - 9,0 wurde ein 100 mM Tris-HCl Puffer und für den Bereich zwischen pH 8,0 - 10,0 ein 100 mM Glycin-NaOH Puffer verwendet. Die PfARG zeigte eine optimale Aktivität im Bereich von pH 8,5 - 9,0.

3.1.4.3 Testen verschiedener divalenter Kationen als Kofaktoren

Arginasen von Säugern und Bakterien gehören zu der Gruppe der Metalloenzyme, die auf divalente Kationen angewiesen sind (Bewley et al., 1996; Colleluori et al., 2001). Der im Aufreinigungskit (*Strep-tag*[®]) mitgelieferte Elutionspuffer enthält den Chelatbildner EDTA. Deshalb wurde die PfARG vor der Aktivitätsbestimmung gegen einen EDTA-freien Puffer dialysiert. Um den richtigen Kofaktor der PfARG zu finden, wurden verschiedene divalente Kationen Ca²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ im Konzentrationsbereich von 0,1 - 5,0 mM getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die höchste Aktivität mit Mn²⁺ und eine etwa vierfach geringere Aktivität mit Ni²⁺ erzielt wird (Abb. 13). Die anderen Kationen hingegen

wurden nicht von der *PfARG* akzeptiert. Die optimale Konzentration von Mn^{2+} lag zwischen 0,5 und 1,0 mM.

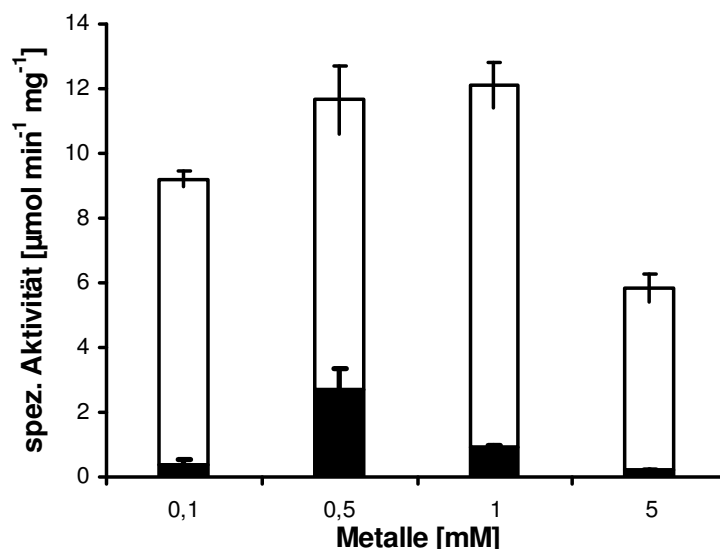
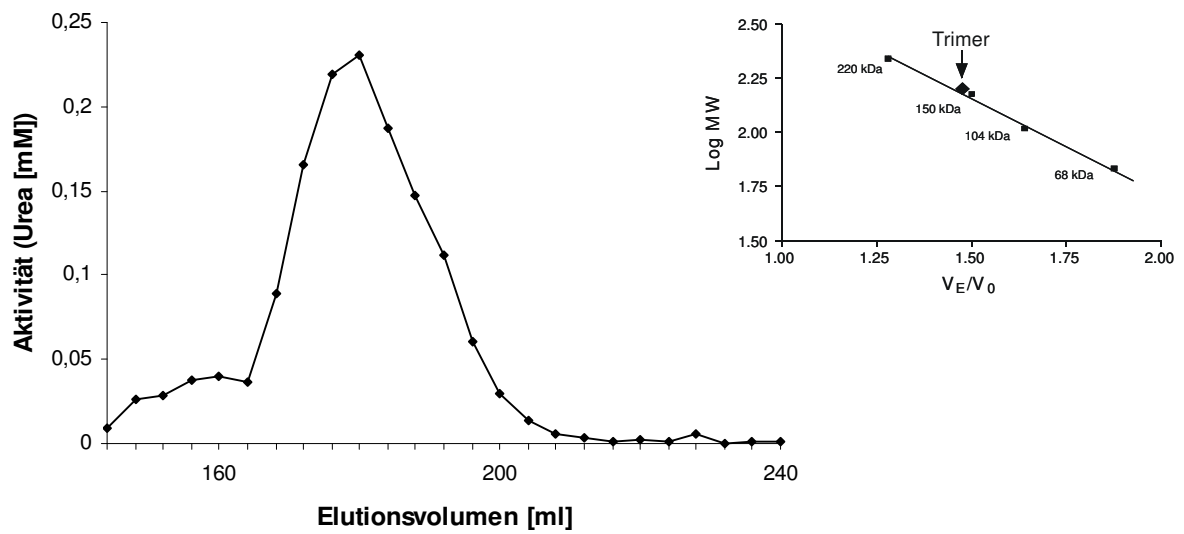


Abb. 13. Einfluss von Mn^{2+} und Ni^{2+} auf die Aktivität der *PfARG*. Aktivität in Gegenwart von Mn^{2+} (weiße Balken)(,) und von Ni^{2+} (schwarze Balken), (n = 3).

3.1.4.4 Manganabhängigkeit der *PfARG*-Konformation

Um den oligomeren Status der *PfARG* zu bestimmen, wurde das rekombinante Enzym über Gelfiltration (FPLC) aufgereinigt. Es eluierte in Gegenwart von Mangan als Trimer mit einer Masse von etwa 150 kDa (Abb. 14A). Durch die Zugabe von EDTA wurden die Mn^{2+} -Ionen gebunden und *PfARG* eluierte als Monomer (Abb. 14B). Der Nachweis der nativen *PfARG* erfolgte jeweils mittels Aktivitätstests. Da im Gegensatz zur humanen Arginase das plasmodiale Enzym vollständig durch EDTA inhibiert wird, wurde den EDTA enthaltenden Fraktionen zur Bestimmung der Aktivität Mn^{2+} im Überschuss zugegeben.

A



B

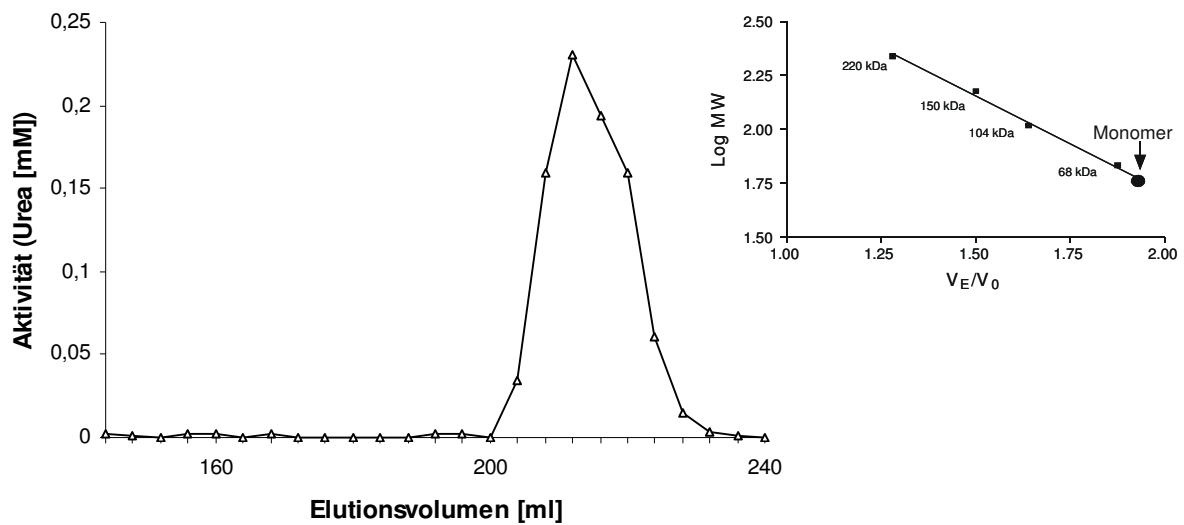


Abb. 14. Gelchromatographie der PfARG in Abhängigkeit von Mn²⁺. (A) Elution in Anwesenheit von 1 mM MnCl₂ (◆) und (B) in 2 mM EDTA-haltigem Puffer (Δ). PfARG wurde über eine Superdex-200 Säule aufgetrennt und mittels Aktivitätsbestimmung der einzelnen Fraktionen nachgewiesen. EDTA enthaltende Fraktionen wurden hierfür mit 5 mM MnCl₂ versehen.

Anhand dieses Ergebnisses kann jedoch nicht erklärt werden, ob das Monomer in Gegenwart von Mn^{2+} als solches aktiv ist oder sich dazu erst die trimere Struktur ausbilden muss. Um dies weiter zu untersuchen, wurde die EDTA enthaltende Monomerfraktion (siehe Abb. 14B) für 15 min in 5 mM $MnCl_2$ präinkubiert und anschließend in einem Nativen Gel analysiert (Abb. 15). In Abwesenheit von Mn^{2+} ist eine Bande von etwa 50 kDa detektierbar, was der Größe des Monomers der nativen PfARG entspricht. In Gegenwart von Mn^{2+} ist eine Bande von etwa 150 kDa erkennbar. Sie entspricht der Größe des PfARG-Trimers. Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung des Proteins mit EDTA die oligomere Struktur durch Zugabe von Mn^{2+} wiederhergestellt werden kann.

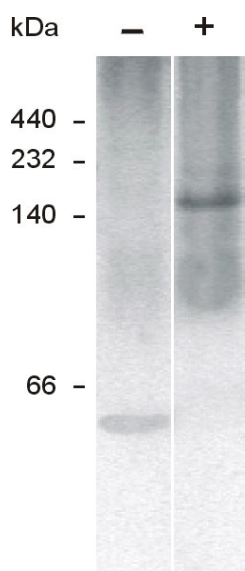


Abb. 8. Natives Gel der PfARG in Abhängigkeit von $MnCl_2$. Jeweils 30 μg der EDTA enthaltenden PfARG wurden in einer nicht-denaturierenden 4 - 20%-igen PAGE analysiert. (-) ohne Mn^{2+} und (+) mit Mn^{2+} .

3.1.4.5 Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität des Enzyms

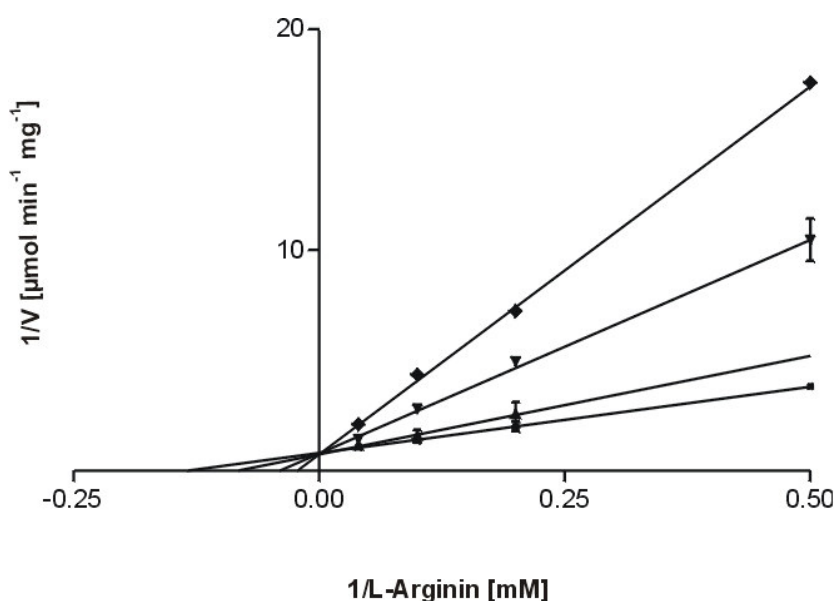
Im Folgenden wurde die Wirkung einiger bereits beschriebener Arginaseinhibitoren auf die rekombinante PfARG getestet. Die getesteten Substanzen waren Valin, Borat und das Reaktionsprodukt Ornithin sowie NOHA, das als Zwischenprodukt in der antagonistischen Reaktion von Arginin zu Stickoxid entsteht, und dessen Derivat nor-NOHA. In Tab. 1 sind die berechneten IC_{50} -Werte von Valin und Borat sowie die K_i -Werte von Ornithin, NOHA und nor-NOHA dargestellt.

Tab. 1. Inhibierung der rekombinanten PfARG. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). Nicht gemessen (n.g.).

Inhibitor	IC ₅₀ -Wert	K _i -Wert
Valin	9,2 \pm 1,0 mM	n.g.
Borat	18,9 \pm 0,7 mM	n.g.
Ornithin	n.g.	19,0 \pm 3,0 mM
NOHA	n.g.	5,1 \pm 0,6 μ M
nor-NOHA	n.g.	2,5 \pm 0,7 μ M

Die K_i-Werte der im μ M-Bereich auf die PfARG wirksamen Inhibitoren NOHA und nor-NOHA wurden durch Michaelis-Menten- und doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Plots ermittelt. Hierzu wurde Arginin in Konzentrationen von 0 - 30 mM und die Inhibitoren von 0 - 20 μ M eingesetzt. Beide Substanzen zeigen, wie in Abb. 16 dargestellt, einen kompetitiven Inhibierungstyp.

A



B

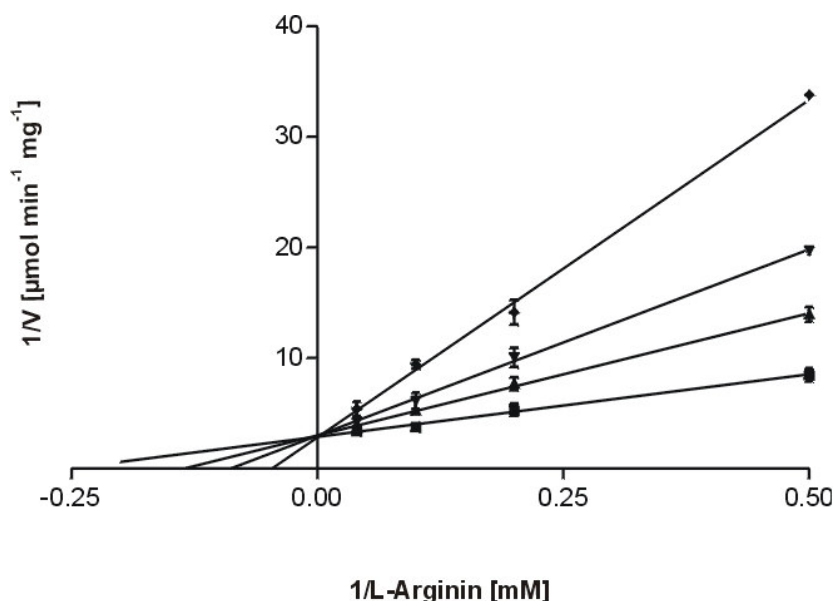


Abb. 16. Bestimmung der K_i -Werte für NOHA und nor-NOHA mittels doppelt reziprokem Lineweaver-Burk-Plot. Die Arginin-Konzentrationen variierten von 0 - 30 mM. (A) Nor-NOHA wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0 μM (\blacksquare), 2,5 μM (\blacktriangle), 5 μM (∇) und 10 μM (\blacklozenge); (B) NOHA in: 0 μM (\blacksquare), 5 μM (\blacktriangle), 10 μM (∇) und 20 μM (\blacklozenge).

3.1.5 Einfluss der Arginaseinhibitoren auf die Plasmodienkultur

Zur Bestimmung der Hemmwirkung auf die Parasiten wurden neben NOHA und nor-NOHA zwei weitere Inhibitoren getestet. Diese auf Borat beruhenden Substanzen ABH und BEC wurden erst kürzlich als potente Arginasehemmer der humanen Arginase Typ I beschrieben (Kim et al., 2004). Mittels radioaktiv markiertem Hypoxanthin wurde das Wachstum der Plasmodien untersucht. Die Inhibitoren wurden jeweils in Konzentrationen von 0 - 500 μM eingesetzt. Für die Kulturversuche wurden die Plasmodien in Arginin-freiem Medium geführt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen isoliert und anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Hypoxanthin im Scintillationszähler ausgewertet. Abb. 17 zeigt eine geringe Inhibierung durch ABH und BEC, aufgrund derer bei Inhibitorkonzentrationen bis zu 500 μM keine IC_{50} -Werte ermittelt werden konnten. Für NOHA wurde der IC_{50} -Wert bei $225 \pm 35 \mu\text{M}$ und für nor-NOHA bei $420 \pm 46 \mu\text{M}$ festgelegt.

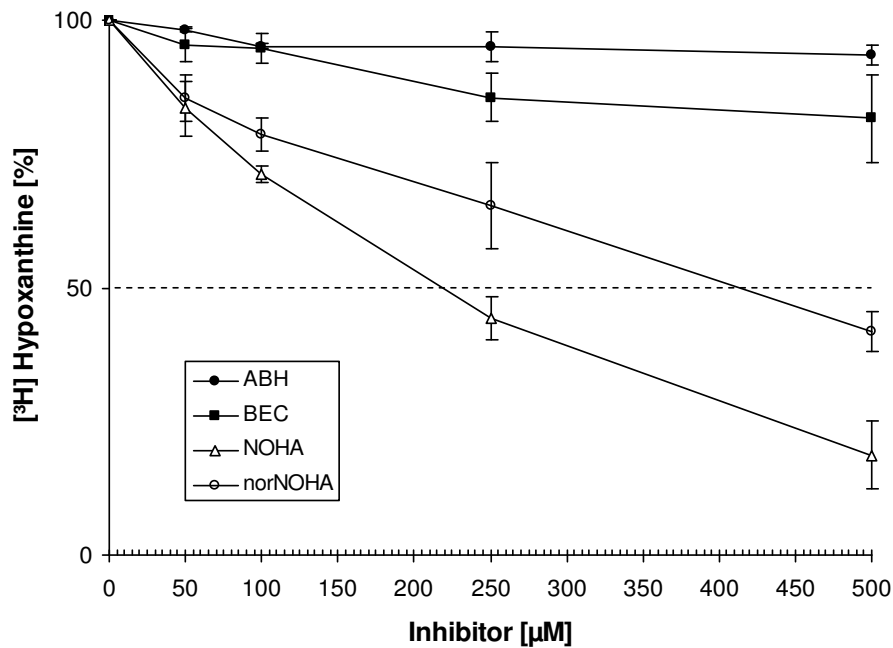


Abb. 17. Hemmung der *PfARG* in der Plasmodienkultur. Die Plasmodienkultur wurde während 48 h mit den Inhibitoren ABH, BEC, NOHA und nor-NOHA in Konzentrationen von 0 - 500 µM behandelt. Die prozentuale Inhibierung der Kultur wurde mittels Einbau von [³H]Hypoxanthin gemessen. (n = 3).

3.1.6 Nachweis der plasmodialen Arginase im Parasiten

Die Lokalisierung der plasmodialen Arginase im Parasiten wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Dazu wurden Antikörper gegen die *PfARG* im Huhn hergestellt. Nach dreimaliger Injektion der *PfARG* konnte aus dem Eigelb des Hühnereis ein polyklonaler Antikörper isoliert werden, welcher, analysiert mittels Western-Blot, sowohl die rekombinante *PfARG* als auch die native *PfARG* im Parasitenextrakt erkannte. Wie Abb. 18 zeigt, erkennt der Anti-*PfARG*-Antikörper spezifisch jeweils eine Bande. Das rekombinante Protein ist inklusive Strep-tag 48 kDa groß, wobei die deutlich schwächere Bande einem Abbauprodukt entspricht. Die native *PfARG* ist hingegen nur etwa 35 kDa groß. Der Unterschied deutet auf eine Prozessierung der nativen Arginase hin. Jedoch konnte mit verschiedenen Programmen, welche auf der ExPASy Webseite verfügbar sind, keine Prozessierungsstelle identifiziert werden.

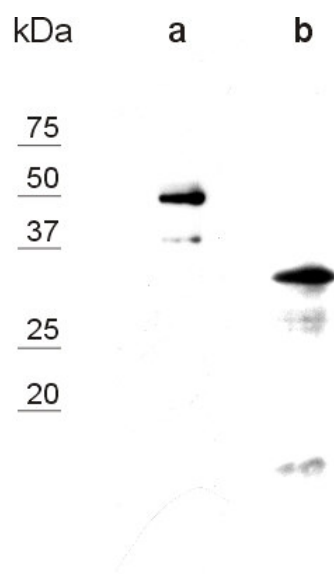


Abb. 11. Western-Blot der rekombinanten und nativen PfARG. (a) 0,5 μ g rekombinantes Protein und (b) 12 μ g Plasmodienhomogenat. Der Blot wurde mit 1:5'000 verdünntem Anti-PfARG-Antikörper beprobt und mit ECL detektiert.

Um die PfARG im Blutstadium der Parasiten zu lokalisieren, wurden Ausstriche einer asynchronen Plasmodienkultur in Methanol fixiert und anschließend mit dem Anti-PfARG-Antikörper inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein FITC-markierter Anti-Huhn-Antikörper. Zur besseren Orientierung wurden die Kerne der Plasmodien mit DAPI gefärbt. Durch den Vergleich verschiedener Stadien im selben Ausschnitt konnte gezeigt werden, dass PfARG in allen Stadien des Parasiten zu finden ist. Interessanterweise konnte die PfARG mit zunehmender Reifung des Parasiten zum Trophozoiten und Schizonten vermehrt auch in der Wirtszelle nachgewiesen werden (siehe Abb. 19). Eine Kreuzreaktion mit der humanen Arginase Typ I im Erythrozyten kann ausgeschlossen werden, da nichtinfizierte rote Blutzellen keine Färbung aufwiesen.

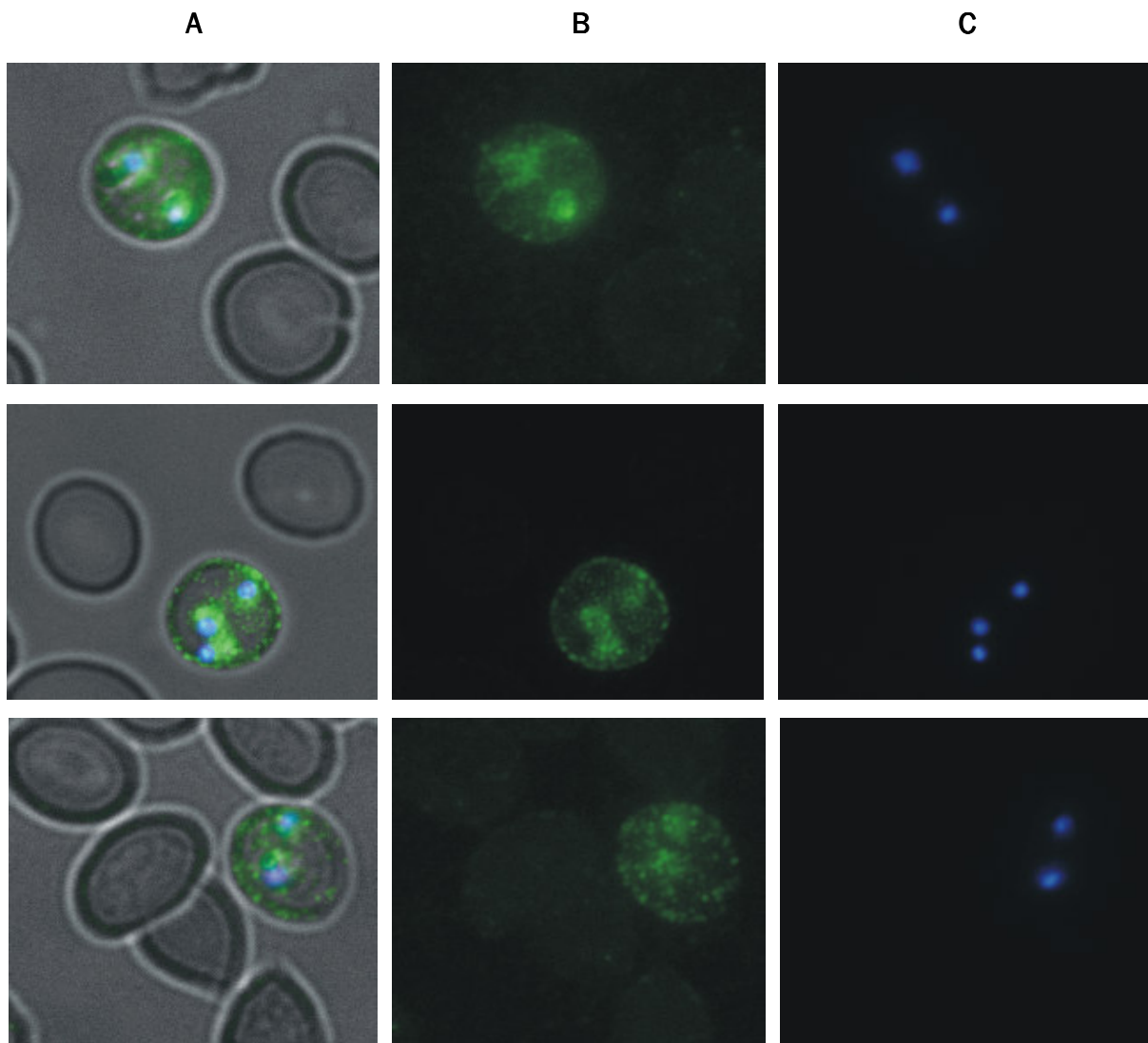


Abb. 19. Immunfluoreszenz-Mikroskopie der *PfARG* von jungen Trophozoiten in intakten Wirtszellen. Die Methanol-fixierten Kulturausstriche wurden mit 1:200 verdünntem Huhn-Anti-*PfARG*-Antikörper inkubiert. Der zweite Antikörper (Esel-Anti-Huhn-FITC) und DAPI wurden 1:2'000 eingesetzt. (A) DAPI-Färbung mit Anti-*PfARG* FITC im Durchlicht. (B) FITC Anti-*PfARG*. (C) DAPI.

Betrachtet man den N-Terminus der *PfARG*, so weist dieser eine Verlängerung von etwa 20 aa auf, wie sie für mitochondriale Arginasen typisch ist (siehe Abb. 2). Mittels verschiedener Bioinformatik-Programme wurde die N-terminale Verlängerung von *PfARG* untersucht. Anhand der Aminosäurezusammensetzung wurden mögliche topogene Signale ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2. Vorhersage der Lokalisierung von PfARG mittels verschiedener Bioinformatik-Programme.

Programm	Sequenzlänge	Lokalisierung	Wahrscheinlichkeit
MitoProt II	10 aa	Mitochondrium	0,02
PlasMit	24 aa	Mitochondrium	0,91
Predotar	100 aa	Mitochondrium	0,01
		Plastid (Pflanzen)	0,00
		ER	0,01
PSORT II	100 aa	Cytoplasma	0,65
		Mitochondrium	0,1
		Lysosom	0,1
		ER	0,0
PATS	100 aa	Apikoplast	0,01
SignalIP	70 aa	Signalpeptid	0,00

Alle verwendeten Programme außer PlasMit, welches die Lokalisierung im Mitochondrium mit einer Wahrscheinlichkeit von 91% vorhersagt, weisen PfARG keiner Zellorganelle zu. Der Berechnung von PSORT II zur Folge liegt die PfARG zu 65% im Cytoplasma. Des Weiteren konnte mittels SignalIP kein Signalpeptid gefunden werden, welches zur Einschleusung des Proteins ins ER verantwortlich sein könnte. Hingegen deutet die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eher auf ein strukturgebundenes Vorkommen der PfARG hin, da eine punktuelle Verteilung sowohl im Parasiten wie auch in der Wirtszelle zu sehen ist (Abb. 19).

In einem nächsten Schritt wurde das außergewöhnliche Vorkommen der plasmodialen Arginase in der Wirtszelle durch fraktionierte Kompartimentierung der Parasit-Wirt-Einheit mittels Behandlung der Zellen durch Saponin und Streptolysin O (SLO) weiter untersucht. Mittels Saponinbehandlung wird die Erythrozytenmembran sowie die Membran der parasitophore Vakuole lysiert. SLO permeabilisiert hingegen vorwiegend die Erythrozytenmembran, wodurch die parasitophore Vakuole intakt bleibt und das Cytosol der roten Blutzelle isoliert werden kann. Die infizierten Erythrozyten wurden im Percoll-Alanin-Gradienten von den nichtinfizierten getrennt. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen mit Saponin, die andere Hälfte mit SLO behandelt. Pellet und Überstand beider

Behandlungen wurden in einem Dot-Blot untersucht (siehe Abb. 20). *PfARG* kann in beiden Pellets nachgewiesen werden (2 und 5). Auch im Überstand der Saponin-behandelten Probe (1) ist ein Signal detektierbar; jedoch nicht im Überstand der mit SLO behandelten Zellen (4). Sowohl mit Saponin als auch mit SLO behandelte nichtinfizierte Erythrozyten zeigen keine Signale (3 und 6).

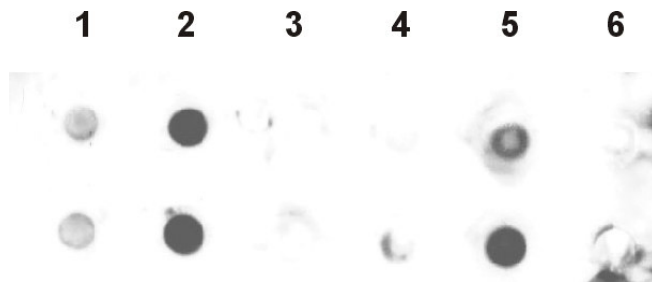


Abb. 20. Kompartimentierung der Parasit-Wirt-Einheit Die aufgetragenen Mengen wurden den Volumenverhältnissen angepasst und als Doppelansatz mittels Dot-Blot untersucht. (1 - 3) Saponin-behandelte Zellen: (1) Überstand, (2) Pellet, (3) nichtinfizierte Erythrozyten. (4- 6) SLO-behandelte Zellen: (4) Überstand, (5) Pellet, (6) nichtinfizierte Erythrozyten. Anti-*PfARG*-Antikörper wurde 1:5'000 eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit ECL.

3.1.7 Computerbasiertes Strukturmodell der PfARG

Die Wirkung der getesteten Inhibitoren NOHA und nor-NOHA auf die *PfARG* (siehe 3.1.4.1) unterscheidet sich nicht grundlegend von den in der Literatur beschriebenen Wirkungen auf Säugerarginasen. Durch die Erstellung eines Strukturmodells der *PfARG* wird es möglich, weitere Unterschiede zum humanen Enzym aufzudecken, aufgrund derer in einem späteren Schritt potentielle Leitstrukturen gefunden werden könnten, die spezifisch mit dem plasmodialen Enzym interagieren.

3.1.7.1 Editieren der Primärsequenz am multiplen Sequenz-Alignment

Die hohe Homologie der *PfARG* zu anderen Arginasen ermöglicht die Erstellung eines computerbasierten Strukturmodells dieses Enzyms. Aufgrund der großen Insertion in *PfARG* liegen die Identitäten jedoch unter 40% (siehe 3.1.2). Für das optimale Alignment der *PfARG*, erstellt durch T-Coffee, wurden vorerst so viele Arginasesequenzen wie möglich miteinander verglichen, um einen Gesamtüberblick zu erhalten. Anschließend wurde das Alignment bis auf die Primärsequenzen bereits kristallisierter und vermessener Arginasen - entsprechend den Strukturen im Protein Database (PDB)-Format - sowie der *PfARG*-Sequenz reduziert. Die verwendeten Sequenzen waren die der Rattenleberarginase (PDB; 1RLA, Kanyo et al., 1996), der humanen Arginase Typ II (PDB; 1PQ3, Cama et al., 2003) und der *B. caldovelox*-Arginase (PDB; 1CEV, Bewley et al., 1999). Das Alignment wurde anschließend mit CINEMA 5 editiert. Dabei wurden von der großen Insertion 58 aa (D90 bis N147) herausgenommen. Die kleine Insertion sowie der N-Terminus der *PfARG* wurden nicht entfernt. Im folgenden Schritt wurde das editierte Sequenz-Alignment mittels JOY auf sekundäre Strukturelemente untersucht (Abb. 21). Anhand des Alignments wird deutlich, dass die Sekundärstruktur-Motive der Arginasen auch in *PfARG* hoch konserviert sind.

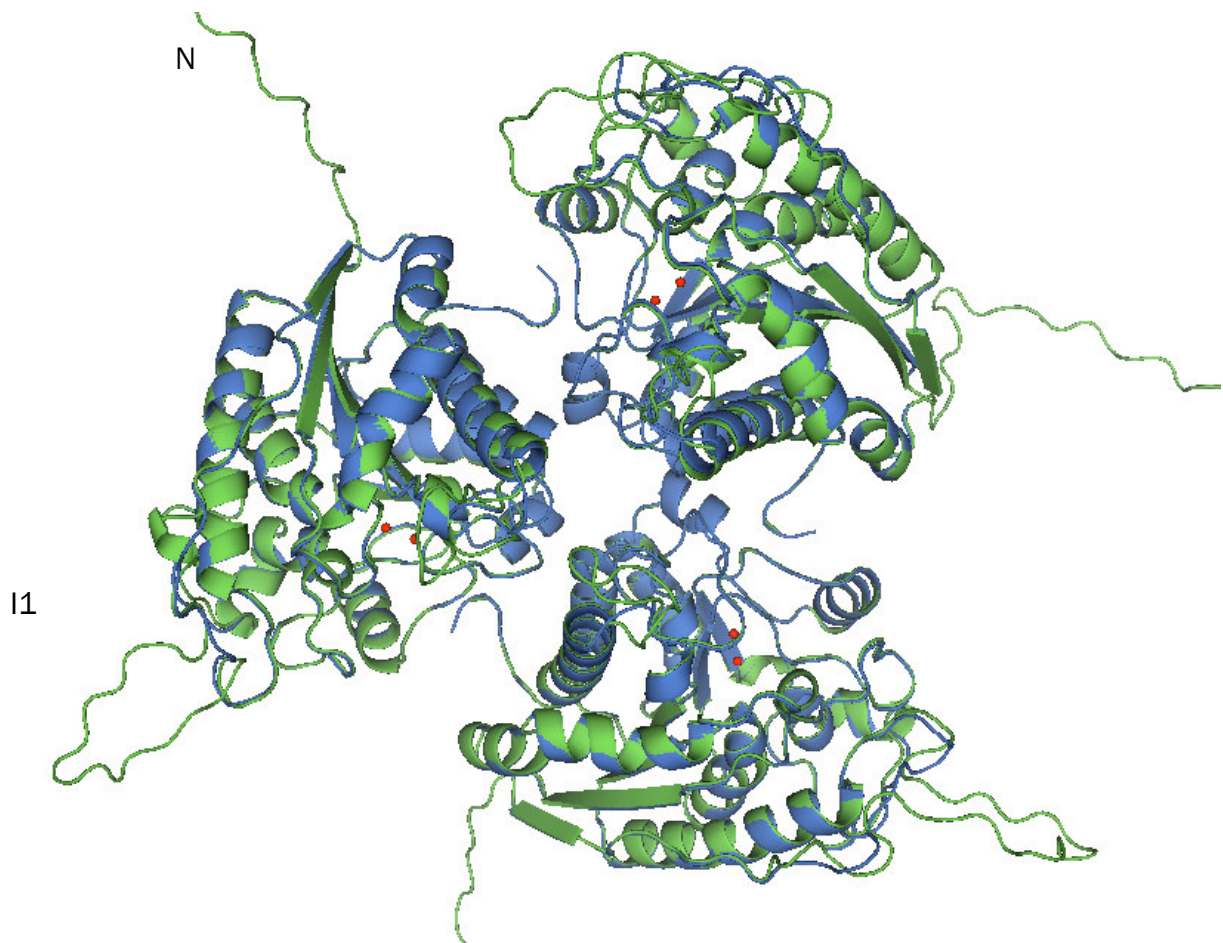
Pfarg	(1)	mldtiesyikshkekenlyvkkn VS iIGSpLaa Q plgg V qL AC ddLrk
1CEV	(1)	mkp ISI IGVpMDLGqtrrG vd mGPsa Mry
1PQ3	(24)	h sv AVIGApFsq Q krkG veh GPaa Ire
1RLA	(6)	kp IE IIIGApFsk Q prgG vek GPaa Lrk
		bbbbbbb 333aaaaaaaa
Pfarg	(50)	lg Lhnv Idvlgwky edi gni-dNgdnemkq E kktnnyinnndkyknnCyy
1CEV	(30)	ag Vier Lerlh yd Iedlgdipigkaer l heq-----gd
1PQ3	(52)	ag Lmkr L ssl g chl kdfgdl s -ftp--vp k Dd-----lyn
1RLA	(34)	ag Lvek L ket ey v rd h gdla-Fvd--vp nd s-----pfq
		aaaaaaa bbbbbbb
Pfarg	(99)	ch Irn I k E igif s kn L fdt MS ne Lrk k N F V L N I G GD H GV A F S S I L S S L q m
1CEV	(63)	sr Lr N ka Vae A ne k L Aaa Vd q V v qr g r f PL V L G GD H S I A I G T L A G V A k h
1PQ3	(84)	nlI vn P r SV G L A N q e L Aev V s r AV s d gy SC V T L G GD H S L A I G T I s G H ar h
1RLA	(66)	-i V kn P r SV G k A ne g L Aav V aet Q kn g t i SV V L C GD H S M A I G S I S G H A r v
		aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa bbbbbbb 333aaaaaaaaa
Pfarg	(149)	yqn Lr VI W I D A h G D I n I P e t S ps G n Y h g M T L A H T L g l F kk k V py -few se
1CEV	(113)	yer LG VIW Y D A h G D V nt Aet S ps G n I h g M P L A A S L g f gh pa L T q I g g ys -
1PQ3	(134)	cpd L CV V W V D A h A d I n T P l t T ss G n L h g Q P V S f L L re L q d kv pp q L pg F sw
1RLA	(115)	hpd L CV I W V D A h T D I nt P l t T ss G n L h g Q P V A F L L ke L k g k f pd V pg F sw
		bbbbbb 333 aaaaa
Pfarg	(198)	n l ty L k P en T A I I G I r did ay E ki I L k ke n In yy ti fd I e kn gi yn T ict
1CEV	(162)	--p K I k pe h V V L I G V r sl deg E kk f i r ek g I ki Y tm he V dr l g M tr V M ee
1PQ3	(184)	I k pc is S as IV Y I G L r dv d pp E h f i L kn yd I gy f sm rd I dr l g iq k V Mer
1RLA	(165)	V tp c Is A kd IV Y I G L r dv d pg E h yi I kt l g I ky F sm te V dk l g iq k V M ee
		333bbbbbbb aaaaaaaaaa bbbbaaaaaaaaa aaaaaa
Pfarg	(248)	A le k I d pn sn C p I H I S L D I D S V dn vf Ap G T G tv ak g G L ny re In l M ki L
1CEV	(210)	T ia y L ke r- T d g V H L S L D L D G L dps d Ap G V G tp vi g G L ty r e sh L A M e m L
1PQ3	(234)	T fd l L i g kr q rp I H L S F D I D A F d pt l Ap A I g tp vv g G L ty r e G My I A ee I
1RLA	(215)	T fs y L l g rk kr p I H L S F D V D G L dp vf T p A I g tp vv g G L sy r e G ly I T ee I
		aaaaaa bbbbbbb333 aaaaaaaaaaaa
Pfarg	(298)	aet kr V v S M D L V E V N ps L D ev d kk vh g d sl pi l dn at k T G k L C l e L I A R V
1CEV	(259)	ae agi I t S A E F V E V N pi l D ----- er nk T A sv A V a L M G S L
1PQ3	(284)	hnt gl L s A L D L V E V N pg l At ----- se ee akt T A N L A V d V I A S S
1RLA	(265)	ykt gl L s G L D I M E V N pt l G k----- t pe ev tr T v n T A V a L T l S C
		aaa bbbbbbb 333 aaaaaaaaaaaaaaaaaa
Pfarg	(348)	Lgydiv
1CEV	(294)	Fgekln
1PQ3	(323)	fgqtreg
1RLA	(304)	Fgtkre gn hkp et dyl

Abb. 21. Multiples Sequenz-Alignment der Pfarg mit der Arginase von *B. caldovelox* (1CEV), der humanen Arginase Typ II (1PQ3) und der RLA (1RLA). Hervorgehoben sind α -Helix (rot, a) β -Faltblatt (blau, b) und "3-turn"-Helix (braun, 3). Großgeschriebene aa sind unzugänglich, kleingeschriebene zugänglich für Lösungsmittel; aa, die Wasserstoffbrücken zu Amiden (fettgedruckt) und zu Carbonylgruppen (unterstrichen) der Hauptkette ausbilden. Kursiv sind solche mit positiven Phi-Winkeln.

3.1.7.2 Modellierung der trimeren Struktur von PfARG

Drei Strukturmodelle des PfARG Trimers inklusive des Kofaktors Mangan wurden mittels des Programms MODELLER erstellt und durch PyMOL Viewer visualisiert. Alle drei Strukturvorlagen (1RLA, 1PQ3 und 1CEV) dienen jeweils zum Modellieren des PfARG Monomers. Mittels ProFIT wurden die Strukturen der jeweiligen Vorlagestruktur übereinander gelegt, um deren Übereinstimmung zu prüfen. Da die Strukturen nicht deutlich voneinander abwichen, wurde für die Modellierung des PfARG-Trimers die Struktur 1PQ3 verwendet. Abb. 22 zeigt die Übereinstimmung der Struktur 1PQ3 (blau) mit dem erstellten Strukturmodell der PfARG (grün). Bis auf wenige Stellen, vor allem im Bereich des N-Terminus und der verkürzten plasmodialen Insertionen, überlappen sich die beiden Modelle fast gänzlich.

A



B

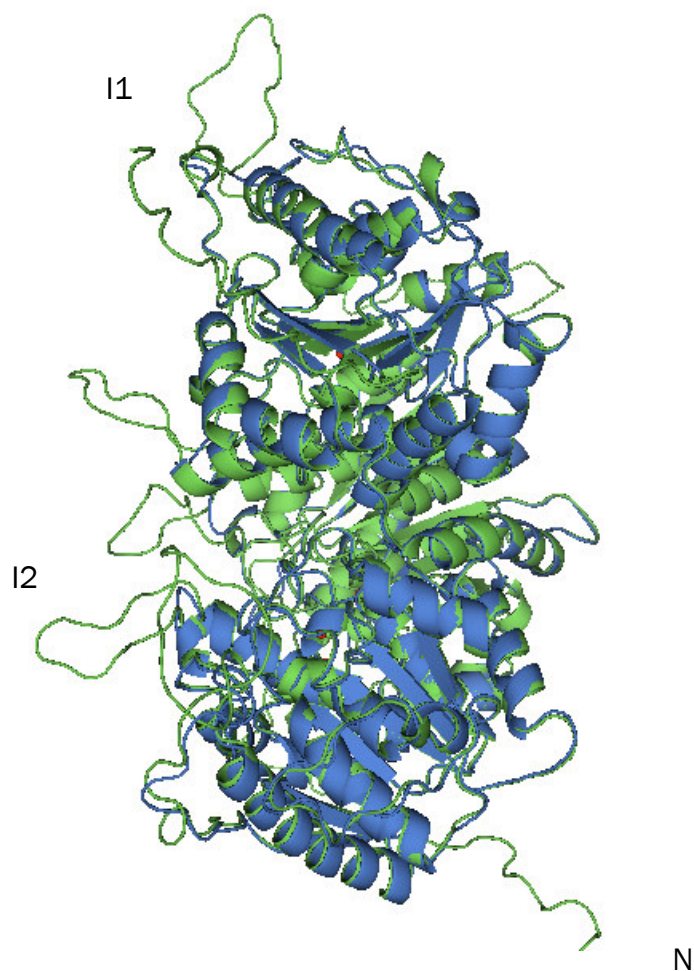


Abb. 22. Die Struktur des plasmodialen Trimers (grün) wurde an der Struktur 1PQ3 der humanen Arginase II (blau) modelliert und übereinandergelegt. Pro aktivem Zentrum liegen zwei Mn^{2+} (rot) vor. (A) Aufsicht: die grosse Insertion (I1) liegt jeweils an der Außenseite. (B) Seitensicht: die kleinen Insertionen (I2) liegen mittig an der Berührungzone der Monomere. Sowohl Insertionen als auch N-Terminus (N) weisen keine Struktur auf, da sie nicht modelliert werden konnten.

In jedem aktivem Zentrum wurden zwei Mn^{2+} in das Modell eingebracht. Ihre Position wurde derjenigen in der 1PQ3 Kristallstruktur vermessenen Mn^{2+} angeglichen. Da die Kristallstruktur der 1PQ3 ohne N-terminale Verlängerung vermessen worden war, konnte der N-terminus (N) der PfARG nicht modelliert werden. Des Weiteren konnte anhand des Modells gezeigt werden, dass im plasmodialen Enzym die verkürzten großen Insertionen (I1) an der Aussenseite und die kleinen Insertionen (I2) an den Berührungsstellen der Monomere liegen. Auch die Insertionen sind ohne Struktur, da es dafür keine Vorlage gibt.

3.1.7.3 Evaluierung der Qualität des Strukturmodells

Um das Strukturmodell zu optimieren, wurden 20 Modelle parallel mittels MODELLER berechnet. Die Qualität des Modells wurde anschließend durch PROCHECK evaluiert. Sie hängt unter anderem davon ab, wie viele Aminosäurenreste anhand ihrer Phi- und Psi-Winkelstellung einer Struktur zugewiesen werden können. Um dies am besten darzustellen, wurde hierzu der Ramachandran-Plot verwendet. Abb. 23 zeigt, dass 90,9% aller Reste in den am meisten favorisierten Regionen liegen, wodurch das Modell als sterisch stabil angesehen werden kann. Lediglich zwei der Reste befinden sich außerhalb der Regionen, denen eine Struktur zugewiesen wurde (Ile und Asn).

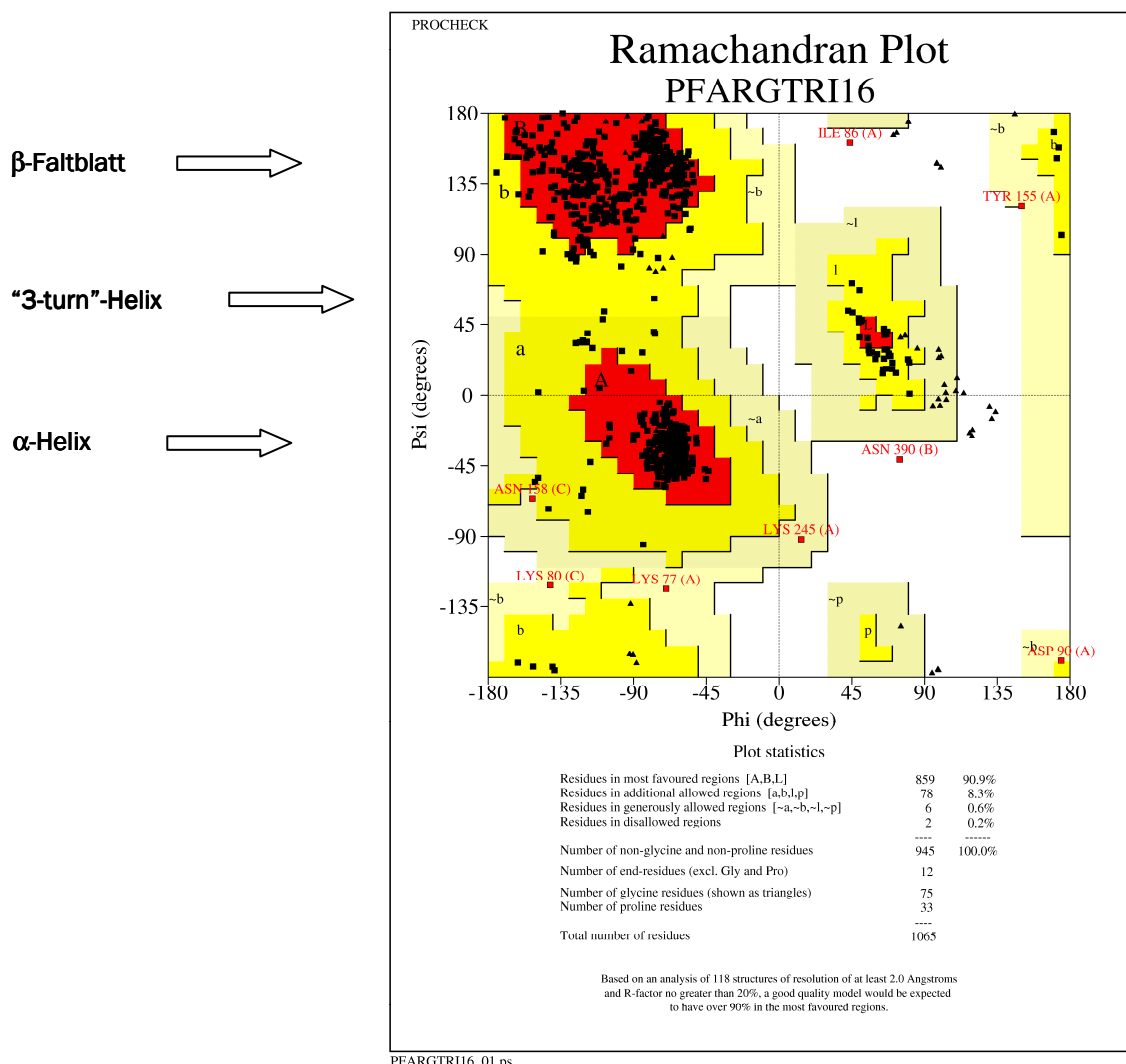


Abb. 23. Ramachandran Plot für das Modell des PfARG Trimers. Die Berechnung wurde mit PROCHECK durchgeführt. Anhand der Stellung der Phi- und Psi-Rotationswinkel konnten 90,9% der Aminosäuren einer Sekundärstruktur zugewiesen werden, zwei Aminosäuren (Ile und Asn) befinden sich in keiner zulässigen Region.

3.1.7.4 Koordination der Manganionen im aktiven Zentrum

Bereits durch die biochemischen Experimente konnte gezeigt werden, dass die trimere Struktur der *PfARG* manganabhängig ist. Nun sollten anhand des Modells die Aminosäuren, welche die Manganionen (Mn^{2+}) koordinieren, näher untersucht werden. Wie bereits aus der Primärsequenz der *PfARG* (siehe Abb. 2) bekannt, befinden sich die manganbindenden Aminosäurereste auch im Strukturmodell an ihren konservierten Stellen. Sie liegen im aktiven Zentrum, welches aus sieben von α -Helices umgebenen β -Faltblättern besteht. Die Ausrichtung dieser Aminosäurereste und deren Koordination der beiden Mn^{2+} kann anhand des Modells vorhergesagt werden. Demnach wird Mn_A von His193, Asp216, Asp220 und Asp323 koordiniert, während Mn_B durch His218, Asp216, Asp323 und Asp325 stabilisiert wird. Anhand des statischen Modells konnten keine Unterschiede der Ausrichtung dieser Aminosäuren im Vergleich zum humanen Enzym entdeckt werden (siehe Abb. 24).

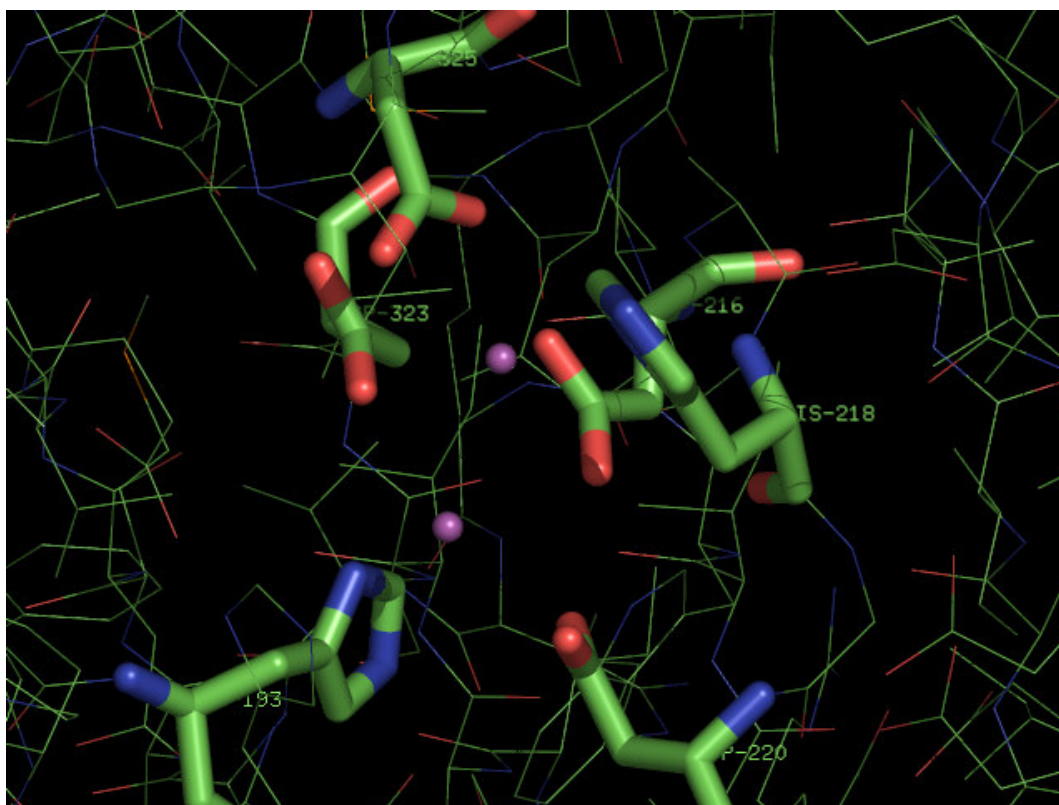


Abb. 24. Koordination der beiden Mn^{2+} (lila) im aktiven Zentrum. Die Aminosäuren His193, Asp216, Asp220, Asp323 koordinieren Mn_A . His218, Asp216, Asp323 und Asp325 koordinieren Mn_B .

3.1.8 Mutationsanalyse der Manganbindungsstellen

Um die Beteiligung der in Abb. 24 gezeigten manganbindenden Aminosäuren an Struktur und Enzymaktivität im einzelnen zu untersuchen, wurden diese in der rekombinanten PfARG durch ortsspezifische Mutagenese-PCR gegen die inerte Aminosäure Alanin ausgetauscht. Die mutierten Proteine wurden durch analytische Gelfiltration fraktioniert. Mittels Dot-Blot und spezifischem Anti-PfARG-Antikörper konnte gezeigt werden, in welcher Fraktion sie eluieren, wodurch sie als Trimer oder Monomer identifiziert werden konnten. Parallel dazu wurde ihre Aktivität bestimmt und mit der des Wildtyps verglichen (siehe Abb. 25).

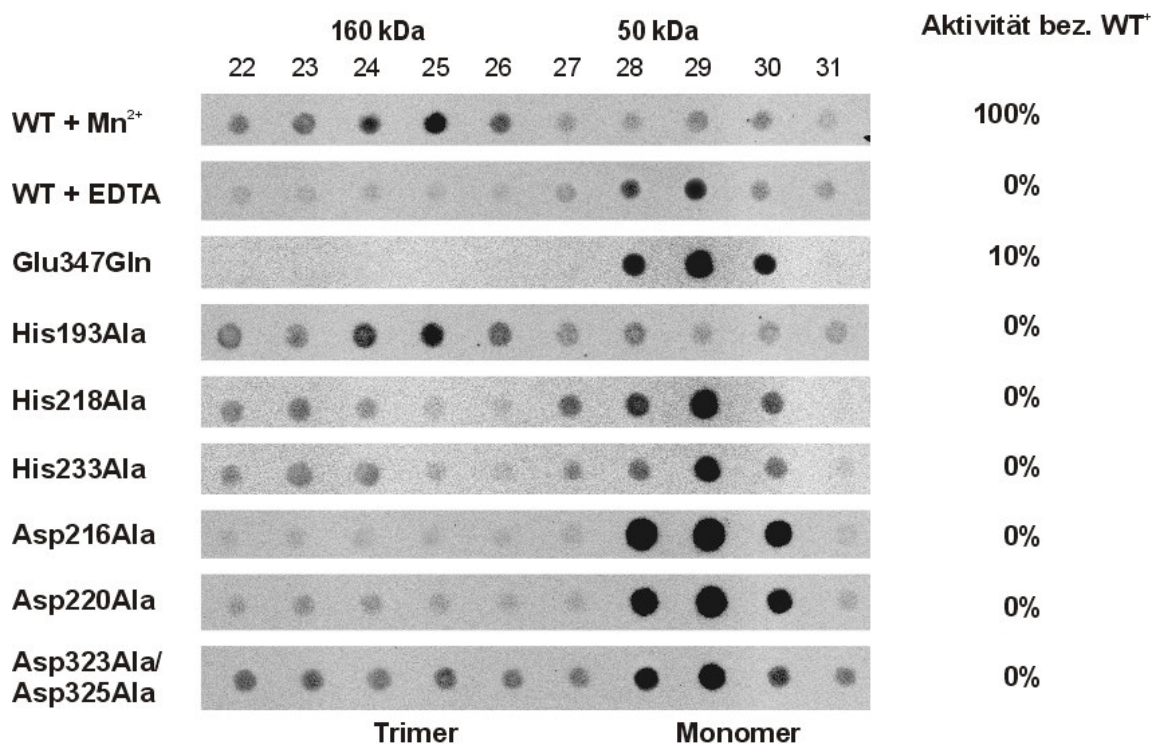


Abb. 25. Dot-Blot-Analyse der PfARG Mutanten. (A) Nach Gelchromatographie mit Sephadex S-200 (1 x 30 cm) wurden 0,5 ml der Fraktionen auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einem spezifischen Anti-PfARG-Antikörper beprobt. Der Nachweis erfolgte durch ECL. (B) Enzymaktivitäten relativ zu der des Wildtyps (WT). Die Mutanten wurden alle in Gegenwart von MnCl₂ eluiert und getestet.

Alle Mutanten bis auf His193Ala eluierten als inaktive Monomere. Die Mutation von His193Ala führte jedoch zu inaktiven Trimeren. Zwei weitere Mutationen hoch konservierter Aminosäuren wurden zur Kontrolle erstellt: Glu347Gln und His233Ala. Glu347 entspricht Glu256 in der humanen Arginase II und liegt an der Berührungsstelle zwischen den Monomeren. Seine Funktion wurde in der inter- und intramolekularen Stabilität des Proteins vorhergesagt (Sabio et al., 2001). Durch die Mutation der polaren Aminosäure Glutamin zum negativ geladenen Glutamat verlor das PfARG seine trimere Struktur. Interessanterweise konnte bei dieser Mutante nur noch eine Restaktivität von 10% relativ zur Wildtyp-PfARG erzielt werden. Eine weitere Kontrolle wurde durch die Mutation His233Ala erbracht. His233 liegt im aktiven Zentrum, ist aber nicht an der Bindung der Mn^{2+} beteiligt. Untersuchungen an der RLA zeigten, dass His141 (analog zum His233 in PfARG) die Guanidiniumgruppe des Substrats deprotoniert und dadurch für die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum verantwortlich ist (Khangulov et al., 1998). Die Mutation His233Ala führte neben dem erwarteten Aktivitätsverlust zudem zur Dissoziation des Trimers. Die Ergebnisse zeigen, dass die oligomere Struktur der PfARG weitaus instabiler ist als jene der Säugerarginasen.

3.2 Homologie-Suche nach Genen der alternativen Polyaminsynthese

Die Synthese von Putrescin kann auch über Agmatin erfolgen. Hierfür wird Arginin zu Agmatin decarboxyliert. Dieser enzymatische Schritt wird von der ADC katalysiert. Im Genom von *P. falciparum* konnte anhand eines „BLAST search“ mit der ADC von *E. coli* ein ORF von 7'248 bp identifiziert werden (PFD0285c), der von PlasmoDB als putative Lysin-Decarboxylase (EC 4.1.1.18) beschrieben wird. Die weitere Einordnung dieser putativen Aminosäure-Decarboxylase, deren abgeleitete Aminosäuresequenz 2'415 aa beträgt, sollte über die Substratspezifität erfolgen. Jedoch konnte dieses plasmodiale Protein in *E. coli* nicht rekombinant exprimiert werden. In Abb. 26 sind konservierte Domänen der Ornithin-/Lysin-/Arginin-Decarboxylase-Familie, ermittelt durch NCBI-BLAST, der PFD0285c dargestellt. Anhand unterschiedlicher Algorithmen (pfam01276.11 und COG1982) wird deutlich, dass die konservierte Domäne in der plasmodialen Sequenz durch einen homologiefreien Bereich von etwa 300 aa unterbrochen ist. Zudem konnten etwa 500 aa vor und etwa 900 aa hinter der Domäne auch keine weiteren Homologien zu anderen Proteinen identifiziert werden. Auch sind plasmodientypische „low complexity“-Regionen sichtbar, deren Funktion nach wie vor ungeklärt ist.

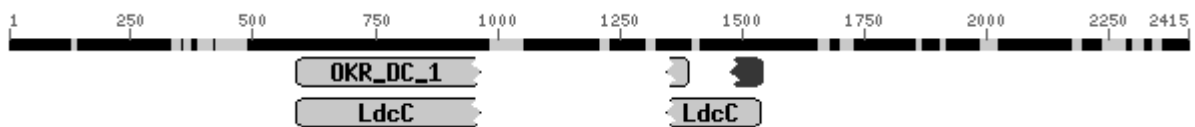


Abb. 26. Aminosäuresequenz der putativen Aminosäure-Decarboxylase (2'415 aa) mit „low complexity“-Regionen (hellgrau). Das plasmodiale Protein weist sowohl die Hauptdomäne als auch den C-Terminus der Ornithin-/ Lysin-/ Arginin-Decarboxylase-Familie nach pfam01276.11 (OKR_DC) und der LDC nach COG1982 (LdcC) auf.

Weitere Homologien zu Enzymen des alternativen Polyaminsynthese-Wegs wie Agmatinase (EC 3.5.3.11), Agmatin-Deimiase (EC 3.5.3.12) und N-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase (EC 3.5.1.53) konnten im plasmodialen Genom mittels „BLAST search“ nicht identifiziert werden.

3.3 ***Bedeutung der PfAdoMetDC/ODC in P. falciparum-Blutstadien***

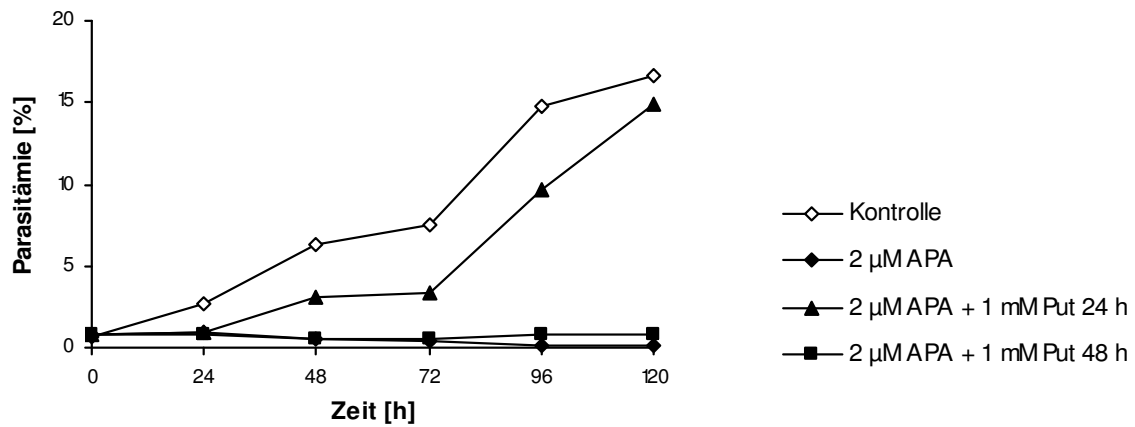
Die Frage, ob ein Protein für das Überleben eines Organismus essentiell ist, kann durch die Inaktivierung mittels spezifischer Inhibitoren oder anhand eines genetischen Knockouts beantwortet werden. Um die Bedeutung der bifunktionellen PfAdoMetDC/ODC für das Überleben von *P. falciparum*-Blutstadien zu evaluieren, wurden beide Strategien angewandt.

3.3.1 *Einfluss spezifischer PfODC-Inhibitoren auf das Zellwachstum*

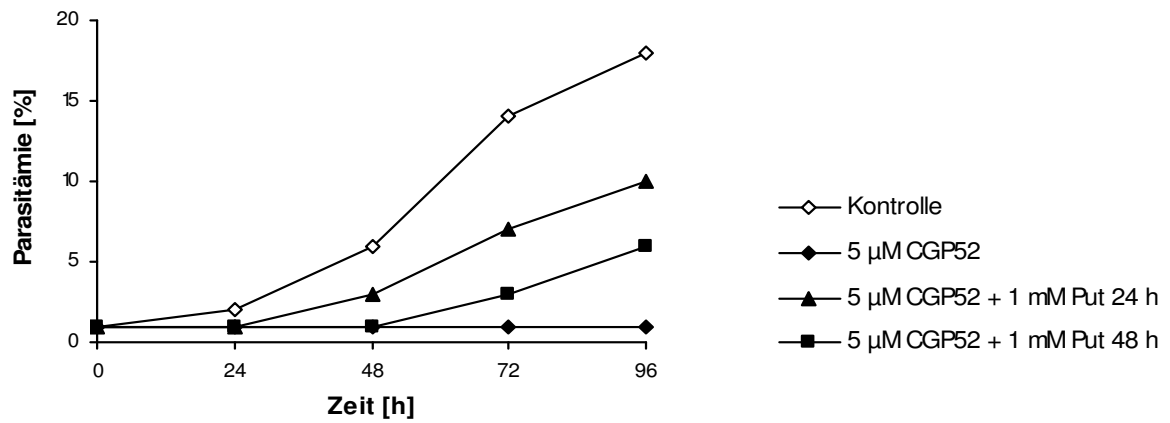
Neben DFMO, einem spezifischen ODC Inhibitor, wurden kürzlich weit potentere Inhibitoren der PfODC wie 1-Aminoxy-3-Aminopropan (APA), CGP 52622A und CGP 54169A beschrieben. Sie wirken bereits in niedrigen micromolaren Konzentrationen antiplasmodial (Das Gupta et al., 2005).

Eine sich im Ringstadium befindende synchrone Plasmodienkultur wurde jeweils mit der doppelten IC₅₀-Konzentration der Inhibitoren APA, CGP 52622A und CGP 54169A behandelt. Das Wachstum und die Entwicklung der behandelten Parasiten wurden über die Zeit mikroskopisch verfolgt. Die drei Inhibitoren übten einen cyto-statischen Effekt aus, welcher eine Blockierung der Parasitenentwicklung im Trophozitenstadium zeigte. Dieser hemmende Effekt aller drei Inhibitoren konnte nach 24 h durch Zugabe von 1 mM Putrescin aufgehoben werden. Im Gegensatz zu CGP 52622A (Abb. 27B) und CGP 54169A (Abb. 27C) ist aus Abb. 27A ersichtlich, dass die Inhibierung durch APA das Wachstum der Kultur stärker beeinträchtigt. Auch die Verlängerung der Testdauer um weitere 24 h führte zu keiner deutlichen Erholung der Kultur.

A



B



C

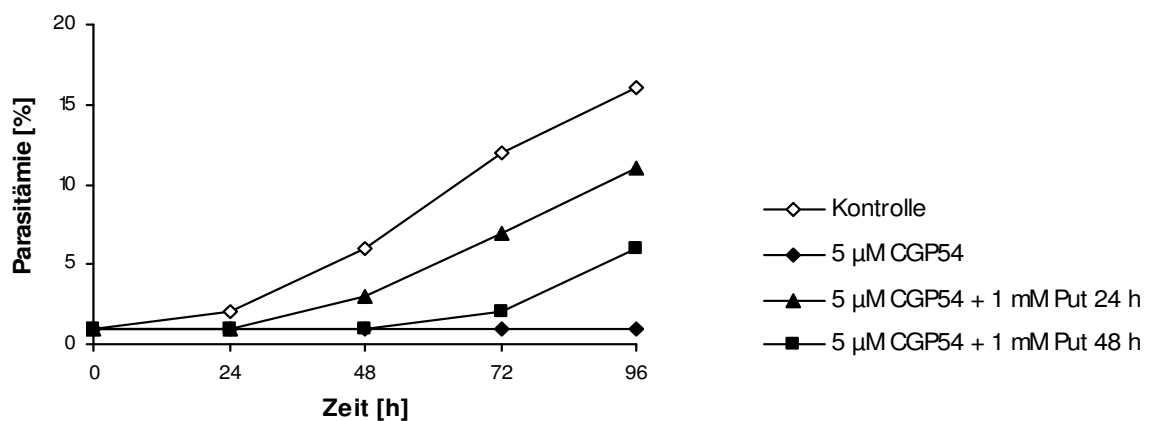


Abb. 27. Wirkung spezifischer PfODC-Inhibitoren auf die Kultur: (A) 2 µM APA, (B) 5 µM CGP 52622A (CGP52) und (C) 5 µM CGP 54169A (CGP54). Nach 24 h und 48 h wurde die Plasmodienkultur mit 1 mM Putrescin (Put) versehen. Die Zellen wurden mikroskopisch ausgewertet, wobei zu jedem Zeitpunkt mindestens 1'000 Erythrozyten ausgezählt und die Parasitämie ermittelt wurde.

3.3.2 Genetische Veränderung des PfAdoMetDC/ODC-Genlokus

Für die genetische Modifizierung wurden verschiedene DNA-Konstrukte in *P. falciparum* transfiziert. Eines führt zur Deletion des gesamten Gens (pHTK-SO-Ko). Ein weiteres zerstört nur die PfODC-Domäne, ohne dabei die PfAdoMetDC zu beeinträchtigen (pHTK-O-Ko). Zudem sollte mit einem dritten Konstrukt die Einführung einer inaktivierenden Doppelmutation in die endogene PfODC erzielt werden (pHTK-Om). Der erfolgreiche Knockout eines essentiellen Gens ist praktisch nicht nachweisbar, da die Zellen nicht überleben. Um das Problem eines möglichen letalen Knockouts der PfAdoMetDC/ODC zu umgehen, wurde das Medium der transgenen Plasmodien mit den Reaktionsprodukten Spermidin und Putrescin ergänzt. In Abb. 28 sind die drei Transfektionskonstrukte schematisch dargestellt. Sie werden in den folgenden Abschnitten detaillierter beschrieben.

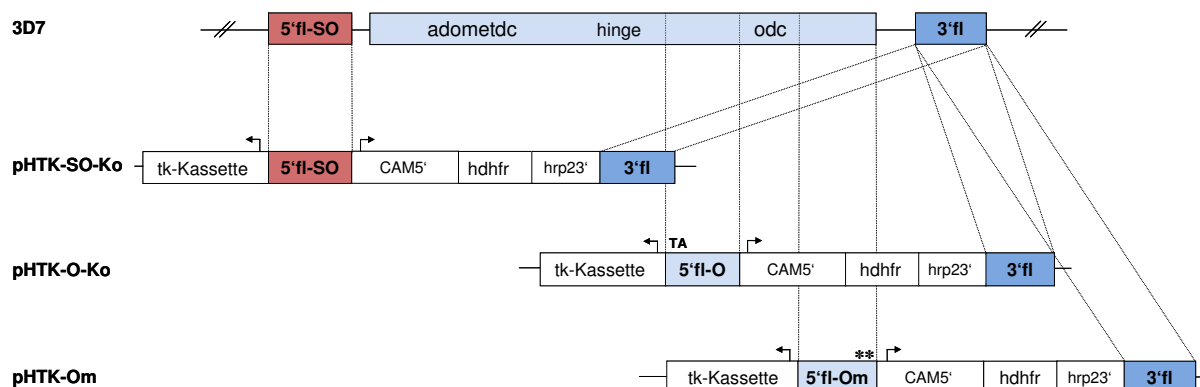


Abb. 28. Schematische Darstellung der Transfektionskonstrukte zur genetischen Modifikation des PfAdoMetDC/ODC-Gens. 3D7 entspricht dem *adometdc/odc* Lokus des Wildtyps (hellblau); pHTK-SO-Ko (Knockout des gesamten Gens), pHTK-O-Ko (Deletion der ODC-Domäne mit TA-„frameshift“) und pHTK-Om (ODC inaktivierende Doppelmutation, Sternchen). Für die Rekombination wurden die 5'- (rot bzw. hellblau) und 3'- (blau) Flanken (fl) verwendet. Die feinen Linien zeigen die Rekombinationsregionen an. CAM5': plasmodialer Calmodulin-Promotor; hdhfr: humane Dihydrofolat-Reduktase; hrp23': Terminationselement der hdhfr-Expression; tk-Kassette: Thymidinkinase mit Promotor und Terminationselement.

3.3.2.1 Das Knockout-Konstrukt pHTK-SO-Ko

Durch das Konstrukt pHTK-SO-Ko wird das gesamte Gen der *PfAdoMetDC/ODC* deletiert. Der hierfür verwendete Transfektionsvektor war pHTK. Er besitzt als positiven Selektionsmarker die humane Dihydrofolat-Reduktase (hDHFR), welche im Vergleich zum plasmodialen Enzym unempfindlicher gegenüber Pyrimethamin ist. Des Weiteren trägt pHTK eine virale Thymidinkinase (TK) zur negativen Selektion mit Ganciclovir. Dies führt zum Verlust der Episom-tragenden Transfektanden und somit zu einer schnelleren Selektion der Integranten (Duraisingh et al. 2002). Um ein Doppelcrossover zu erzielen, wurden die 5'-flankierende (5'fl-SO) oberhalb und 3'-flankierende Sequenz (3'fl) unterhalb der hDHFR-Kassette in den Vektor kloniert (Abb. 28). Mittels homologer Rekombination sollte das Gen durch die Pyrimethamin-Resistenzkassette, bestehend aus dem Calmodulin-Promotor (CAM5'), dem Gen der humanen Dihydrofolat-Reduktase (hdhfr) und dem Terminationselement (hrp23'), ersetzt werden. Die daraus resultierende Integration sollte mittels *EcoR* I-Verdau und anschließendem Southern-Blot anhand einer 3,7 kb-Bande detektiert werden (Abb. 29).

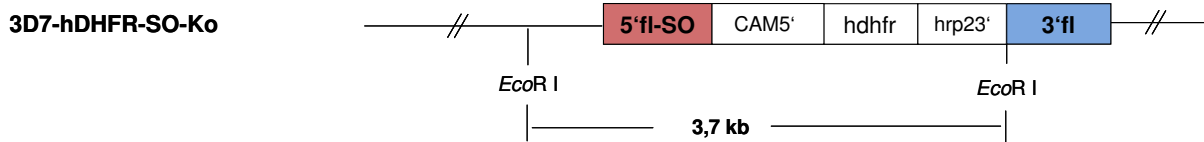


Abb. 29. Schematische Darstellung der transgenen Plasmodien 3D7-hDHFR-SO-Ko. Bei korrekter Integration der Pyrimethamin-Resistenzkassette entsteht durch den *EcoR* I-Verdau eine Bande von 3,7 kb. (Weitere Bezeichnungen, siehe Abb. 28).

3.3.2.2 Zerstörung der PfODC durch das Konstrukt pHTK-O-Ko

Anhand des zweiten Transfektionskonstrukts pHTK-O-Ko (siehe Abb. 28), welches zur Zerstörung der *PfODC*-Domäne führt, die *PfAdoMetDC*-Domäne jedoch nicht verändert, sollte die Bedeutung der *PfODC* für den Parasiten untersucht werden. Der verwendete Transfektionsvektor war ebenfalls pHTK (siehe 3.2.2.1). Für die homologe Rekombination wurde die 5'-flankierende Sequenz (5'fl-O) so gelegt, dass sie vom Start-Codon etwa 850 bp ins *PfODC*-Gen hineinreicht. Des Weiteren trägt 5'fl-O im 5'-Bereich zwei zusätzliche Nukleotide (TA), die zu einer Verschiebung des Leserahmens („frameshift“)

und somit zu einem Stopp-Codon führen. Die zweite Flanke (3'fl) entspricht derjenigen des Konstrukts pHTK-SO-Ko. Der Nachweis der richtigen Modifizierung der endogenen PfODC erfolgt, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, anhand einer durch EcoR I-Verdau entstandenen 3,7 kb-Bande im Southern-Blot (Abb. 30).

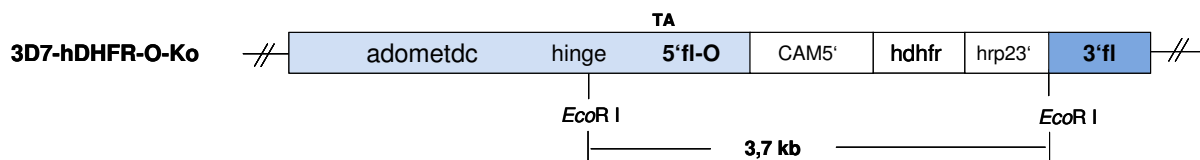


Abb. 30. Transgene Plasmodien (3D7-hDHFR-O-Ko) nach homologer Rekombination mit pHTK-O-Ko. Die Integration ist anhand einer durch EcoR I-Verdau entstandenen 3,7 kb-Bande diagnostizierbar. In der 5'fl-O befinden sich zwei zusätzliche Nukleotide, welche zu einem TA-„frameshift“ und somit zu einem Abbruch der verbleibenden PfODC-Sequenz führen. (Weitere Bezeichnungen siehe Abb. 28).

3.3.2.3 Einführung einer inaktivierenden Doppelmutation in PfODC

Das dritte in Abb. 28 dargestellte Konstrukt ist pHTK-Om. Mittels dieses Konstrukts wird eine Doppelmutation (C1355A und D1356A) in die PfODC eingefügt. Die genetische Veränderung durch dieses Konstrukt ergibt ein vollständiges bifunktionelles Protein, dessen PfODC durch die Doppelmutation inaktiv ist (Wrenger et al., 2001, siehe 1.3.3). Das Konstrukt pHTK-Om unterscheidet sich von den beiden unter 3.2.2.1 und 3.2.2.2 beschriebenen Konstrukten durch die 5'-flankierende Sequenz (5'fl-Om). Sie umfasst das Ende der PfODC und trägt die Doppelmutation im 3'-Bereich. Wie in Abb. 31 dargestellt, sollten diese transgenen Parasiten (3D7-hDHFR-Om) im Southern-Blot anhand einer durch EcoR I-Verdau entstandenen 4,3 kb-Bande nachgewiesen werden.

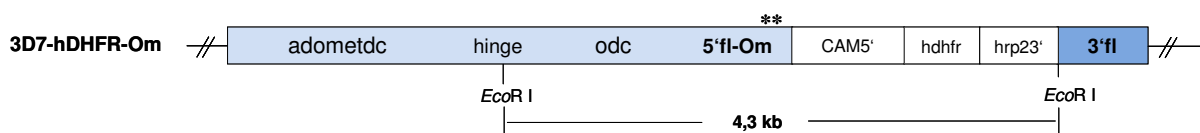


Abb. 31. Darstellung der mit pHTK-Om veränderten Parasiten (3D7-hDHFR-Om). Mittels EcoR I-Verdau kann die Integration anhand einer 4,3 kb-Bande nachgewiesen werden. Die Doppelmutation ist mit Sternen gekennzeichnet. (Weitere Bezeichnungen siehe Abb. 28).

3.3.2.4 Analyse der transgenen Plasmodien

Die Transfektion wurde durch Elektroporation zirkulärer DNA vorgenommen. Nach 21 Tagen Selektion mit Pyrimethamin waren die ersten resistenten Parasiten mikroskopisch nachweisbar. Um eine Integration zu erzielen, wurde ein Teil der Zellen mit Ganciclovir behandelt, der andere einer Reihe von Selektionszyklen unterworfen, in denen der Selektionsdruck durch Pyrimethamin für drei Wochen von der Kultur genommen und anschließend wieder angesetzt wurde. Gesamt-DNA der verschiedenen Transfektanden wurde mittels Southern-Blot analysiert (Abb. 32). Der Blot wurde mit einer CAM5'-Sonde beprobt (Abb. 32). Da *EcoR* I nur einmal im Vektor schneidet, entspricht die 9,5 kb-Bande den jeweiligen Transfektionskonstrukten pHTK-O-Ko, pHTK-SO-Ko und pHTK-Om. Nach erfolgreichem Doppelcrossover integriert die gesamte hDHFR-Kassette über die homologen Stellen in den *PfAdoMetDC/ODC*-Lokus. Durch den *EcoR* I-Verdau entsteht bei erfolgreicher Deletion des gesamten Gens und der Zerstörung der *PfODC*-Domäne jeweils ein 3,7 kb Fragment, bei Insertion der Doppelmutation ein 4,3 kb Fragment. Die im Wildtyp zu erkennende 2,8 kb-Bande entspricht dem endogenen CAM5', der auch in den Transfektanden nachweisbar ist. Als Kontrolle ist in Abb. 32 rechts außen der 7,6 kb große pHTK aufgetragen.

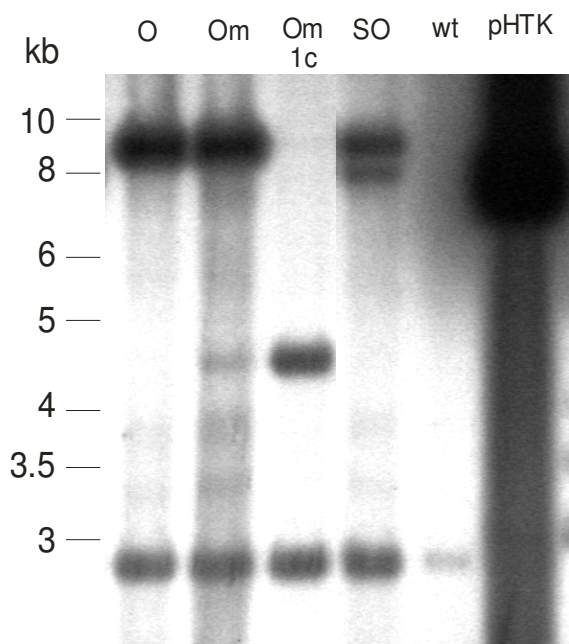


Abb. 24. Southern-Blot-Analyse der Transfektanden. 10 µg Gesamt-DNA der verschiedenen Transfektanden wurden mit *EcoRI* verdaut und der Blot mit einer radioaktiv markierten CAM5'-Sonde beprobt. Der leere Vektor (pHTK) erscheint als 7,6 kb-Bande. In allen anderen Spuren inklusive Wildtyp (wt) ist eine dem endogenen CAM-Promotor (CAM5') entsprechende Bande von 2,8 kb sichtbar. Nach einem Zyklus der pHTK-Om Zellen ist anstelle des Episoms (9,5 kb) eine Integrationsbande von 4,3 kb (Om 1c) sichtbar. Die Transfektanden pHTK-O-Ko (O) und pHTK-SO-Ko (SO) zeigen nur die episomale Bande von 9,5 kb.

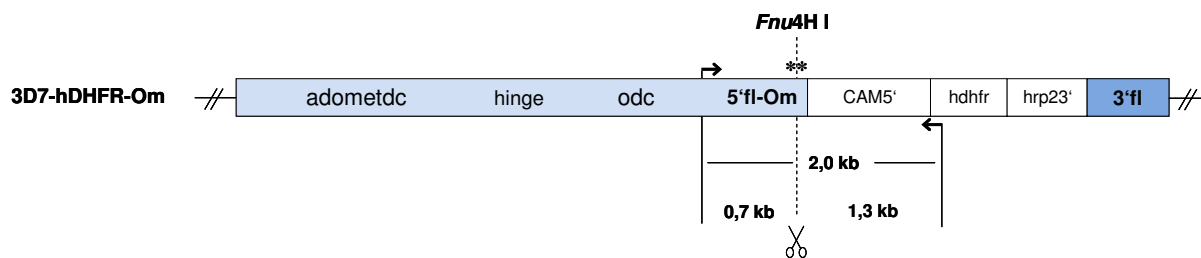
Bereits im ersten Zyklus konnte eine Integration des Konstruktes pHTK-Om anhand der 4,3 kb-Bande festgestellt werden. Das Episom ist hingegen kaum noch detektierbar. Für die übrigen Konstrukte konnte die erwartete Integrationsbande von 3,7 kb nicht nachgewiesen werden. Weder die Behandlung mit der doppelten Konzentration an Ganciclovir noch weitere Selektionszyklen mit Pyrimethamin führten zur Deletion des gesamten Gens oder der Zerstörung der PfODC.

3.3.2.5 PCR- und Restriktionsanalyse der 3D7-hDHFR-Om Transfektanden

Nachdem die Integration des pHTK-Om-Konstrukts sichtbar war, wurde die Transfektandenpopulation 3D7-hDHFR-Om vereinzelt. Zehn Klone wurden isoliert. Durch die Integration der Doppelmutation sollte eine zusätzliche *Fnu4H* I-Schnittstelle im Genom entstehen, anhand welcher die Klone mittels integrationspezifischer PCR und anschließend *Fnu4H* I-Verdau auf das Tragen der Mutation untersucht werden sollten. Für die Integrations-PCR wurde der endogene Sense-Primer (Tk-Om-s) und der in der hDHFR liegende Antisense-Primer (hDHFR-as) verwendet. Wie in Abb. 33A dargestellt, ist das resultierende PCR-Fragment 2,0 kb groß. Nach *Fnu4H* I-Verdau sollten aus dem PCR-Produkt zwei Fragmente von 0,7 kb und 1,3 kb entstehen.

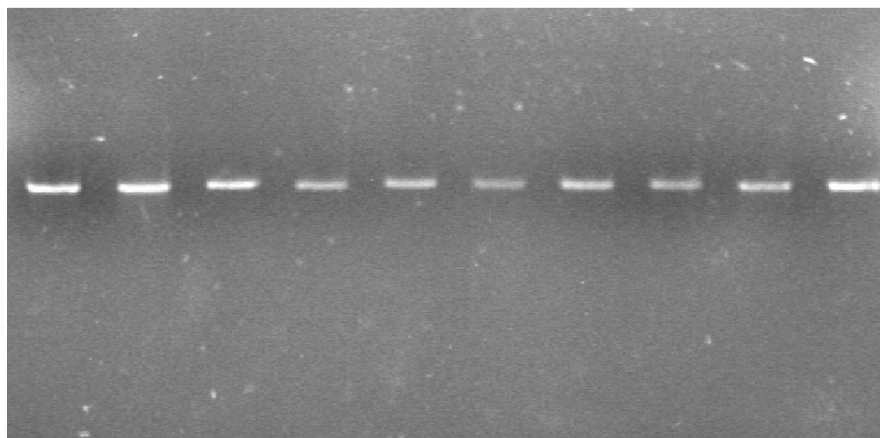
Die Abb. 33B zeigt, dass das 2,0 kb PCR-Produkt bei keinem der isolierten Klone mit *Fnu4H* I geschnitten werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass zwar die Resistenzkassette, nicht aber die Doppelmutation integriert vorliegt. Bei darauffolgender Analyse der gesamten 3D7-hDHFR-Om-Population stellte sich heraus, dass auch diese ausschließlich die 2,0 kb-Bande zeigt (Abb. 33C). Hingegen konnte das mit dem vektorspezifischen Primer (Tk-seq-s) und dem Antisense-Primer (hDHFR-as) amplifizierte PCR-Produkt der 3D7-hDHFR-Om-Population, welches dem Episom entspricht, mit *Fnu4H* I geschnitten werden. Beide erwarteten Fragmente von 0,7 kb und 1,3 kb sind in Abb. 33C zu erkennen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Episome, die in der Population zu finden sind, nach wie vor die Doppelmutation tragen.

A



B

B2 B3 B11 C7 C9 E1 G4 G8 H1 H6



C

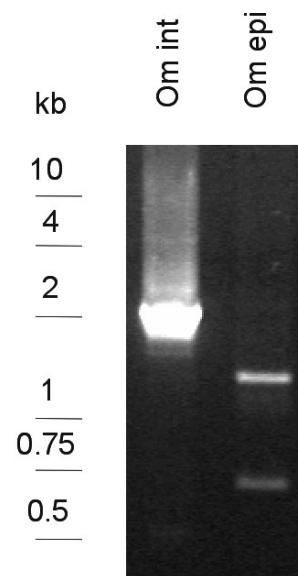


Abb. 33. PCR- und Restriktionsanalyse der 3D7-hDHFR-Om-Integration. (A) Schematische Darstellung der 3D7-hDHFR-Om-Integration. Die Bande des integrationsspezifischen PCR-Produkts ist 2,0 kb. Der *Fnu4HI*-Verdau des Produkts ergibt zwei Banden von 0,7 kb und 1,3 kb. (B) Zehn aus der 3D7-hDHFR-Om-Population isolierte Klone, analysiert mittels integrationsspezifischer PCR und *Fnu4HI*-Verdau. (C) Integrationspezifische (Om int) und vektorspezifische (Om epi) PCR der 3D7-hDHFR-Om-Population mit anschließendem *Fnu4HI*-Verdau der PCR-Produkte. (Weitere Bezeichnungen siehe Abb. 28).

In der gesamten 3D7-hDHFR-Om-Population führte die Integration zur Wiederherstellung des *PfAdoMetDC/ODC*-Gens, ohne jedoch dabei die Doppelmutation einzufügen. Somit musste das Crossover in 5'fl-Om in allen Zellen hinter der Mutation, also am Ende der homologen Sequenz erfolgt sein. Dies deutet darauf hin, dass die Integrierten ohne Mutation gegenüber den mutationstragenden Parasiten einen Selektionsvorteil besitzen. Um dies zu untermauern, wurde die Doppelmutation im pHTK-Om durch eine stille Mutation, welche keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz der *PfODC* hat, ersetzt.

3.3.2.6 Untersuchung der Rekombinationspräferenz anhand einer stillen Mutation

Da es nicht auszuschließen ist, dass Regionen des 5'-Bereichs bevorzugter rekombinieren, wurde das Konstrukt pHTK-Om so verändert, dass die Doppelmutation (5'-GCAGCA-3', *Fnu*4H I-Schnittstelle unterstrichen) mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR durch die stille Mutation (5'-TGTGAC-3', *Mae* III-Schnittstelle unterstrichen) ausgetauscht wurde. Das auf diese Weise entstandene Konstrukt pHTK-Om-still ist bis auf die Rückmutation zur Wildtyp-Aminosäuresequenz (A1355C und A1356D) identisch mit pHTK-Om (siehe Abb. 28). Bei einer Integration dieses Konstruktes sollte der Nachweis mittels integrationsspezifischer PCR und anschließendem *Mae* III-Verdau erfolgen. Nach erfolgreicher Transfektion der Plasmodien mit pHTK-Om-still wurden die Parasiten mit Pyrimethamin selektiert und „gezykelt“. Auch nach acht Selektionszyklen konnte mittels Southern-Blot-Analyse (siehe 3.3.2.4) keine Integration dieses Konstruktes detektiert werden.

3.3.3 Genetische Komplementierung des ODC-Knockouts mit der hODC

Die bis anhin unter 3.2.2. beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass die *PfAdoMetDC/ODC* essentiell für das Überleben des Parasiten ist. Selbst durch Zugabe der Reaktionsprodukte Putrescin und Spermidin konnten keine Knockout-Parasiten isoliert werden. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment mittels genetischer Komplementierung versucht, die fehlende ODC-Aktivität im Parasiten durch die Funktion des humanen Orthologs (hODC) zu ersetzen, wodurch die Knockout-Zellen ausschließlich auf die hODC angewiesen waren.

3.3.3.1 Erstellung des Komplementierungskonstrukts p Δ TK-O-hODCV5

Mit Hilfe des Konstrukts p Δ TK-O-hODCV5 sollte der Knockout der endogenen *PfODC* und Komplementierung durch die hODC in einem Schritt erfolgen. Für das Komplementierungskonstrukt wurde pHTK-O-Ko derart verändert, dass die 3'-Flanke des *PfAdoMetDC/ODC*-Gens deletiert und die virale TK durch die hODC ersetzt wurde. Da die zweite genflankierende Sequenz fehlt, kann die Integration in den *PfAdoMetDC/ODC*-Lokus nur über ein Single Crossover erfolgen, wodurch das gesamte Plasmid eingeführt würde. Zur späteren Detektion mittels Western-Blot wurde an das 3'-Ende des hODC-Gens ein V5-Epitop kloniert. Nach erfolgter Transfektion des Konstruktes kann die

korrekte Integration wie unter 3.2.2.2 beschrieben als 3,7 kb-Bande nachgewiesen werden (Abb. 34).

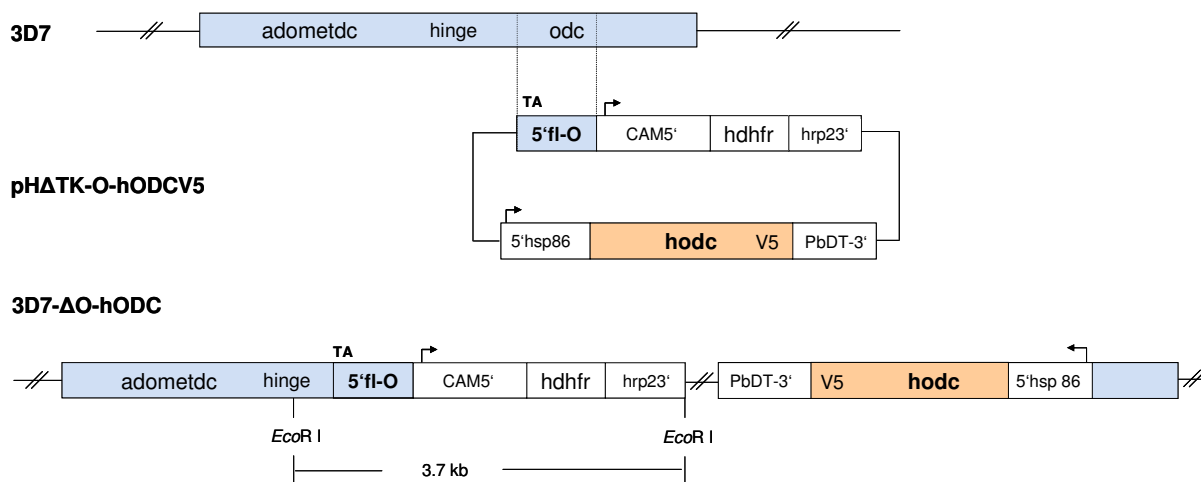


Abb. 34. Knockout und Komplementierung der PfODC durch die hODC (orange). Schematische Darstellung des 3D7 Wildtyp-Genlokus, des Konstrukts pH Δ TK-O-hODCV5 und der erwarteten Integration des Plasmids über Single Crossover, resultierend in der Mutante 3D7- Δ O-hODC. Anhand des *EcoR* I-Verdau entsteht bei erfolgreicher Integration eine 3,7 kb-Bande. (Weitere Bezeichnungen siehe Abb. 28).

3.3.3.2 Nachweis der Aktivität der hODC und ihre Expression im Parasiten

Die hODC wurde inklusive V5-Epitop in pBAD-TOPO subkloniert und im ODC-defizienten *E. coli*-Stamm EWH331 exprimiert. Die Aktivität der hODC wurde direkt im bakteriellen Zellhomogenat gemessen. Im Vergleich zur Basalaktivität der Zellen, die mit dem leeren Vektor pBAD-TOPO transformiert wurden, zeigte der hODC-exprimierende *E. coli*-Klon eine 10-fach erhöhte ODC-Aktivität. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die hODC funktionell ist.

Anschließend wurde das Komplementierungskonstrukt in *P. falciparum* transfiziert und die Parasiten mit Pyrimethamin selektiert. Nach 30 Tagen konnten resistente Parasiten mikroskopisch nachgewiesen werden. Der Nachweis der hODC im Parasiten wurde mittels Western-Blot erbracht. Hierfür wurden Wildtyp- und auch transgene Parasiten mittels Saponinlyse isoliert und das Plasmodienhomogenat mittels SDS-PAGE analysiert. Der Nachweis der hODC, in Abb. 35 dargestellt, wurde durch einen Anti-V5-Epitop-Antikörper erbracht. Die hODC besitzt inklusive V5-Epitop eine molekulare Masse von 52 kDa. Diese Bande ist nur in der 3D7- Δ O-hODC-Population zu erkennen, wodurch die Expression der hODC in den transgenen Parasiten eindeutig nachgewiesen werden konnte.

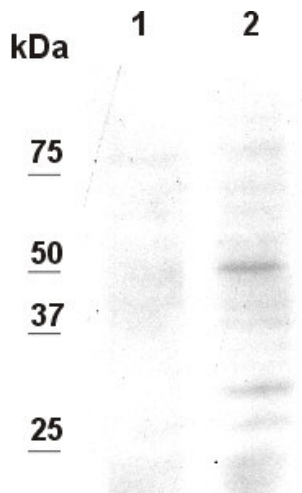


Abb. 35. Western-Blot der hODC in *P. falciparum*. Parasitenhomogenat von (1) Wildtyp und (2) 3D7- Δ O-hODC Population. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamt-Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit 1:5'000 verdünntem Anti-V5-Antikörper analysiert. Der Nachweis erfolgte mit ECL. Die 52 kDa-große hODC-V5 ist ausschließlich in Spur (2) zu erkennen.

Die 3D7- Δ O-hODC Zellen wurden mehreren Selektionszyklen mit Pyrimethamin unterworfen. Nach dem dritten Zyklus konnte die Integration des Plasmids nachgewiesen werden. Hierfür wurde Gesamt-DNA der Transfektanden sowie des Wildtyps wie unter 3.2.2.4 beschrieben analysiert. Abb. 36 zeigt, dass die erwartete Integration anhand der 3,7 kb großen Bande identifiziert werden kann. Da die Intensität der Integrationsbande im Vergleich zu der Bande des endogenen CAM5' schwächer ist, kann davon ausgegangen werden, dass nicht in allen Zellen dieser Population die endogene PfODC durch die Einführung des Komplementierungskonstrukts ersetzt wurde.

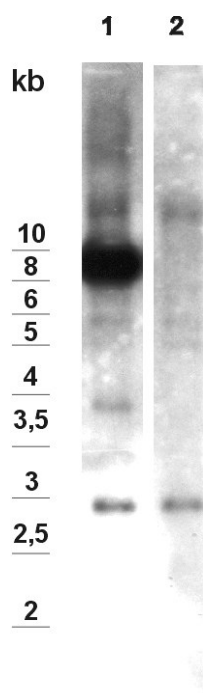


Abb. 36. Southern-Blot-Analyse der 3D7- Δ O-hODC-Population im dritten Zyklus. Durch *EcoR* I-Verdau und Hybridisierung mit einer CAM5'-Sonde ist die Integrationsbande von 3,7 kb detektierbar. Die kleinere Bande (2,8 kb) entspricht dem endogenen CAM5', die große Bande (ca. 9,5 kb) dem Episom. (1) 3D7- Δ O-hODC. (2) Wildtyp

3.3.3.3 Analyse der 3D7- Δ -O-hODC-Klone

Nachdem die Integrationsbande in der 3D7- Δ -O-hODC-Population detektiert wurde (Abb. 36), wurden 24 Einzelklone aus dieser Kultur isoliert und wiederum mittels Southern-Blot (siehe 3.2.2.4) analysiert. In Abb. 37 sind 12 dieser Klone dargestellt. Die Klone 1 - 4 wurden weiterhin auf Pyrimethamin gehalten. Die Klone 5 - 12 wurden ohne Pyrimethamin-Druck vereinzelt. In allen Klonen sind zwei Banden sichtbar. Die Untere mit 2,8 kb entspricht dem endogenen CAM5', die Obere 9,5 kb dem p Δ TK-O-hODCV5-Episom. Die für die Integration diagnostische Bande von 3,7 kb ist in keinem der isolierten Klone detektierbar. Die Klone, welche mit Pyrimethamin behandelt worden waren (1 - 4), zeigen eine stärkere Amplifizierung des Episoms als die nicht behandelten Klone, was sich im Verhältnis von endogener (CAM5') zu episomaler Bande widerspiegelt.

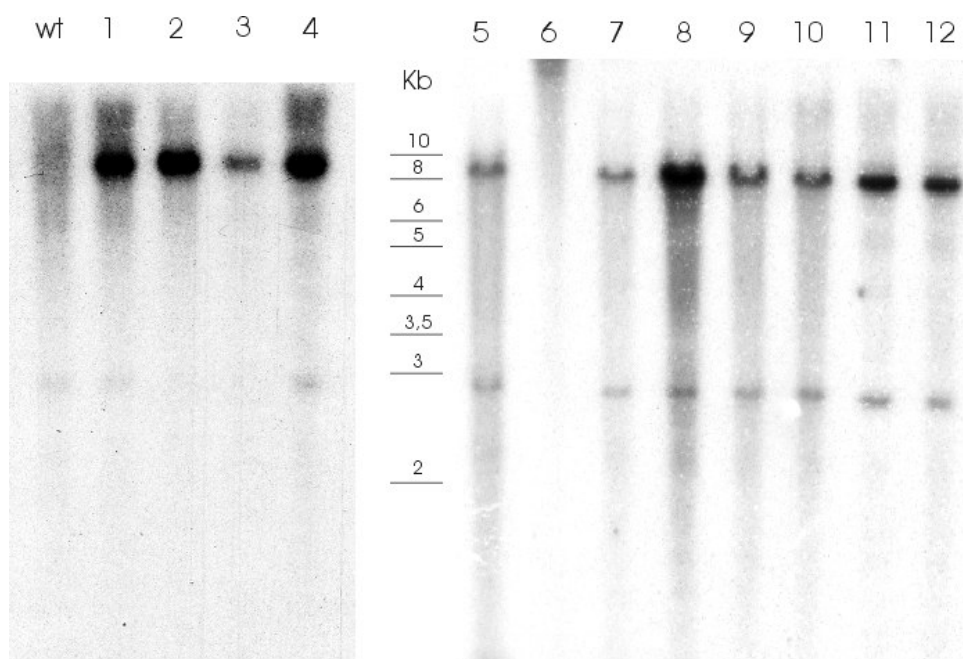


Abb. 37. Southern-Blot-Analyse der 3D7- Δ -O-hODC-Klone. Die Klone (1 - 4) wurden in Gegenwart von Pyrimethamin vereinzelt, die anderen ohne Pyrimethamin (5 - 12). Die Analyse wurde durch *EcoR* I-Verdau und Besondung mit dem CAM5' vorgenommen. Die obere Bande entspricht dem Episom (9,5 kb), die untere dem endogenen Promotor (2,8 kb). (wt) Wildtyp.

Die restlichen 12 hier nicht dargestellten Klone wurden auf dieselbe Weise untersucht. Sie zeigten alle das gleiche Bandenmuster wie die unter Abb. 37 aufgeführten Klone. Keiner der isolierten Klone hatte die eigene PfODC gegen die hODC ausgetauscht.

4 DISKUSSION

Malaria ist mit 300 Millionen Erkrankungen pro Jahr eine der bedeutendsten Tropenkrankheiten. Davon sind 50% der Fälle durch den Erreger *P. falciparum* (Malaria tropica) verursacht und können unbehandelt zum Tod des Patienten führen. Gegen fast alle erhältlichen Malariamedikamente besitzt der Parasit bereits Resistenzmechanismen. Die Wissenschaft ist somit gefordert, neue therapeutische Angriffspunkte zu finden.

Polyamine sind in der Natur weitverbreitete, für Proliferation und Differenzierung essentielle Substanzen. Sie spielen vor allem eine Rolle bei der DNA-Synthese, wodurch sie unabdingbar für die Vermehrung einer Zelle sind. Einer der Hauptangriffspunkte in der Krebstherapie ist die erhöhte Wachstumsrate der Tumorzellen im Vergleich zu derjenigen normaler Zellen. So ist die Hemmung des Polyaminstoffwechsels ein vielversprechender Therapieansatz, um gegen Krebs vorzugehen (Seiler, 2003). Als einzelliger Organismus weist *Plasmodium* wie auch andere pathogene Protozoen eine mit Tumorzellen vergleichbare hohe Proliferationsrate auf. Erfolgreich angewendet wird eine Therapie basierend auf der Blockade der Polyaminsynthese bereits bei der westafrikanischen Schlafkrankheit (Burri und Brun, 2003).

Wie bereits aus vorangehenden Arbeiten bekannt, besitzt *P. falciparum* im Vergleich zum Menschen einen vereinfachten Polyaminsyntheseweg. Er besteht aus den drei Enzymen AdoMetDC, ODC und SpdSyn. Ein deutlicher Unterschied zu allen bereits bekannten Polyaminsynthesewegen ist, dass *P. falciparum* die beiden Schlüsselenzyme auf einem bifunktionellen Protein, PfAdoMetDC/ODC, trägt und deren Expression dadurch gemeinsam reguliert ist (Müller et al., 2000). Des Weiteren fehlen diesem Organismus Regulationsenzyme wie das Antizym, das zum schnellen Abbau der ODC führt, wodurch die Halbwertszeit des plasmodialen Enzyms deutlich länger als die des humanen Orthologs ist (Wrenger et al., 2001). Darüber hinaus besitzt der Parasit weder eine SpmSyn noch die Möglichkeit, die Polyaminmengen zusätzlich über den Interkonversionsweg zu regulieren (Müller et al., 2001; Haider et al., 2005). Die Polyaminsynthese in *P. falciparum* könnte also ein geeigneter Angriffspunkt für die Chemotherapie sein. Voraussetzung wäre allerdings, dass sie für das Überleben des Parasiten essentiell ist.

4.1 Essentielle Bedeutung der Polyamine in *P. falciparum*

Um die essentielle Bedeutung der Polyamine zu untersuchen, wurde zum einen die Wirkung spezifischer ODC-Inhibitoren auf das Wachstum der Plasmodienkultur getestet, zum anderen sollte anhand genetischer Manipulation die Bedeutung der PfAdoMetDC/ODC für den Parasiten ermittelt werden.

4.1.1 Inhibierung der Polyaminsynthese im Parasiten

Neuere ODC-Inhibitoren wie APA und seine Derivate CGP 52622A und CGP 54169A weisen IC₅₀-Werte im nM-Bereich auf, wodurch sie um ein 1'000-faches effektiver auf die Plasmodienkultur wirken als DFMO (Das Gupta et al., 2005). Durch mikroskopische Auswertung der Entwicklung einer Plasmodienkultur, die mit APA, mit CGP 52622A oder mit CGP 54169A behandelt worden war, konnte bei allen drei Behandlungen jeweils eine Hemmung des Wachstums der Parasiten beobachtet werden. Die Zellen waren im Trophozitenstadium blockiert. Nach 24 h wurde den Kulturen Putrescin zugefügt, wodurch die Wachstumsblockade wieder aufgehoben werden konnte. Demnach handelt es sich um einen cytotostatischen Effekt. Dass sich dieser durch die Zugabe von Putrescin aufheben lässt, unterstreicht die hohe Spezifität der ODC-Inhibitoren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PfODC für das Überleben des Parasiten essentiell ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen, die Assaraf et al. (1987) mit DFMO erzielten, gut überein. Der durch APA ausgelöste Effekt war deutlich stärker als der seiner Derivate und dadurch bei verlängerter Einwirkungsdauer nicht mehr reversibel. Der Versuch zeigt auch, dass der Parasit fähig ist, externes Putrescin aufzunehmen. Bisher ist in *P. falciparum* jedoch kein Polyamin-Transportsystem identifiziert worden. Nur bei *Plasmodium knowlesi*, dem Erreger der Affen-Malaria, wurde ein spezifischer Transporter beschrieben, der die Aufnahme von Putrescin in den infizierten Erythrozyten ermöglicht (Singh et al., 1997). Kürzlich wurde ein Polyamintransporter in *L. major* identifiziert, der sowohl Putrescin als auch Spermidin in die Wirtszelle einschleust (Hasne und Ullman, 2005). Solange *L. major* genügend Polyamine zur Verfügung stehen, wie das in der Wirtszelle und im Wirtsorganismus der Fall ist, ist dieser Parasit unempfindlich gegenüber DFMO. Nur bei in Kultur gehaltenen Promastigoten von *L. donovani* konnte eine Wachstumsblockade beobachtet werden (Kaur et al., 1986). Untersuchungen an ODC- sowie AdoMetDC-Knockout-Zellen zeigten, dass *L. donovani* auf die Polyaminsynthese angewiesen ist, die aber durch externe Polyaminzufuhr ersetzt werden kann (Jiang et al.,

1999; Roberts et al., 2002). Die ODC-Knockout-Mutante von *T. brucei* zeigte eindeutig, dass dieses Enzym überlebenswichtig für den Parasiten ist (Li et al., 1998). Darüber hinaus ist diese Mutante nicht mehr in der Lage eine Infektion im Mausmodell zu etablieren (Mutomba et al. 1999).

Dass die PfODC für den Parasiten essentiell ist, kann am besten durch Zerstören des Gens untersucht werden. Die phänotypische Charakterisierung der PfODC-Knockout-Mutante bietet zum einen die Möglichkeit, Aussagen über den Aufnahmemechanismus von Polyaminen aus der Wirtszelle zu treffen, zum anderen könnten die minimalen Polyaminmengen ermittelt werden, die der Parasit zum Überleben braucht.

4.1.2 Biologische Funktion der PfAdoMetDC/ODC im Parasiten

Mittels gezielter genetischer Manipulation ist es möglich, die biologische Funktion bestimmter Gene *in vivo* zu untersuchen. Bis anhin sind jedoch in *P. falciparum* keine Nullmutanten von Enzymen beschrieben worden, die eine wichtige Rolle in Stoffwechselwegen spielen. Allgemein erweist sich die genetische Veränderung von *P. falciparum* als schwieriges Unterfangen. Es treffen gleich mehrere methodische Probleme aufeinander. So müssen bei der Transfektion dieses Organismus zum einen vier Membransysteme (Wirtsmembran, Membran der parasitophoren Vakuole, Parasiten- und Kernmembran) überwunden werden, um die Fremd-DNA schließlich in den Zellkern zu bringen. Zum anderen gibt es nur drei Selektionsmarker, die gewährleisten, dass die Fremd-DNA stabil im Parasiten bleibt. Die TgDHFR-TS von *T. gondii* sowie die hDHFR vom Menschen sind deutlich unempfindlicher gegenüber Pyrimethamin als das plasmodiale Enzym, die hDHFR vermittelt zudem Resistenz gegen das Dihydrotriazin (WR99210) (Cowman et al., 1988; Peterson et al., 1988; Donald und Roos, 1993; Fidock und Wellems, 1997). Der dritte Marker ist die Blastocidin-S-Deaminase (BSD) von *Aspergillus terreus* (Mamoun et al., 1999). Jedoch ist die Selektion mit BSD noch nicht hinreichend etabliert.

Zur Zeit werden zwei unterschiedliche Methoden für die Transfektion von *P. falciparum* erfolgreich angewandt. Bei der ersten wird die zirkuläre Fremd-DNA durch Elektroporation direkt in den jungen Trophozoiten (Ringstadium) gebracht (Wu et al., 1995; Crabb und Cowman, 1996; Fidock und Wellems, 1997). In der zweiten wird die Fremd-DNA erst in nichtinfizierte Erythrozyten transfiziert und diese anschließend zu Parasiten im

Schizontenstadium gegeben (Deitsch et al., 2001). Bezüglich der Effizienz unterscheiden sich die Strategien kaum, jedoch ist anzufügen, dass die indirekte Variante nach Deitsch et al. (2001) weitaus schonender für den Parasiten ist.

Die erste erfolgreiche genetische Veränderung eines essentiellen Enzyms von *P. falciparum* konnte durch eine Co-Transfektion eines Deletions- und eines Überexpressionskonstrukts erzielt werden, wobei die hDHFR und TgDHFR-TS als Selektionsmarker verwendet wurden (Krnajski et al., 2002). Das Gen der Thioredoxin-Reduktase (TrxR) im Genom des Parasiten konnte nur deswegen deletiert werden, da gleichzeitig eine Kopie des Gens auf einem anderen Transfektionskonstrukt überexprimiert wurde. Dies war somit auch nur ein indirekter Beweis, dass TrxR ein essentielles Enzym für *P. falciparum* ist (Krnajski et al., 2002). Sobald ein essentielles Gen deletiert wird, ist der Parasit nicht mehr überlebensfähig. Kennt man das Produkt der fehlenden Reaktion, kann der letale Phänotyp umgangen werden, vorausgesetzt der Organismus ist in der Lage, das Produkt aufzunehmen.

In *T. brucei* wurde ein Tetracyclin-abhängiges induzierbares Transfektionssystem generiert, mit dem Gene gezielt ausgeschaltet werden können (Wirtz und Clayton, 1995). Nach darauf folgenden Publikationen zu urteilen, scheint dieses System nicht optimal zu sein. Später wurde anstelle der direkten Veränderung des Genortes die durch Tetracyclin induzierte Synthese von RNAi (RNA „interference“) benutzt, um einen gezielten Knockdown des Genproduktes zu erzeugen (Shi et al., 2000; Wang et al., 2000; Nishikura, 2001). Es handelt sich hierbei um ein spezifisches posttranskriptionelles „gene silencing“ bei dem „small interfering“ RNAs durch einen sogenannten RISC-Komplex so prozessiert werden, dass gezielt die endogene mRNA degradiert wird. Einige Arbeitsgruppen erzielten Erfolge durch die Anwendung von RNAi bei *P. falciparum* (Kumar et al., 2002; Malhotra et al., 2002; McRobert und McConkey; 2002). Jedoch sind diese Ergebnisse sehr umstritten, da dem Parasiten die nötigen Enzyme hierfür fehlen (Aravind et al., 2003). Kürzlich wurde ein induzierbares Transfektionssystem in *P. falciparum* etabliert (Meissner et al., 2005). Es erlaubt das An- und Ausschalten von Reportergenen mittels Tetracyclin-regulierbaren Transaktivatoren aus *T. gondii*. Für die Herstellung von spezifischen Nullmutanten in *P. falciparum* ist dieses System jedoch noch nicht geeignet.

Die Rekombinationshäufigkeit ist in GT-reichen Sequenzen von sowohl Pro- als auch Eukaryoten stark erhöht (Zein und Levene, 2005). Das plasmodiale Genom besteht

hingegen zu über 80% aus den Basen Adenin und Thymin (Gardner et al., 2002). Vergleichbare Verhältnisse sind nur noch bei *Dictyostelium discoideum* und *Borrelia burgdorferi* anzutreffen (Fraser et al., 1997; Glockner et al., 2005; Szfranski et al., 2005). Der AT-Gehalt in intergenischen Regionen liegt oft sogar über 90% (Gardner et al., 2002; Araid et al., 2003). Dadurch ist die plasmidiale DNA in *E. coli* sehr instabil und erschwert die Herstellung der Transfektionskonstrukte. Da das Blutstadium von *P. falciparum* haploid ist, kann davon ausgegangen werden, dass ein DNA-Austausch durch homologe Rekombination äußerst selten stattfindet. Bei den diploiden Kinetoplastiden *Trypanosoma* und *Leishmania* ist die genetische Manipulation deutlich effizienter. Dennoch scheint die homologe Rekombination die einzige Methode zu sein, durch die *P. falciparum* sein Genom verändert. Essentielle Gene können nicht wie bei Bakterien, Hefen oder *Caenorhabditis elegans* anhand konditionaler Mutanten untersucht werden (Carvalho und Menard, 2005). So beruht auf dem Ereignis der homologen Rekombination in *P. falciparum* die Antigenvariation (Kadekoppala et al., 2001; Bhattacharyya et al., 2004). Allerdings sollte dazu angefügt werden, dass die für die Antigenvariation verantwortlichen Gene, wie die Genfamilien *var*, *rifin* und *stevor*, fast ausschließlich in subtelomerischen Regionen lokalisiert sind (Rubio et al., 1996; Fischer et al., 1997; Kyes et al., 1999) und durch eine hohe Rekombinationsrate gekennzeichnet sind (Cornforth und Eberle, 2001; Bailey et al., 2004). O'Donnell et al. (2002) entdeckten eine *P. falciparum*-spezifische sogenannte Rep20-Sequenz in der nichtkodierenden subtelomerischen Region, die für die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um eine einzigartige repetitive Sequenz von 21 bp. Die Untersuchungen von O'Donnell et al. (2002) ergaben, dass bakterielle Plasmide, die die Rep20-Sequenz tragen, mit den plasmodialen Chromosomen colokalisierten und gleichmäßig auf die Merozoiten verteilt wurden. Diese Ergebnisse könnten in Zukunft die Transfektion von *P. falciparum* erleichtern. Für endogene Manipulationen ist Rep20 jedoch kaum geeignet.

Die Generierung einer Knockout-Mutante des *PfAdoMetDC/ODC*-Gens in *P. falciparum* sollte über ein Doppelcrossover erfolgen. Um dies zu erzielen, wurden genflankierende Sequenzen oberhalb und unterhalb der hDHFR-Kassette in den pHTK-Vektor (Duraisingh et al., 2002) kloniert. Die endogene Sequenz wird dabei infolge homologer Rekombination durch die hDHFR-Resistenzkassette ausgetauscht. Der Parasit ist somit auf die Aufnahme von Spermidin und Putrescin angewiesen. Die vorangehenden Experimente mit Hemmung der *PfODC* durch APA zeigten, dass der cytostatische Effekt

durch Zugabe von Putrescin wieder aufgehoben werden konnte. Es ist demnach zu erwarten, dass auch die Knockout-Zellen in der Lage sind, die blockierte Putrescinsynthese durch externe Aufnahme zu kompensieren. Die erzielten Transfektanden trugen das eingebrachte Episom (pHTK-SO), jedoch ließen sich keine Parasiten isolieren, die dieses in ihr Genom integriert hatten. Wright et al. (1991) zeigten, dass die irreversible Hemmung der *PfAdoMetDC* mittels spezifischer Inhibitoren durch Zugabe von Spermidin aufgehoben werden kann. Experimente mit vergleichbarem Ansatz konnten die von Wright erzielten Ergebnisse jedoch nicht bestätigen (Das Gupta et al., 2005). Somit ist anzunehmen, dass die *PfAdoMetDC/ODC*-Knockout-Zellen nicht komplementiert wurden und dadurch nicht überleben konnten. Deshalb wurde ein weiteres Konstrukt (pHTK-O) erstellt, das nur zur Deletion der *PfODC*-Domäne führen sollte. Auch hier konnte das Episom erfolgreich in *P. falciparum* eingebracht, jedoch kein Austausch der endogenen *PfODC* durch die Resistenzkassette identifiziert werden. Trotz der Tatsache, dass die getrennt voneinander rekombinant hergestellten Domänen des bifunktionellen Proteins unabhängig voneinander aktiv sind (Krause et al., 2000; Wrenger et al., 2001), ist nicht auszuschließen, dass nach der Entfernung der *PfODC*-Domäne die übrigbleibende *PfAdoMetDC*-Domäne nicht genügend *dcAdoMet* herstellt.

Bereits der geringste Selektionsnachteil kann dazu führen, dass sich die Integrierten gegenüber den Episom-tragenden Zellen nicht behaupten können. Weitere Nachteile könnten dadurch entstehen, dass die Zellen, in denen die Resistenzkassette endogen vorliegt, keine Möglichkeit haben, auf einen erhöhten Medikamentendruck mittels Vermehrung der Episome zu reagieren. Erschwerend kommt hinzu, dass die *ODC*-Knockout-Mutante auf die externe Aufnahme von Putrescin angewiesen ist. All diese Gründe beeinträchtigen die Fitness der Mutante. In der Evolution wird Fitness an der Vermehrungsrate eines Genotyps im Vergleich zu anderen Genotypen gemessen. Studien zufolge besitzen chloroquinresistente Plasmodien eine geringere Fitness, da ihr Vorkommen in der Parasitenpopulation bei Aufhebung des Medikamentendrucks abnimmt (Walliker et al., 2005). Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass die Knockout-Mutante aus der Plasmodienkultur verdrängt wurde.

Um Selektionsnachteile zu minimieren, wurde ein Konstrukt (pHTK-Om) generiert, durch dessen Integration ins Genom das *PfAdoMetDC/ODC*-Gen wiederhergestellt würde, jedoch zu einer mutierten *PfODC* führen sollte. Die hierfür gewählte Doppelmutation befindet sich in der Substratbindungsstelle der *PfODC*, welche dadurch vollständig

inaktiviert wird (Wrenger et al, 2001; Lüersen, unveröffentlicht). Bei der Untersuchung des Genotyps der isolierten Transfektanden konnte die Integration des Konstruktes ins Genom festgestellt werden. In diesen genetisch veränderten Zellen war durch die Einschleusung der hDHFR-Kassette über ein Doppelcrossover das *PfAdoMetDC/ODC*-Gen wieder rekonstituiert worden. Aus der Kultur (3D7-hDHFR-Om) wurden 10 Klone vereinzelt. Ob bei der Wiederherstellung des Gens auch die Doppelmutation eingefügt worden war, wurde anhand einer durch die Doppelmutation entstandenen *Fnu4H* I-Schnittstelle untersucht. Keiner der isolierten Klone trug die Doppelmutation im Genom; episomal lag diese jedoch noch vor. Die Ausgangspopulation 3D7-hDHFR-Om wurde anschließend ebenfalls auf das Vorhandensein der Doppelmutation untersucht. Es stellte sich heraus, dass auch diese endogen keine mutierte *PfODC* besaß.

Um ein Crossover zu erzielen, wurde eine 1'000 bp große Sequenz im 3'-Bereich des Gens verwendet. Die Mutation liegt in dieser Flanke etwa 200 bp vor dem Ende des Homologiebereichs. Nunes et al. (1999) beschrieben eine Mindestanzahl von 450 bp, die benötigt werden für die Integration einer Mutation über eine „end-in“-Rekombination in *P. berghei*. Liegt die Mutation außerhalb, so wird sie durch den anschließenden Reparaturmechanismus entfernt. Im Vergleich zu anderen Plasmodienarten ist die Transfektion bei *P. berghei* weit effizienter und besser etabliert (Mota et al., 2001). Der Grund könnte darin liegen, dass anstelle einer zirkulären Fremd-DNA bei *P. berghei* das Plasmid vor der Elektroporation linearisiert wird, wodurch die Fremd-DNA bereits einen Doppelstrangbruch, der für die Rekombination nötig ist (Knippers, 2001), aufweist. Dennoch ist die Einfügung von Mutationen ins *P. falciparum*-Genom mittels homologer Rekombination bereits eine gebräuchliche Methode (Fidock et al., 2000; Tsai et al., 2001). Die Anzahl und Positionierung der Crossover-Ereignisse ist auf allen 14 Chromosomen nach Poisson verteilt, wodurch keine Rekombinations-„hot spots“ zu erwarten sind. Im Vergleich zu den meisten eukaryotischen Systemen weist das Genom von *P. falciparum* sogar eine ungewöhnlich uniforme meiotische Crossover-Aktivität auf (Su et al., 1999). Bei einem Crossover bildet sich ein Heteroduplex aus, der nach erfolgter Rekombination wieder aufgelöst wird. Die dabei wirkenden Reparaturenzyme stellen zu 50% den Wildtyp wieder her (Knippers, 2001). Angenommen, das Crossover wäre in den 800 bp vor der Mutation erfolgt, so wäre trotz des Reparaturmechanismus zu erwarten, dass einige der Parasiten die Mutation endogen tragen würden. Da jedoch in der 3D7-hDHFR-Om-Population keine Mutation vorlag, deutet dies daraufhin, dass entweder, wie in Abb. 38 gezeigt, das Crossover hinter der Mutation erfolgte und dadurch

die Mutation nicht eingefügt wurde, oder aber diejenigen Zellen, welche die Mutation trugen, einen Selektionsnachteil besaßen.

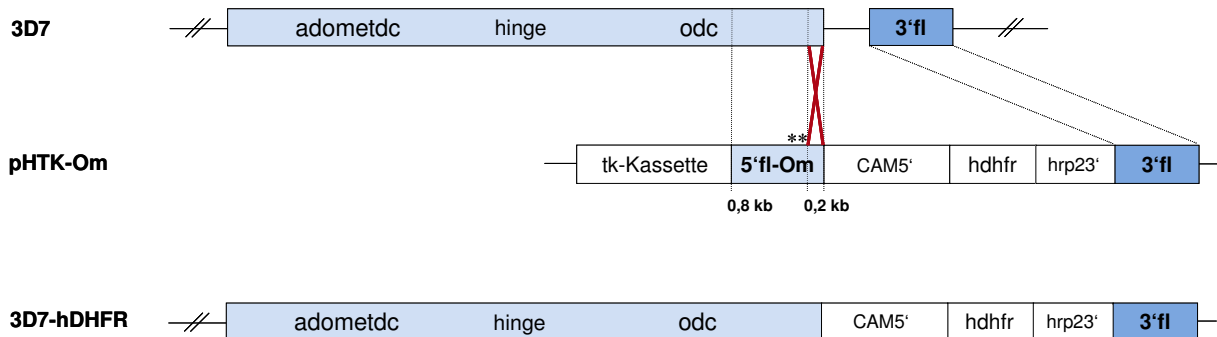


Abb. 38. Die Position des Crossovers (Kreuz) im 5' Bereich liegt in den 0,2 kb hinter der Doppelmutation (**). Dies führt dazu, dass die Mutation beim Genaustausch nicht in die *PfODC* eingefügt wurde. Die Regionen in denen das Crossover erfolgt sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. (Weitere Bezeichnungen siehe Abb. 28).

Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Doppelmutation im pHTK-Om-Konstrukt durch eine stille Mutation, welche keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz der *PfODC* hat, ersetzt. Nach Transfektion der Plasmodien mit dem Kontrollkonstrukt (pHTK-Om-still) konnte dieses als Episom nachgewiesen werden. Ein Genaustausch konnte mit dem pHTK-Om-still-Konstrukt bis anhin nicht erzielt werden.

Die Ergebnisse mit dem pHTK-Om-Konstrukt zeigen eindeutig, dass der Genort der *PfODC* angesprochen wird, wodurch die Grundvoraussetzung der genetischen Manipulation gegeben ist. Somit ist anzunehmen, dass kein methodisches Problem vorliegt. Deshalb bleibt als mögliche Erklärung, dass die durch die genomische Modifikation im Polyaminstoffwechsel beeinträchtigten Zellen nicht genügend Putrescin aufnehmen können, um sich in der Plasmodienkultur zu behaupten. So kann davon ausgegangen werden, dass die auf die Aufnahme von Putrescin angewiesenen Zellen eine geringere Fitness besitzen und aus der Kultur selektioniert werden.

Es wurde schließlich ein weiteres Transfektionskonstrukt hergestellt, das auf pHTK-O basiert, zusätzlich aber eine Kopie der *hODC* trägt. Durch den Austausch der *PfODC* gegen das humane Ortholog mittels Single Crossover wäre die endogene Synthese von

Putrescin im Parasiten gewährleistet, wodurch dieser nicht auf die Aufnahme von Putrescin angewiesen wäre. Anhand dieser kombiniert erfolgenden Knockout- und Knockin-Strategie könnte gezeigt werden, dass es nur dann möglich ist die endogene ODC zu deletieren, wenn sie gleichzeitig ersetzt würde. Der Unterschied zu der Co-Transfektions-Strategie, die Krnajski et al. (2002) publizierten, liegt darin, dass hier keine Rekombination zwischen den beiden Orthologen erfolgen kann, da sie keinerlei Sequenzidentitäten besitzen. Nach Transfektion des pHTK-O-hODCV5 konnte tatsächlich sowohl die Integration des Konstruktes ins plasmodiale Genom als auch die Expression der hODC im Parasiten detektiert werden. Allerdings war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, einen Klon aus der 3D7- Δ O-hODC-Population zu isolieren und phänotypisch zu charakterisieren. Zusammengefasst deuten alle Ergebnisse daraufhin, dass die PfODC für das Überleben des Parasiten im Blutstadium essentiell ist.

4.1.3 Existiert ein alternativer Polyaminsyntheseweg in *P. falciparum*?

Seit wenigen Jahren ist das Genom von *P. falciparum* vollständig bekannt (Gardner et al., 2002). Auf der Suche nach den Genen für einen alternativen Polyaminsyntheseweg über Agmatin in *P. falciparum* wurde in PlasmoDB ein ORF gefunden, der 7'248 bp umfasst und Homologie zur Familie der Aminosäure-Decarboxylasen aufweist. Es handelt sich hierbei um Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Enzyme, die sich erst aufgrund ihrer Substratspezifität eindeutig voneinander unterscheiden. Manche ODC, wie die von *Nicotiana glutinosa* (Lee und Cho 2001) und *Selenomonas ruminantium* (Takatsuka et al., 2000), akzeptieren auch Lysin als Substrat. Weitere Algorithmen identifizierten die plasmodiale Sequenz als LDC. Eine homologe Sequenz wurde in *P. berghei* entdeckt. Sie wird im Sporozitenstadium exprimiert und als potentielle weitere ODC bezeichnet (Matuschewski et al., 2002). Einzigartig an dem plasmodialen ORF ist, dass er mehr als doppelt so groß wie der für Aminosäure-Decarboxylasen beschriebene ist. Außerhalb des Homologiebereichs weist die plasmodiale Sequenz keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen auf. Mittels verschiedener bakterieller Expressionssysteme wurde versucht, sowohl die gesamte Sequenz als auch Teile dieser rekombinant herzustellen, jedoch erfolglos. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Enzym Arginin decarboxyliert oder gar eine weitere ODC ist, konnte somit nicht untersucht werden. Wäre dieses Enzym eine ADC, so würde man erwarten, dass der Parasit für die alternative Polyaminsynthese auch eine Agmatinase besitzt, welche anschließend Agmatin zu Putrescin hydrolysiert. Tatsächlich

konnte eine weitere Sequenz von 1'236 bp im Genom von *P. falciparum* identifiziert werden, die Homologie zu der Familie der Arginasen, was Agmatinasen einschließt, zeigt. Anhand der biochemischen Charakterisierung wurde das plasmodiale Protein eindeutig als Arginase identifiziert und charakterisiert (siehe 4.2). Da außer der Arginase keine weitere Agmatinase-ähnliche Sequenz im *P. falciparum*-Genom vorliegt, besteht für den Parasiten nur noch die Alternative mittels Agmatin-Deiminase und N-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase Agmatin zu Putrescin umzuwandeln. Diesen Enzymen entsprechende ORFs konnten im plasmodialen Genom jedoch nicht gefunden werden.

Die Ergebnisse, welche durch Inhibierung mittels spezifischer ODC-Inhibitoren und der genetischen Manipulation der *PfODC* erzielt worden waren, unterstützen die Hypothese, dass *P. falciparum* keine Möglichkeit besitzt, Polyamine über Agmatin herzustellen. Zudem zeigt die Anwendung des ADC-Inhibitors α -Difluormethylarginin (DFMA) sogar bei 10 mM keine Beeinträchtigung des Parasitenwachstums (Walter, unveröffentlicht). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass *P. falciparum* auf keinen alternativer Syntheseweg ausweichen kann.

4.2 Charakterisierung der plasmodialen Arginase

Die *PfARG* besteht aus 411 aa, was in etwa einer molekularen Masse von 46 kDa entspricht. Hierdurch weicht sie um etwa 10 kDa von der für Arginasen typischen Größe von 36 kDa ab. Der Größenunterschied beruht darauf, dass *PfARG* zwei plasmodienspezifische Insertionen trägt, deren Funktion nach wie vor unbekannt ist. Die kürzere Insertion umfasst 11 aa, die längere ist 73 aa groß und besteht zu 41% aus Asparagin. Daraus ergeben sich Sequenzidentitäten von ungefähr 25% zu Arginasen von Säugetieren, Hefen und Bakterien. Auch die beiden Isoenzyme des Menschen, Arginase I und Arginase II, weisen nur 58% Sequenzidentität auf (Morris et al., 1997), unter anderem weil Arginasen II im Gegensatz zu Arginasen I eine mitochondriale „targeting“ Sequenz besitzen.

Christianson und Cox (1999) beschrieben für Arginasen typische Motive. Diese Motive lassen sich auch in der *PfARG* wiederfinden. *PfARG* wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Sie eluiert als 150 kDa-Protein, was auf eine trimere Struktur rückschließen lässt. Auch Säugerarginasen sind Homotrimere, während bakterielle Arginasen Homohexamere bilden.

Die meisten in der Literatur beschriebenen Arginasen sind Mn^{2+} -abhängig. Bei einigen kann Mn^{2+} durch Co^{2+} , Zn^{2+} oder Fe^{2+} ersetzt werden (Hellerman und Perkins, 1935; Anderson, 1945; Mora et al., 1965). Es stellte sich heraus, dass die Aktivität der *PfARG* von Mn^{2+} -Ionen abhängt. Außer Mn^{2+} akzeptiert *PfARG* nur noch und in vierfach geringerem Maße Ni^{2+} . Eluiert man das Protein in Gegenwart von 2 mM EDTA, werden die Mn^{2+} -Ionen gebunden und das Protein eluiert als Monomer von etwa 48 kDa. Der Unterschied von etwa 2 kDa zur errechneten Größe ist durch den Aufreinigungstag bedingt. Der anschließende Enzymtest zeigt, dass *PfARG* als Monomer nicht aktiv ist und nur durch Zugabe von Mn^{2+} sowohl Struktur als auch Aktivität wiedererlangt. Bezüglich der quartären Struktur ist *PfARG* den Säugerarginasen anzugliedern. Interessanterweise unterscheidet sich *PfARG* hinsichtlich der Inhibierung durch EDTA deutlich von diesen. Arginase I des Menschen verliert durch die Behandlung mit EDTA zwar ihre oligomere Struktur, jedoch wird sie in ihrer Aktivität nur zu 50% inhibiert (Sabio et al., 2001). Dahingegen behält die Rattenleberarginase (RLA) sogar bei 10 mM EDTA sowohl Struktur als auch Aktivität (Cavalli et al., 1994). Anhand der Kristallstruktur der RLA (Kanyo et al., 1996) konnte gezeigt werden, dass sich im aktiven Zentrum jeder Untereinheit des Enzyms zwei Mn^{2+} (Mn_A und Mn_B) befinden. Der 50%-ige Aktivitätsverlust des humanen

Enzyms ist möglicherweise damit zu erklären, dass nur eines der beiden Mn^{2+} -Ionen von EDTA gebunden wird.

Die RLA ist ein 105 kDa großes Homotrimer. Jede der 35 kDa Untereinheiten besteht aus 8 parallel angeordneten β -Faltblättern, die zu beiden Seiten von mehreren α -Helices umgeben sind (Kanyo et al., 1996). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Abraham I. Louw (Department of Biochemistry, University of Pretoria, South Africa) wurde ein Strukturmodell der PfARG generiert. Mittels PROCHECK, einem Bioinformatik-Programm, wurde die Qualität des Modells evaluiert. Der Ramachandran-Plot zeigt deutlich, dass 90% der Aminosäuren eindeutig einem Strukturelement zugewiesen werden. Das Strukturmodell der PfARG bestätigt somit die mittels Gelchromatographie vorhergesagte trimere Struktur. Auch stimmen die Sekundärstrukturelemente der PfARG mit denjenigen der RLA überein. Die Vorhersage der Quartärstruktur beruht auf der Annahme, dass ähnliche Primärstrukturen auch ähnliche Quartärstrukturen ausbilden. Rost (1999) beschrieb, dass die zu modellierende Sequenz mindestens eine 40%-ige Identität mit der Vorlagestruktur aufweisen sollte, um ein vertrauenswürdiges Ergebnis zu erzielen. Um dem zu entsprechen, wurde die größere Insertion bis auf 15 aa verkürzt. Die kleinere Insertion wurde gänzlich in die Modellierung einbezogen. Das Modell deutet darauf hin, dass sich die verbleibende große Insertion an der Außenseite des Proteins befindet. Die kleinere Insertion von 11 aa kommt an den Berührungsflächen der Monomere zu liegen. Die Lage könnte auf eine Funktion in der Stabilisierung der trimeren Struktur hindeuten. Diese Aussage sollte jedoch mit Vorsicht genossen werden, da plasmodienspezifische Insertionen weder zueinander noch zu anderen Sequenzen Homologien zeigen und demnach nicht modelliert werden können. Die tatsächliche Struktur der Insertionen kann nur anhand des Proteinkristalls der PfARG ermittelt werden. Es bleibt also offen, welche Rolle sie nun wirklich in der Struktur der PfARG einnehmen, zumal die Insertionen der PfARG etwa 20% des Enzyms einnehmen. Es wäre ein interessanter Ansatz, verschiedene plasmodienspezifische Insertionen mittels Kristallisierung zu untersuchen. Möglicherweise könnten dadurch Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen werden.

Anhand der Analyse verschiedener Arginasekristalle konnten die konservierten Mangan-koordinierenden Aminosäuren ermittelt werden (Kanyo et al., 1996; Bewley et al., 1999; Cama et al., 2003a) (Abb. 39).

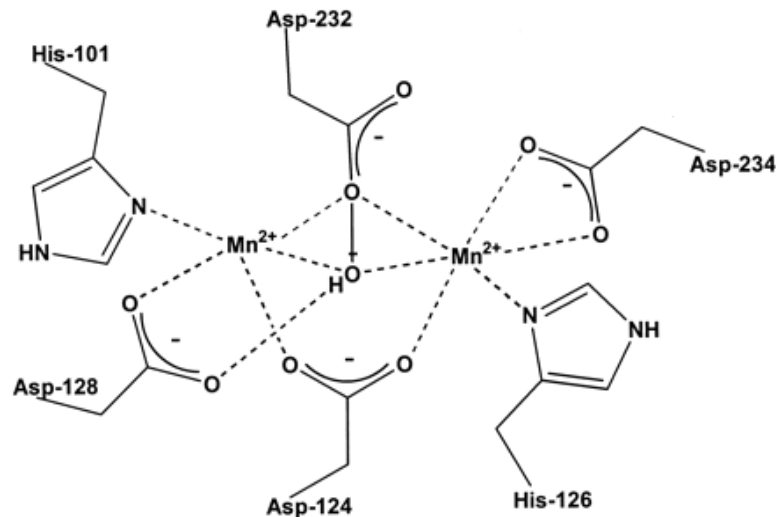


Abb. 39. Koordination der beiden Mn^{2+} -Ionen im aktiven Zentrum der RLA durch Wasserstoffbrücken (Kanyo et al., 1996).

Bereits das Alignment der Arginasen zeigte, dass die Mn^{2+} -bindenden Aminosäuren auch im plasmodialen Enzym konserviert sind. Ihre ebenfalls konservierte Position in der Struktur wurde durch das Modell bestätigt. In Tab. 2 werden die Mn^{2+} -bindenden Aminosäuren mit den gemessenen Aminosäuren der verschiedenen Kristallstrukturen verglichen. Im aktiven Zentrum anderer metallabhängiger Hydrolasen wie den Phosphotriesterasen (Benning et al., 2001), den Dihydroorotasen (Thoden et al., 2001) oder den Prolin-Aminopeptidasen (Wilce et al., 1998) ist ebenfalls ein dem Asp128 der Arginase I analoges Asp konserviert. Es koordiniert auch hier ein Metallion über eine Wasserstoffbrücke.

Tab. 2. Vergleich der Mn^{2+} -bindenden Aminosäuren der PfARG mit bereits kristallisierten Arginasen

	<i>PfARG</i>	1RLA (Typ I)	1PQ3 (Typ II)	1CEV
Mn _A	His193	His101	His120	His99
Mn _B	His218	His126	His145	His124
Mn _A , Mn _B	Asp216	Asp124	Asp143	Asp122
Mn _A	Asp220	Asp128	Asp147	Asp126
Mn _A , Mn _B	Asp323	Asp232	Asp251	Asp226
Mn _B	Asp325	Asp234	Asp253	Asp228

Bezeichnungen entsprechen den Kristallstrukturen RLA (1RLA; Kanyo et al., 1996), humane Arginase Typ II (1PQ3; Cama et al., 2003b) und Arginase von *B. caldovelox* (1CEV; Bewley et al., 1999).

Weitere Aminosäuren, die mit Konformation oder Aktivität der Arginasen in Verbindung stehen, wurden im plasmodialen Enzym untersucht. In der RLA dient zum Beispiel Arg308 der intra- und intermolekularen Stabilität des Enzyms (Lavulo et al., 2001). In der *PfARG* ist jedoch kein dem Arg308 entsprechendes Arg zu finden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die oligomere Konformation der *PfARG* anders stabilisiert wird. Sabio et al. (2001) zufolge ist das Glu256 an der Oligomerisierung der humanen Arginase I beteiligt. Es liegt nicht im aktiven Zentrum, sondern an den Berührungstellen der Monomere. Glu256 befindet sich im plasmodialen Enzym an Position Glu347. Eine weitere Aminosäure, die hier genauer betrachtet wurde, ist His141. Es spielt eine Rolle bei der Substratbindung im aktiven Zentrum der RLA (Cavalli et al., 1994), hat jedoch keine Funktion in der Koordinierung der Mn^{2+} -Ionen (Khangulov et al., 1998; Cama et al., 2003a).

Alle Mn^{2+} -bindenden Aminosäuren (siehe Tab. 2) sowie Glu347 und His233 (analog zu His141 in RLA) wurden in der rekombinanten *PfARG* durch ortsspezifische Mutagenese-PCR gegen die inerte Aminosäure Alanin ausgetauscht. Die Mutanten wurden anschließend auf Aktivität und Oligomerisierung untersucht. Die Mutation des Glu347 fungierte als Kontrolle, da diese Aminosäure unabhängig von der Metallbindung das Trimer zusammenhält. Die Glu347Ala-Mutante eluierte als Monomer und zeigte darüber hinaus nur noch 10% Restaktivität. Mutation des Glu256 der humanen Arginase I ergab im Gegensatz dazu aktive Monomere (Sabio et al., 2001). Alle anderen Mutanten waren inaktiv. Zudem ging außer bei His193Ala bei allen vorgenommenen Mutationen die trimere Struktur verloren. Bei der RLA führte die Mutation des entsprechenden His101 (siehe Tab. 2) jedoch zu aktiven Monomeren (Cavalli et al., 1994). Möglicherweise ist der Einfluss von His193 auf die Metallbindung geringer als jener der anderen Aminosäuren. Die Mutationsanalysen zeigten eindeutig, dass Mn^{2+} nicht nur für die katalytische Aktivität, sondern auch für die Oligomerisierung der *PfARG* unabdingbar ist. Die unter 3.1.4.4 dargestellten Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass erst durch die Ausbildung der Quartärstruktur die *PfARG* ihre Aktivität erlangt. Demnach ist die Aktivität der *PfARG* im Gegensatz zu den Säugerarginasen deutlich stärker durch die Quartärstruktur bedingt. Diese Unterschiede in der Stabilität sollen in einem späteren Schritt anhand eines dynamischen Strukturmodells bestätigt werden. Durch die Dynamik ergibt sich die Möglichkeit, „docking“-Experimente zu unternehmen. Auf diese Weise könnte eine Vielzahl möglicher Leitsubstanzen, die mit der *PfARG* interagieren, evaluiert werden, was schließlich den Aufwand von Inhibitortesten auf das rekombinante Enzym oder auf die Plasmodienkultur erheblich schmälert.

Die PfARG kann Agmatin nicht umwandeln und besitzt demnach keine Agmatinase-Funktion, wie es für andere Arginasen beschrieben wurde (Reczkowski und Ash, 1994). Dies liefert einen weiteren Beweis dafür, dass *P. falciparum* keine Möglichkeit hat, Putrescin aus Agmatin herzustellen. Das produzierte Ornithin ist dementsprechend der einzige Vorläufer für die Polyaminsynthese.

Der K_m -Wert für Arginin beträgt 6 mM und liegt dadurch in einem vergleichbaren Bereich wie der anderer Arginasen (Colleluori et al., 2001). Die spezifische Aktivität gleicht mit $31 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein derjenigen der Arginase von *Rattus norvegicus*, die von Aguirre und Kasche (1983) getestet bei $23,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein liegt. Die PfARG scheint im Vergleich zu beiden Isoformen des Säugers deutlich ineffizienter zu sein, was sich im Verhältnis k_{cat}/K_m widerspiegelt (siehe Tab. 3). Auch das Aktivitätsoptimum der PfARG liegt wie das der meisten Arginasen (Jenkinson et al., 1996) im basischen Milieu. In der Literatur sind Arginasen beschrieben, welche erst durch Hitze aktiviert werden (Hirsch-Kolb und Greenberg, 1968; Hirsch-Kolb et al., 1970) und solche, die eine hohe Hitzestabilität (Scolnick et al., 1997) besitzen. Bei der PfARG konnte jedoch weder eine derartige Aktivierung beobachtet werden, noch scheint das plasmodiale Enzym besonders hitzestabil zu sein. Des Weiteren wirkt Ornithin mit einem K_i -Wert von 1 - 10 mM auf Säugerarginasen inhibierend (Cox et al., 2001; Ash, 2004). Das Reaktionsprodukt hemmt auch die PfARG mit einem K_i -Wert von 19 mM. Allerdings ist eine „feedback“-Inhibierung eher unwahrscheinlich, da die Ornithinkonzentration im Parasiten bei $29 \mu\text{M}$ liegt (Wrenger et al., 2001). Die von Boucher et al. (1994) beschriebenen Arginaseinhibitoren wie Valin oder Borat hemmen zwar die rekombinante PfARG; jedoch liegen die IC_{50} -Werte beider Substanzen deutlich über den Werten, die für die Arginase I ermittelt wurden.

Bei der Reaktion der NO-Synthase (NOS) von Arginin zu NO und Citrullin entsteht das Zwischenprodukt NOHA (Boucher et al., 1994; Reczkowski und Ash, 1994). NOHA wirkt mit K_i -Werten von 10 - 42 μM als kompetitiver Inhibitor auf beide Arginasetypen (Cox et al., 2001). Sein Derivat nor-NOHA hemmt die Arginase I mit 0,5 μM noch besser als NOHA. Cox et al. (2001) erklären dies dadurch, dass nor-NOHA eine Methylgruppe weniger besitzt als NOHA und dadurch zusätzliche Wasserstoffbrücken mit dem Enzym eingehen kann.

Darüber hinaus scheint NOHA nicht besonders selektiv zu sein, da es neben Arginasen auch mit NO-Synthasen und anderen Häm-haltigen Proteinen wie Peroxydasen, Katalasen und Hämoglobin interagiert (Wu und Morris, 1998). Die Konzentration von

NOHA im Plasma eines gesunden erwachsenen Menschen liegt bei 9 μM (Meyer et al., 1997) und somit im Bereich der IC_{50} -Konzentrationen. Verschiedene Arginasehemmer sind in klinischen Studien getestet worden (Cox et al., 1999; Kim et al., 2004). Darunter befinden sich die zwei Borat-Analoga ABH und BEC. Sie inhibieren die humane Arginase II stärker als NOHA, jedoch deutlich schwächer als nor-NOHA (K_i -Wert von 51 nM). Die beiden Isoenzyme zeigen ein unterschiedliches Inhibitionsmuster (Baggio et al., 1999; Colleluori und Ash, 2001). Vereinfacht gesagt sind sowohl nor-NOHA und NOHA als auch ABH und BEC effizientere Inhibitoren der Arginase II (Ash, 2004).

Tab. 3. Kinetische Parameter von PfARG im Vergleich mit Typ I und II Säugerarginasen ¹.

	<i>PfARG</i>	Typ I	Typ II
k_{cat}	24 s^{-1}	146 s^{-1}	203 s^{-1}
K_m Arginin	6 mM	1 mM	5 mM
k_{cat}/K_m	4	146	41
K_i Ornithin	19 mM	1 mM	10 mM
K_i nor-NOHA	3 μM	0,5 μM	51 nM
K_i NOHA	5 μM	10 - 42 μM	2 μM
* IC_{50} nor-NOHA	20 μM	0,8 μM	
* IC_{50} NOHA	60 μM	15 μM	
* IC_{50} ABH	70 μM	20 μM	

¹ Referenzdaten der RLA (Typ I) und der humanen Arginase (Typ II) (Colleluori und Ash, 2001).

* Die IC_{50} -Werte für *PfARG* im Vergleich zur RLA wurden in Kooperation mit Jean-Luc Boucher (Universität Paris) ermittelt

Die kinetischen Daten der *PfARG* wurden im Vergleich zu Arginase I und Arginase II von Säugetieren in Tab. 3 zusammengefasst. Die *PfARG* ist durch NOHA und nor-NOHA ebenfalls inhibierbar. Anhand der K_i -Werte ist ersichtlich, dass bei der *PfARG* im Gegensatz zu den Säugerarginasen zwischen der Inhibierung mit NOHA und nor-NOHA kaum ein Unterschied besteht. In Kooperation mit Prof. Jean-Luc Boucher (Laboratoire de Chimie et Biochimie, Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris, France) wurde die inhibitorische Wirkung weiterer Substanzen auf *PfARG* im Vergleich zu RLA getestet. Es stellte sich heraus, dass die rekombinante *PfARG* im Gegensatz zur RLA kaum Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität gegenüber ABH und nor-NOHA zeigt. Der

Grund dafür ist noch unklar. Das plasmodiale Enzym lässt sich jedenfalls anhand der Inhibitorstudien keinem der beiden Arginasetypen zuordnen. Inhibierungen des Parasitenwachstums in Kultur ergaben, dass NOHA mit einem IC_{50} -Wert von 225 μ M das Parasitenwachstum stärker beeinträchtigt als nor-NOHA mit einem IC_{50} -Wert von 420 μ M. Im Vergleich hierzu hemmt NOHA das Wachstum der Darmkrebszelllinie CaCo-2 bereits bei 3 μ M um etwa 50% (Bugha et al., 1998). Inhibierung der Proliferation verschiedener Brustkrebszelllinien durch NOHA zeigten, dass der hemmende Effekt je nach Zelllinie jedoch sehr unterschiedlich ausfällt oder aber gar nicht eintritt (Singh et al., 2000). Die hohen Werte von NOHA und nor-NOHA können dadurch erklärt werden, dass *P. falciparum* auch im Arginin-freien Medium genügend Arginin durch den Abbau des Wirt-Hämoglobins zur Verfügung steht. Für ABH und BEC konnten keine Werte ermittelt werden, da bei maximaler Testkonzentration von 500 μ M kaum eine Inhibierung festzustellen war. Der Grund, weshalb ABH - trotz ähnlicher Wirkung auf die PfARG wie NOHA - die Plasmodienkultur nur sehr schwach inhibiert, liegt möglicherweise an Unterschieden in Aufnahme und Metabolisierung.

Die Regulation der Transkription ist bei Plasmodien noch wenig untersucht. Aravind et al. (2003) fassten anhand genomischer Daten mögliche Regulatoren zusammen. *Plasmodium falciparum* besitzt eine rudimentäre eukaryotische Transkriptionsmaschinerie, der die meisten spezifischen Transkriptionsfaktoren zwar fehlen, in der basale Faktoren und Chromatinstruktur-Regulatoren jedoch konserviert sind. Anhand von „microarrays“ konnte zudem eine einzigartige Genregulation beobachtet werden. Mindestens 60% des Genoms ist während der erythrozytären Schizogonie transkriptionell aktiv. Die transkriptionelle Aktivität verläuft in kontinuierlichen Kaskaden. Gene für bioaktive Prozesse wie Proteinsynthese werden dabei zuerst exprimiert, anschließend folgen solche für die DNA-Synthese und schließlich diejenigen für die Wirtszellinvasion (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003).

Das PfAdoMetDC/ODC-Gen, auf dem sich die Schlüsselenzyme der Polyaminsynthese befinden, wird vorwiegend im Trophozoitenstadium exprimiert. In diesem Stadium wächst der Parasit am stärksten, wodurch der Bedarf an Polyaminen stark erhöht ist (Müller et al., 2000). Das Expressionsmuster des PfARG-Gens zeigt, dass dieses vor allem im Ring- und jungen Trophozoitenstadium transkribiert wird. Die Expression in diesem Stadium stimmt gut überein mit der Bereitstellung des Ornithins für die Polyaminsynthese.

Betrachtet man das Alignment der Arginasen, so wird deutlich, dass die *PfARG* wie die Arginasen II eine N-terminale Verlängerung trägt. Bei Arginasen II liegt in dieser Sequenz die Information für die mitochondriale Lokalisierung. Anhand verschiedener Bioinformatik-Programme konnte jedoch keine eindeutige mitochondriale targeting Sequenz in *PfARG* gefunden werden. Um die Lokalisierung der *PfARG* im Parasiten zu untersuchen, wurden spezifische Antikörper gegen *PfARG* hergestellt. Diese erkannten die *PfARG* zwar im Plasmodienhomogenat, jedoch war die Bande in der SDS-PAGE um etwa 15 kDa kleiner als die des rekombinant hergestellten Proteins. Eine Prozessierung ist unwahrscheinlich, da dies weder in der Literatur über Arginasen beschrieben ist noch mit Bioinformatik-Programmen ermittelt werden konnte. Abweichungen im Laufverhalten in der SDS-PAGE von mehreren kDa sind keine Seltenheit und bestätigen, dass diese Methode zur Bestimmung der molekularen Masse nur eingeschränkt aussagefähig ist. Park et al. (2004) untersuchten zwei Proteine mit identischer molekularer Masse, die in ihrem Laufverhalten um etwa 10 kDa abwichen. Allerdings entspricht der SDS-PAGE zufolge die Größe der endogenen *PfARG* derjenigen der meisten Arginasen. Anhand der Immunlokalisierung konnte eine Kreuzreaktion mit der erythrozytären Arginase ausgeschlossen werden. Die *PfARG* ist eindeutig im Cytosol des Parasiten lokalisiert, also nicht im Mitochondrium. Interessanterweise ist die *PfARG* mit zunehmender Reifung des Parasiten zum Trophozoiten und Schizonten zusätzlich in der Wirtszelle zu finden. Dementsprechend müsste das Enzym aus dem Parasiten sekretiert worden sein.

Für den Transport von Proteinen aus der Zelle wird bei Eukaryoten ein Signalpeptid im N-Terminus benötigt, welches das Protein ins endoplasmatische Retikulum überführt. Von dort wird es in den sekretorischen Weg geschleust. Über diesen Weg ist in *P. falciparum* bis anhin nur wenig bekannt. Die Sekretion von Proteinen kann mittels unterschiedlicher Signale erfolgen. Die Mehrzahl der sekretierten Proteine in *P. falciparum* besitzt kein klassisches Signalpeptid, wird aber dennoch exportiert (Pryzborski und Lanzer, 2005). Vor kurzem wurden plasmodiale Proteine beschrieben, die anstelle des Signalpeptids ein sogenanntes Pexel-Motiv besitzen (Marti et al., 2004). Es handelt sich hierbei um eine meist im N-Terminus liegende pentamerische Sequenz. In der gleichen Zeitschrift publizierten Hiller et al. (2004) eine 11 aa große Sequenz, die gewisse Übereinstimmung mit dem Pexel-Motiv aufweist. Auch diese dient der Sekretion von Proteinen aus der parasitophoren Vakuole des Parasiten in den Erythrozyten. 300 - 400 parasiteneigene Proteine werden anhand dieser Sequenz in den Erythrozyten transportiert. Den Großteil davon bilden Virulenzfaktoren wie *PfEMP1*, RIFIN und STEVOR.

Jedoch befinden sich auch andere Proteine wie Phosphatasen, Kinasen und Hitzeschock-Proteine darunter. Die Sekretion in das Wirtszellcytosol erfolgt jedoch bei allen untersuchten Proteinen über die parasitophore Vakuole.

Plasmodium bildet im Ringstadium von der parasitophoren Vakuole ausgehend ein Membransystem aus, das durch das Cytosol des Erythrozyten bis zu dessen Peripherie reicht (Lauer et al., 1997; Haldar et al., 2001; Wickert et al., 2003). Dieses dient dem Parasiten hauptsächlich zur Umfunktionierung der Wirtszellmembran. Die Modifizierung nutzt der Parasit, um der Entfernung infizierter Erythrozyten durch die Milz des Wirtsorganismus auszuweichen (Cooke et al., 2004; Przyborski und Lanzer, 2004). Ob die PfARG sich frei im Cytosol befindet oder an eine Struktur gebunden ist, wurde mittels SLO-Behandlung untersucht. Ansorge et al. (1996) beschrieben, dass durch die Behandlung mit SLO das Cytosol des Erythrozyten von dem sich in der parasitophoren Vakuole befindenden Parasiten getrennt werden kann.

Weder ein Signalpeptid noch ein Pexel-Motiv konnte bis anhin in der PfARG identifiziert werden. Auch ist vollkommen unklar, welche Rolle die PfARG im Erythrozyten spielt. Des Weiteren zeigten die Versuche mit SLO, dass die PfARG nicht frei im Cytosol des Wirtes vorliegt, sondern an eine Struktur im Wirtscytosol gebunden scheint.

Möglicherweise liegt die Funktion der plasmodialen Arginase nicht ausschließlich in der Produktion von Ornithin für die Polyaminsynthese. Gobert et al. (2001) zeigten, dass die Arginase von *Helicobacter pylori* die NO-Synthese des Wirtes inhibiert, um dadurch sein Überleben zu sichern. Ähnliche Interaktionen mit dem Wirt wurden bei *L. major* festgestellt (Iniesta et al., 2001; Kropf et al., 2005). Ein negativer Effekt von NO auf das Wachstum verschiedener Plasmodienarten konnte bereits beobachtet werden (Balmer et al., 2000; Sharma et al., 2004). Erythrozyten besitzen zwei Formen von NOS, eine induzierbare und eine konstitutive (Jubelin und Gierman, 1996). Ob diese jedoch aktiv sind, wird von Kang et al. (2000) in Frage gestellt. Wozu rote Blutkörperchen dieses Enzym benötigen, ist umstritten. Interessant scheint in diesem Zusammenhang die Arbeit von Bor-Kucukatay et al. (2003). Sie untersuchten die Funktion von NO in der Deformabilität des Erythrozyten und konnten nachweisen, dass die roten Blutzellen in der Lage sind, den NO-Gehalt zu regulieren. Hierdurch haben diese einen Einfluss auf die Mikrozirkulation. Was schließlich die Aufgabe der PfARG im Erythrozyten ist, scheint ein äußerst interessantes Forschungsprojekt zu sein und soll dringend weiter untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Malaria ist mit 300 Millionen Erkrankungen und weit über einer Million Toten pro Jahr die bedeutendste parasitäre Tropenkrankheit. Aufgrund sich schnell ausbreitender Resistenzen des Erregers *Plasmodium* gegenüber den gängigen Antimalariamedikamenten ist es bisher nicht gelungen, die Krankheit erfolgreich zu bekämpfen. So ist es dringend notwendig, im Metabolismus des Parasiten neue Angriffspunkte für die Entwicklung von wirksamen Chemotherapeutika zu identifizieren. Das erythrozytäre Stadium von *P. falciparum* ist allein verantwortlich für die Symptomatik der Malaria tropica. In dieser Phase weist der Parasit eine hohe Proliferationsrate auf, die der sich schnell teilender Krebszellen gleicht. Polyamine sind essentiell für Proliferation und Differenzierung in jedem Organismus. In der Bekämpfung von Tumorzellen, phytopathogenen Pilzen und dem Protozoon *Trypanosoma gambiense* bietet die Blockierung des Polyaminstoffwechsels einen viel versprechenden Ansatz.

In *P. falciparum* sind die Schlüsselenzyme der Polyaminsynthese S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (AdoMetDC) und Ornithin-Decarboxylase (ODC) auf einem bifunktionellen Polypeptid PfAdoMetDC/ODC angeordnet. Anhand der Hemmung mittels dreier ODC-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass das Wachstum des Parasiten stagniert, sich dieser Effekt jedoch durch Zugabe des Reaktionsprodukts Putrescin wieder aufheben lässt. Dies zeigt zum einen, dass der Parasit in der Lage ist, Putrescin aufzunehmen, und zum anderen, dass die verwendeten Inhibitoren hochspezifisch sind. Ob die Polyaminsynthese für *P. falciparum* tatsächlich essentiell ist, wurde mittels genetischer Manipulation analysiert. Die transgene Veränderung von *P. falciparum* birgt einige Probleme. Zum einen muss die eingebrachte DNA vier Membransysteme überwinden, um in den Kern des sich im Erythrozyten befindenden Parasiten vorzudringen. Zum anderen ist das Ereignis der homologen Rekombination im haploiden Genom des Parasiten äußerst selten. So kann es mehrere Monate dauern, bis die ersten transgenen Zellen isoliert werden können.

In den Transfektionsvektor pHTK wurden zwei homologe Sequenzen kloniert, worüber ein Doppelcrossover erfolgen sollte und somit das endogene PfAdoMetDC/ODC-Gen gegen das Gen der humanen Dihydrofolat-Reduktase (hDHFR) ausgetauscht würde. Episomal konnte das Plasmid in den transgenen Zellen detektiert werden. Eine Deletion der endogenen Sequenz konnte jedoch nicht erzielt werden. Möglicherweise reicht die Zugabe von Spermidin und Putrescin zum Kulturmedium nicht aus, um das fehlende decarboxylierte AdoMet zu ergänzen. Parallel wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt

und transfiziert. Durch diese sollte nur die ODC-Domäne zerstört werden, deren Funktion würde dabei durch Zugabe von Putrescin zum Medium ersetzt werden. Das Konstrukt pHTK-O-Ko diente der Deletion der ODC-Domäne, das pHTK-Om-Konstrukt sollte das Gen des bifunktionellen Proteins rekonstituieren und dabei eine inaktivierende Doppelmutation ins aktive Zentrum der ODC einfügen. Beide Konstrukte konnten nach etwa einem Monat in der jeweiligen Plasmodienkultur nachgewiesen werden, jedoch erfolgte eine genomische Veränderung nur durch das pHTK-Om-Konstrukt. Die Mutation war derart generiert, dass durch die Insertion derselben im Genom eine neue Restriktionsschnittstelle entstand. Anhand dieser wurden sowohl isolierte Klone als auch die gesamte transgene Population auf das Tragen der Mutation untersucht. Da diese nicht nachgewiesen werden konnte, episomal jedoch immer noch vorlag, ist davon auszugehen, dass sie nicht ins Genom eingefügt wurde. Betrachtet man den Mechanismus der homologen Rekombination, so ist nach der Auflösung der Heteroduplexstruktur zu erwarten, dass nur in 50% der Fälle die endogene Sequenz durch die anschließende Reparatur zum Wildtyp rekonstituiert wird. Da jedoch in der 3D7-hDHFR-Om-Population keine Mutation vorlag, deutet dies daraufhin, dass diejenigen Zellen selektiert wurden, bei denen das Crossover-Ereignis ausschließlich im letzten Fünftel der homologen Sequenz, also hinter der Mutation erfolgte. Hierdurch wurde diese nicht ins Genom eingefügt. Dementsprechend war die Mutante aus der Plasmodienkultur verdrängt worden. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Genort angesprochen wird, wodurch die Grundvoraussetzung der genetischen Manipulation gegeben ist. So scheinen die durch die genomische Modifikation im Polyaminstoffwechsel beeinträchtigten Zellen nicht genügend Putrescin aufnehmen zu können, um sich in der Plasmodienkultur zu behaupten. Es wurde schließlich ein weiteres Transfektionskonstrukt hergestellt, das auf dem pHTK-O-Konstrukt basiert, zusätzlich aber eine Kopie der hODC trägt. Durch den Austausch der *PfODC* gegen das humane Ortholog mittels Single Crossover ist der Parasit in der Lage, selber Putrescin herzustellen und ist somit nicht auf die Aufnahme von Putrescin angewiesen. Nach Transfektion des p Δ TK-O-hODCV5 konnten tatsächlich sowohl die Integration des Konstruktes ins plasmodiale Genom als auch die Expression der hODC im Parasiten detektiert werden. Jedoch konnte im Rahmen der Arbeit kein Knockout-Klon isoliert und phänotypisch charakterisiert werden. Zusammengefasst deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass die *PfODC* für das Überleben des Parasiten im Blutstadium essentiell ist.

Die Synthese von Polyaminen muss nicht zwingend über die ODC erfolgen. Viele Organismen - meist Prokaryoten aber auch einige Pflanzen und wenige Protozoen -

besitzen keine ODC. Sie stellen Putrescin aus Arginin her. Hierfür benötigen sie mindestens zwei Enzyme, die Arginin-Decarboxylase (ADC), welche aus Arginin Agmatin herstellt, und die Agmatinase, die schließlich den Schritt von Agmatin zu Putrescin katalysiert. Der letzte Schritt ist bei einigen Bakterien durch die Enzyme Agmatin-Deiminase und N-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase ersetzt.

Seit 2002 ist das Genom von *P. falciparum* vollständig bekannt. Auf der Suche nach Enzymen des alternativen Polyaminsynthesewegs, wurden zwei offene Leserahmen (ORF) gefunden. Der erste ist 7,3 kb groß, weist Homologien zu Pyridoxyl-abhängigen Aminosäure-Decarboxylasen auf und wird in PlasmoDB als potentielle Lysin-Decarboxylase geführt. Die Aminosäure-Decarboxylasen unterscheiden sich erst eindeutig durch ihre Substratspezifität, jedoch können einige ODC auch Lysin akzeptieren und umgekehrt. Einzigartig an dem plasmodialen ORF ist, dass er mehr als doppelt so groß wie der für Aminosäure-Decarboxylasen beschriebene ist. Außerhalb des Homologiebereichs weist die plasmodiale Sequenz keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen auf. Der Versuch, mittels verschiedener bakterieller Expressionssysteme sowohl die gesamte Sequenz als auch Teile dieser rekombinant herzustellen, blieb jedoch erfolglos, wodurch keine Zuordnung möglich war. Besäße dieses Enzym eine ADC-Aktivität, so würde man erwarten, dass der Parasit für die alternative Polyaminsynthese auch eine Agmatinase besitzt. Tatsächlich zeigte die zweite Sequenz von 1,2 kb Homologie zu der Familie der Arginasen, was Agmatinasen einschließt. Anhand der darauf folgenden biochemischen Charakterisierung konnte das plasmodiale Protein eindeutig als Arginase identifiziert werden. Da außer der Arginase keine weitere Agmatinase-ähnliche Sequenz und auch keine Homologien zu Agmatin-Deiminase und N-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase im *P. falciparum*-Genom zu finden sind, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Parasit auf keinen alternativen Polyaminsyntheseweg ausweichen kann.

Die plasmodiale Arginase (*PfARG*) stellt aus Arginin Ornithin her und leitet dadurch den ersten Schritt in der Polyaminsynthese des Parasiten ein. Die *PfARG* besitzt eine molekulare Masse von 48 kDa und weicht damit um etwa 10 kDa von der für Arginasen typischen Größe ab. Der Größenunterschied beruht darauf, dass *PfARG* zwei plasmodienspezifische Insertionen trägt, deren Funktion nach wie vor unbekannt ist. In der Gelchromatographie eluiert sie als 150 kDa-großes Homotrimer und entspricht somit dem oligomeren Status beider Säugerarginasen. Ihre biochemischen Eigenschaften gleichen denen beschriebener Arginasen. Die beiden Typen I und II lassen sich anhand ihrer Sensitivität gegen gebräuchliche Arginaseinhibitoren unterscheiden. Die

entsprechenden K_i -Werte der *PfARG* ermöglichen jedoch keine Zuordnung zu einem der Typen. Dennoch ist das plasmodiale Enzym eindeutig weniger selektiv gegenüber den verwendeten Inhibitoren. Zudem konnte die hemmende Wirkung einiger dieser Substanzen auf das Wachstum der Plasmodienkultur bestätigt werden.

Anhand der Kristallstrukturen verschiedener Arginasen konnte gezeigt werden, dass sich im aktiven Zentrum jeder Untereinheit des Enzyms zwei Mn^{2+} -Ionen befinden. Auch die *PfARG* ist wie die meisten Arginasen manganabhängig. Der Effekt des Metallchelators EDTA wirkt sich insofern auf die *PfARG* aus, als diese nicht nur in ihre Untereinheiten zerfällt, sondern auch ihre Aktivität vollständig verliert. Hierdurch unterscheidet sie sich deutlich von allen soweit charakterisierten Arginasen. Nähere Untersuchungen der hochkonservierten manganbindenden Aminosäuren durch mutierte Formen des plasmodialen Enzyms unterstreichen die durch die Inhibierung mit EDTA erzielten Ergebnisse. Demnach ist die Aktivität der *PfARG* im Gegensatz zu den Säugerarginasen deutlich stärker durch die Quartärstruktur bedingt. Auch in der 3D-Struktur der *PfARG*, die anhand der Kristallvorlage der humanen Arginase II modelliert wurde, lassen sich die manganbindenden Aminosäuren an ihren konservierten Positionen wieder finden. Die Unterschiede in der Stabilität sollen in einem späteren Schritt anhand eines dynamischen Strukturmodells bestätigt werden. Zudem ermöglicht das dynamische Modell „docking“-Experimente, anhand derer eine Vielzahl potentieller Leitsubstanzen, die mit der *PfARG* interagieren, evaluiert werden könnten, bevor deren Wirkung auf das rekombinante Enzym oder auf die Plasmodienkultur getestet werden.

Die *PfARG* kann Agmatin nicht umwandeln und besitzt demnach keine Agmatinase-Funktion, wie für andere Arginasen beschrieben. Dies liefert einen weiteren Beweis dafür, dass *P. falciparum* keine Möglichkeit hat, Putrescin aus Agmatin herzustellen. Das produzierte Ornithin ist dementsprechend der einzige Vorläufer für die Polyaminsynthese. Die *PfARG* wird im Ring- und jungen Trophozoitenstadium exprimiert und stellt somit das Ornithin für die Polyaminsynthese bereit, die im späten Trophozoitenstadium stattfindet.

Die beiden Arginasetypen im Säuger besitzen unterschiedliche biologische Funktionen. Während der Typ I die Entgiftung von Ammonium in Form von Urea vornimmt, ist die Aufgabe der mitochondrialen Arginase II eher in der Regulation der Arginin-, Ornithin- und Stickoxid (NO)-Konzentrationen zu finden. Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben die Konkurrenz der Arginase mit der NO-Synthase um das Substrat Arginin. Möglicherweise liegt die Funktion der plasmodialen Arginase nicht ausschließlich in der Produktion von Ornithin für die Polyaminsynthese. So inhibiert zum Beispiel die Arginase von

Helicobacter pylori die NO-Synthese des Wirtes, um dadurch das eigene Überleben zu sichern. Ähnliche Interaktionen mit dem Wirt wurden bei *Leishmania major* festgestellt. Ein negativer Effekt von NO auf das Wachstum verschiedener Plasmodienarten konnte bereits beobachtet werden. Die PfARG weist eine N-terminale Verlängerung auf, deren Funktion von mehreren Bioinformatik-Programmen nicht zu geordnet werden konnte. Mittels Immunlokalisierung der PfARG mit spezifischen Antikörpern konnte diese cytosolisch nachgewiesen werden. Betrachtet man spätere Blutstadien, so ist die PfARG auch im Wirtszellcytoplasma anzutreffen. Bis anhin sind mehrere Sekretions-Signale beschrieben worden, keines davon ist jedoch in der Sequenz der PfARG zu finden. Was letztendlich die Aufgabe der PfARG im Erythrozyten ist, scheint ein äußerst interessantes Forschungsprojekt zu sein und soll dringend weiter untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

A

Aguirre R., Kasche V. (1983) Catalytically active monomer forms of immobilized arginase. Eur. J. Biochem. 130(2):373-381.

Anderson A.B. (1945) The activation of Jack-Bean arginase by cobalt, manganese, and iron. Biochem. J. 39:139-142.

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.

Aravind L., Iyer L.M., Wellems T.E., Miller L.H. (2003) *Plasmodium* biology: genomic gleanings. Cell. 115(7):771-785. Review.

Archibald R.M. (1945) Colorimetric determination of urea. J. Biol. Chem. 157:507-518.

Ash D.E. (2004) Structure and function of arginases. J. Nutr. 134:2760-2764. Review.

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

B

Bacchi C.J., Garofalo J., Mockenhaupt D., McCann P.P., Diekema K.A., Pegg A.E., Nathan H.C., Mullaney E.A., Chunosoff L., Sjoerdsma A., Hutner S.H. (1983) *In vivo* effects of alpha-DL-difluoromethylornithine on the metabolism and morphology of *Trypanosoma brucei brucei*. Mol Biochem Parasitol. 7(3):209-225.

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

Baggio R., Emig F.A., Christianson D.W., Ash D.E., Chakder S., Rattan S. (1999) Biochemical and functional profile of a newly developed potent and isozyme-selective arginase inhibitor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 290(3):1409-1416.

Bailey S.M., Brennenman M.A., Goodwin E.H. (2004) Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. Nucleic Acids Res. 32(12):3743-3751.

Balmer P., Phillips H.M., Maestre A.E., McMonagle F.A., Phillips R.S. (2000) The effect of nitric oxide on the growth of *Plasmodium falciparum*, *P. chabaudi* and *P. berghei in vitro*. Parasite. Immunol. 22(2):97-106.

Barbul A. (1986) Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. J. Parenter. Enteral. Nutr. 10(2):227-238. Review.

- Bauer P.M., Buga G.M., Fukuto J.M., Pegg A.E., Ignarro L.J. (2001) Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 276(37):34458-34464.
- Bender A., van Dooren G.G., Ralph S.A., McFadden G.I., Schneider G. (2003) Properties and prediction of mitochondrial transit peptides from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 132(2):59-66.
- Benning M.M., Shim H., Raushel F.M., Holden H.M. (2001) High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry.* 40:2712-2722
- Berkowitz D.E., White R., Li D., Minhas K.M., Cernetich A., Kim S., Burke S., Shoukas A.A., Nyhan D., Champion H.C., Hare J.M. (2003) Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation.* 108(16):2000-2006
- Bewley M.C., Lott J.S., Baker E.N., Patchett M.L. (1996) The cloning, expression and crystallisation of a thermostable arginase. *FEBS Lett.* 386(2-3):215-218.
- Bewley M.C., Jeffrey P.D., Patchett M.L., Kanyo Z.F., Baker E.N. (1999) Crystal structures of *Bacillus caldovelox* arginase in complex with substrate and inhibitors reveal new insights into activation, inhibition and catalysis in the arginase superfamily. *Structure Fold. Des.* 7(4):435-448.
- Bhakdi S., Tranum-Jensen J., Sziegoleit A. (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect. Immun.* 47(1):52-60.
- Bhattacharyya M.K., Bhattacharyya nee Deb S., Jayabalasingham B., Kumar N. (2005) Characterization of kinetics of DNA strand-exchange and ATP hydrolysis activities of recombinant PfRad51, a *Plasmodium falciparum* recombinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139(1):33-39.
- 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(2):237-243.
- Boger R.H., Bode-Boger S.M., Frolich J.C. (1996) The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis.* 127(1):1-11. Review.
- Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. (2003) Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284(5):H1577-1584.
- Boucher J.L., Custot J., Vadon S., Delaforge M., Lepoivre M., Tenu J.P., Yapo A., Mansuy D. (1994) N-omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203(3):1614-1621.

Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. (1999) Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell. Mol. Life. Sci.* 55(8-9):1015-1028. Review

Bowie J.U., Luthy R., Eisenberg D. (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science.* 253(5016):164-170.

Bozdech Z., Llinas M., Pulliam B.L., Wong E.D., Zhu J., DeRisi J.L. (2003) The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS. Biol.* 1(1):E5.

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.

Brogden R.N., Carmine A., Heel R.C., Morley P.A., Speight T.M., Avery G.S. (1981) Amoxicillin/clavulanic acid: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic use. *Drugs.* 22(5):337-362. Review.

Bronte V., Zanovello P. (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 5(8):641-654. Review.

Buga G.M., Wei L.H., Bauer P.M., Fukuto J.M., Ignarro L.J. (1998) NG-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275(4 Pt 2):R1256-1264.

Burri C, Brun R. (2003) Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol. Res.* 90 Supp 1:S49-52 Review.

C

Cama E., Emig F.A., Ash D.E., Christianson D.W. (2003a) Structural and functional importance of first-shell metal ligands in the binuclear manganese cluster of arginase I. *Biochemistry.* 42(25):7748-7758.

Cama E., Colleluori D.M., Emig F.A., Shin H., Kim S.W., Kim N.N., Traish A.M., Ash D.E., Christianson D.W. (2003b) Human Arginase II: Crystal Structure and Physiological Role in Male and Female Sexual Arousal *Biochemistry.* 42(28):8445-8451.

Carvalho T.G., Menard R. (2005) Manipulating the *Plasmodium* genome. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7(1):39-55. Review.

Cavalli R.C., Burke C.J., Kawamoto S., Soprano D.R., Ash D.E. (1994) Mutagenesis of rat liver arginase expressed in *Escherichia coli*: role of conserved histidines. *Biochemistry.* 33, 10652-10657.

Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P., Iyer R.K. (2004) Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol. Genet. Metab.* 81 Suppl. 1:S38-44. Review.

Childs A.C., Mehta D.J., Gerner E.W. (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* 60(7):1394-1406. Review.

Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J.D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3497-3500.

Christianson D.W., Cox J.D. (1999) Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 68:33-57. Review.

Claros M.G., Vincens P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241(3):779-786.

Colleluori D.M., Ash D.E. (2001) Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. *Biochemistry.* 40(31):9356-9362.

Cooke B.M., Lingelbach K., Bannister L.H., Tilley L. (2004) Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol.* 20(12):581-589. Review.

Cornforth M.N., Eberle R.L. (2001) Termini of human chromosomes display elevated rates of mitotic recombination. *Mutagenesis.* 16(1):85-89.

Cowman A.F., Morry M.J., Biggs B.A., Cross G.A., Foote S.J. (1988) Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(23):9109-9113.

Cox J.D., Kim N.N., Traish A.M., Christianson D.W. (1999) Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat. Struct. Biol.* 6(11):1043-1047.

Cox J.D., Cama E., Colleluori D.M., Pethe S., Boucher J.L., Mansuy D., Ash D.E., Christianson D.W. (2001) Mechanistic and metabolic inferences from the binding of substrate analogues and products to arginase. *Biochemistry.* 40(9):2689-2701.

Crabb B.S., Cowman A.F. (1996) Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(14):7289-7294.

D

Das Gupta R., Krause-Ihle T., Bergmann B., Muller I.B., Khomutov A.R., Muller S., Walter R.D., Luersen K. (2005) 3-Aminoxy-1-aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(7):2857-2864.

Deitsch K., Driskill C., Wellems T. (2001) Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res.* 29(3):850-853.

DeLano W.L. (2002) The PyMOL User's Manual. DeLano Scientific. San Carlos. CA. USA.

Donald R.G., Roos D.S. (1993) Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90(24):11703-11707.

Duraisingh M.T., Triglia T., Cowman A.F. (2002) Negative selection of *Plasmodium falciparum* reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. Int. J. Parasitol. 32(1):81-89.

E

Eckmann L., Laurent F., Langford T.D., Hetsko M.L., Smith J.R., Kagnoff M.F., Gillin F.D. (2000) Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. J. Immunol. 164(3):1478-1487.

El Alami M., Dubois E., Oudjama Y., Tricot C., Wouters J., Stalon V., Messenguy F. (2003) Yeast epiarginase regulation, an enzyme-enzyme activity control: identification of residues of ornithine carbamoyltransferase and arginase responsible for enzyme catalytic and regulatory activities. J. Biol. Chem. 278(24):21550-21558.

Elkins J.M., Clifton I.J., Hernandez H., Doan L.X., Robinson C.V., Schofield C.J., Hewitson K.S. (2002) Oligomeric structure of proclavaminate amidohydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. Biochem. J. 366(Pt 2):423-434.

F

Fidock D.A., Wellems T.E. (1997) Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94(20):10931-10936.

Fidock D.A., Nomura T., Talley A.K., Cooper R.A., Dzekunov S.M., Ferdig M.T., Ursos L.M., Sidhu A.B., Naude B., Deitsch K.W., Su X.Z., Wootton J.C., Roepe P.D., Wellems T.E. (2000) Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Mol. Cell. 6(4):861-871.

Fischer K., Horrocks P., Preuss M., Wiesner J., Wunsch S., Camargo A.A., Lanzer M. (1997) Expression of var genes located within polymorphic subtelomeric domains of *Plasmodium falciparum* chromosomes. Mol. Cell Biol. 17(7):3679-3686.

Flores M.V., O'Sullivan W.J., Stewart T.S. (1994) Characterisation of the carbamoyl phosphate synthetase gene from *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 68(2):315-318.

Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K.A., Dodson R., Hickey E.K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.F., Fleischmann R.D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A.R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M.D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Wathley L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fuji C., Cotton M.D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H.O., Venter J.C. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. 390(6660):580-586.

G

Gafan C., Wilson J., Berger L.C., Berger B.J. (2001) Characterization of the ornithine aminotransferase from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 118(1):1-10.

Garbers D.L., Lowe D.G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J. Biol. Chem.* 269(49):30741-30744. Review.

Gardan R., Rapoport G., Debarbouille M. (1995) Expression of the rocDEF operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 249(5):843-856.

Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M.S., Nene V., Shallom S.J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Pertea M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M.W., Vaidya A.B., Martin D.M., 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.

Gillet J.M., Charlier J., Bone G., Mulamba P.L. (1983) *Plasmodium berghei*: inhibition of the sporogonous cycle by alpha-difluoromethylornithine. *Exp. Parasitol.* 56(2):190-193.

Gillet J.M., Bone G., Herman F. (1982) Inhibitory action of alpha-difluoromethylornithine on rodent malaria (*Plasmodium berghei*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76(6):776-777.

Glockner G., Eichinger L., Szafranski K., Pachebat J.A., Bankier A.T., Dear P.H., Lehmann R., Baumgart C., Parra G., Abril J.F., Guigo R., Kumpf K., Tunggal B., Cox E., Quail M.A., Platzer M., Rosenthal A., Noegel A.A.; ictyostelium Genome Sequencing Consortium. (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 418(6893):79-85.

Gobert A.P., McGee D.J., Akhtar M., Mendz G.L., Newton J.C., Cheng Y., Mobley H.L., Wilson K.T. (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(24):13844-13849.

Gotoh T., Sonoki T., Nagasaki A., Terada K., Takiguchi M., Mori M. (1996) Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett.* 395(2-3):119-122.

Grody W.W., Dizikes G.J., Cederbaum S.D. (1987) Human arginase isozymes. *Isozymes. Curr. Top. Biol. Med. Res.* 13:181-214.

H

Haider N., Eschbach M.L., Dias Sde S., Gilberger T.W., Walter R.D., Luersen 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.

Haldar K., Samuel B.U., Mohandas N., Harrison T., Hiller N.L. (2001) Transport mechanisms in *Plasmodium*-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network. *Int. J. Parasitol.* 31(12):1393-1401. Review.

Hasne M., Ullman B. (2005) Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 280(15):15188-15194.

Haraguchi Y., Takiguchi M., Amaya Y., Kawamoto S., Matsuda I., Mori M. (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(2):412-415.

Hellerman L., Perkins M.E. (1935) Activation of enzymes. *J. Biol. Chem.* 112:175-194

Hess D.T., Matsumoto A., Kim S.O., Marshall H.E., Stamler J.S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(2):150-166. Review.

Hiller N.L., Bhattacharjee S., van Ooij C., Liolios K., Harrison T., Lopez-Estrano C., Haldar K. (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science.* 306(5703):1934-1937.

Hirsch-Kolb H., Greenberg D.M. (1968) Molecular characteristics of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.* 243(23):6123-6129.

Hirsch-Kolb H., Heine J.P., Kolb H.J., Greenberg D.M. (1970) Comparative physical-chemical studies of mammalian arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* 37(3):345-359.

Hwang H.J., Kim E.H., Cho Y.D. (2001) Isolation and properties of arginase from a shade plant, ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) roots. *Phytochemistry.* 58(7):1015-1024.

I

Iniesta V., Gomez-Nieto L.C., Corraliza I. (2001) The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* 193(6):777-784.

Iyer R.K., Bando J.M., Jenkinson C.P., Vockley J.G., Kim P.S., Kern R.M., Cederbaum S.D., Grody W.W. (1998) Cloning and characterization of the mouse and rat type II arginase genes. *Mol. Genet. Metab.* 63(3):168-175.

J

Janowitz T., Kneifel H., Piotrowski M. (2003) Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Lett.* 544(1-3):258-261.

Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D. (1996) Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 114(1):107-132. Review.

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.

Jiang Y., Roberts S.C., Jardim A., Carter N.S., Shih S., Ariyanayagam M., Fairlamb A.H., Ullman B. (1999) Ornithine Decarboxylase Gene Deletion Mutants of *Leishmania donovani* *J. Biol. Chem.* 274(6):3781-3788.

Jubelin B.C., Gierman J.L. (1996) Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am. J. Hypertens.* 9(12 Pt 1):1214-1219.

K

Kadekoppala M., Cheresh P., Catron D., Ji D.D., Deitsch K., Wellems T.E., Seifert H.S., Haldar K. (2001) Rapid recombination among transfected plasmids, chimeric episome formation and trans gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112(2):211-218.

Khan A.J., Minocha S.C. (1989) Biosynthetic arginine decarboxylase in phytopathogenic fungi. *Life Sci.* 44(17):1215-1222

Kandpal M., Tekwani B.L. (1997) Polyamine transport systems of *Leishmania donovani* promastigotes. *Life Sci.* 60(20):1793-1801.

Kang E.S., Ford K., Grotkowsky G., Wang Y.B., Chiang T.M., Acchiardo S.R. (2000) Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J. Lab. Clin. Med.* 135(6):444-451.

Kanyo Z.F., Scolnick L.R., Ash D.E., Christianson D.W. (1996) Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature.* 383(6600):554-557.

Kaur K., Emmett K., McCann P.P., Sjoerdsma A., Ullman B. (1986) Effects of DL-alpha-difluoromethylornithine on *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Protozool.* 33(4):518-521.

Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. (1997) *Medizinische Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Khangulov S.V., Sossong T.M. Jr, Ash D.E., Dismukes G.C. (1998) L-arginine binding to liver arginase requires proton transfer to gateway residue His141 and coordination of the guanidinium group to the dimanganese(II,II) center. *Biochemistry*. 37(23):8539-8550.

Kim N.N., Christianson D.W., Traish A.M. (2004) Role of arginase in the male and female sexual arousal response. *J Nutr*. 134(10 Suppl):2873-2879. Review.

Kim P.S., Iyer R.K., Lu K.V., Yu H., Karimi A., Kern R.M., Tai D.K., Cederbaum S.D., Grody W.W. (2002) Expression of the liver form of arginase in erythrocytes. *Mol. Genet. Metab*. 76(2):100-110.

King N.E., Rothenberg M.E., Zimmermann N. (2004) Arginine in asthma and lung inflammation. *J Nutr*. Oct;134(10 Suppl):2830-2836. Review.

Knippers R. (2001) *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Krause T., Luersen K., Wrenger C., Gilberger T.W., Muller 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 Pt 2:287-292.

Krebs H.A., Henseleit K. (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem*. 210:33-66.

Krnajski Z., Gilberger T.W., Walter R.D., Cowman A.F., Muller S. (2002) Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *J. Biol. Chem*. 277(29):25970-25975.

Kropf P., Fuentes J.M., Fahnrich E., Arpa L., Herath S., Weber V., Soler G., Celada A., Modolell M., Muller I. (2005) Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. *FASEB. J*. 19(8):1000-1002.

Kumar R., Adams B., Oldenburg A., Musiyenko A., Barik S. (2002) Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malar. J*. 1:5.

Kyes S.A., Rowe J.A., Kriek N., Newbold C.I. (1999) Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96(16):9333-9338.

Kyes S., Pinches R., Newbold C. (2000) A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 105(2):311-315.

L

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.

Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26:283-291.

Lauer S.A., Rathod P.K., Ghori N., Haldar K. (1997) A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science*. 276(5315):1122-1125.

Lavulo L.T., Sossong T.M. Jr, Brigham-Burke M.R., Doyle M.L., Cox J.D., Christianson D.W., Ash D.E. (2001) Subunit-subunit interactions in trimeric arginase. Generation of active monomers by mutation of a single amino acid. *J. Biol. Chem.* 276(17):14242-14248.

Le Roch K.G., Zhou Y., Blair P.L., Grainger M., Moch J.K., Haynes J.D., De La Vega P., Holder A.A., Batalov S., Carucci D.J., Winzeler E.A. (2003) Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. 301(5639):1503-1508.

Li F., Hua S.B., Wang C.C., Gottesdiener K.M. (1998) *Trypanosoma brucei brucei*: characterization of an ODC null bloodstream form mutant and the action of alpha-difluoromethylornithine. *Exp. Parasitol.* 88(3):255-257.

Li H., Meininger C.J., Hawker J.R. Jr., Haynes T.E., Kepka-Lenhart D., Mistry S.K., Morris S.M. Jr., Wu G. (2001) Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280(1):E75-82.

Lee Y.S., Cho Y.D. (2001) Identification of essential active-site residues in ornithine decarboxylase of *Nicotiana glutinosa* decarboxylating both L-ornithine and L-lysine. *Biochem. J.* 360(Pt 3):657-665.

Louis C.A., Mody V., Henry W.L. Jr., Reichner J.S., Albina J.E. (1999) Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am. J. Physiol.* 276(1 Pt 2):R237-242.

Luiking Y.C., Poeze M., Dejong C.H., Ramsay G., Deutz N.E. (2004) Sepsis: an arginine deficiency state? *Crit. Care Med.* 32(10):2135-2145.

M

MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:323-350. Review.

Malhotra P., Dasaradhi P.V., Kumar A., Mohammed A., Agrawal N., Bhatnagar R.K., Chauhan V.S. (2002) Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 45(5):1245-1254.

Mamoun C.B., Gluzman I.Y., Goyard S., Beverley S.M., Goldberg D.E. (1999) A set of independent selectable markers for transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(15):8716-8720.

Marti M., Good R.T., Rug M., Knuepfer E., Cowman A.F. (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science.* 306(5703):1930-1933.

Marti-Renom M.A., Stuart A.C., Fiser A., Sanchez R., Melo F., Sali A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:291-325. Review.

Matuschewski K, Ross J, Brown SM, Kaiser K, Nussenzweig V, Kappe SH. (2002) Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J. Biol. Chem.* 277(44):41948-41953.

McRobert L., McConkey G.A. (2002) RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119(2):273-278.

Mehlhorn H., Piekarski G. (2002) Grundriß der Parasitenkunde. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Meij J.T., Haselton C.L., Hillman K.L., Muralikrishnan D., Ebadi M., Yu L. (2004) Differential mechanisms of nitric oxide- and peroxynitrite-induced cell death. *Mol. Pharmacol.* 66(4):1043-1053.

Meissner M., Krejany E., Gilson P.R., de Koning-Ward T.F., Soldati D., Crabb B.S. (2005) Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(8):2980-2985.

Mercenier A., Simon J.P., Haas D., Stalon V. (1980) Catabolism of L-arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gen. Microbiol.* 116(2):381-389.

Meyer J., Richter N., Hecker M. (1997) High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Anal. Biochem.* 247(1):11-16.

Michal G. (1999) "Biochemical Pathways" - Biochemie-Atlas. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.

Mizuguchi K., Deane C.M., Blundell T.L., Johnson M.S., Overington J.P. (1998) JOY: protein sequence-structure representation and analysis. *Bioinformatics.* 14(7):617-623.

Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59:451-480.

Mora J., Tarrab R., Martuscelli J., Soberon G. (1965) Characteristics of arginase from ureotelic and non-ureotelic animals. *Biochem. J.* 96:588-594.

Morris C.R., Kato G.J., Poljakovic M., Wang X., Blackwelder W.C., Sachdev V., Hazen S.L., Vichinsky E.P., Morris S.M. Jr., Gladwin M.T. (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* 294(1):81-90.

Morris S.M. Jr., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D. (1997) Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene.* 193:157-161.

Morris S.M. Jr. (2004) Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.* 134(10 Suppl):2743-2747. Review.

Mota M.M., Thathy V., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V. (2001) Gene targeting in the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113(2):271-278.

Muller S., Da'dara A., Luersen 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. Biol. Chem.* 275(11):8097-8102.

Muller S., Coombs G.H., Walter R.D. (2001) Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends. Parasitol.* 17(5):242-249. Review.

Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., Hayashi S., Igarashi K., Tamura T., Tanaka K., Ichihara A. (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 360(6404):597-599.

Mutumba M.C., Li F., Gottesdiener K.M., Wang C.C. (1999) A *Trypanosoma brucei* bloodstream form mutant deficient in ornithine decarboxylase can protect against wild-type infection in mice. *Exp. Parasitol.* 91(2):176-184.

N

Nakada Y., Itoh Y. (2003) Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology.* 149:707-714.

Nakai K., Horton P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends. Biochem. Sci.* 24(1):34-36.

Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural. Syst.* 8(5-6):581-599.

Nishikura K. (2001) A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell.* Nov 107(4):415-418. Review.

Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302(1):205-217.

Nunes A., Thathy V., Bruderer T., Sultan A.A., Nussenzweig R.S., Menard R. (1999) Subtle mutagenesis by ends-in recombination in malaria parasites. *Mol. Cell. Biol.* 19(4):2895-2902.

O

O'Donnell R.A., Freitas-Junior L.H., Preiser P.R., Williamson D.H., Duraisingh M., McElwain T.F., Scherf A., Cowman A.F., Crabb B.S. (2002) A genetic screen for improved plasmid segregation reveals a role for Rep20 in the interaction of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *EMBO J.* 21(5):1231-1239.

Ouzounis C.A., Kyriades N.C. (1994) On the evolution of arginases and related enzymes. *J. Mol. Evol.* 39(1):101-104.

P

Park J.H., Burns K., Kinsland C., Begley T.P. (2004) Characterization of two kinases involved in thiamine pyrophosphate and pyridoxal phosphate biosynthesis in *Bacillus subtilis*: 4-amino-5-hydroxymethyl-2methylpyrimidine kinase and pyridoxal kinase. *J. Bacteriol.* 186(5):1571-1573.

Parry-Smith D.J., Payne A.W., Michie A.D., Attwood T.K. (1998) CINEMA - a novel colour interactive editor for multiple alignments. *Gene.* 221(1):GC57-63.

Perozich J., Hempel J., Morris S.M. Jr. (1998) Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1382(1):23-37.

Persson K., Aslund L., Grahn B., Hanke J., Heby O. (1998) *Trypanosoma cruzi* has not lost its S-adenosylmethionine decarboxylase: characterization of the gene and the encoded enzyme. *Biochem. J.* 333(Pt 3):527-537.

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. USA.* 85(23):9114-9118.

Piotrowski M., Janowitz T., Kneifel H. (2003) Plant C-N hydrolases and the identification of a plant N-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278(3):1708-1712.

Polacco J.C., Holland M.A. (1993) Roles of urease in plant cells; in International Review of Cytology (Jeon, K.W. & Jarvik, J., eds.). 145:65–103. Academic Press. Inc., San Diego.

Przyborski J., Lanzer M. (2004) Parasitology. The malarial secretome. Science. 306(5703):1897-1898.

Przyborski J.M, Lanzer M. (2005) Protein transport and trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Parasitology. 130(Pt 4):373-388. Review.

Q

Quemener V., Havouis R., Khan N.A., Martin C., Bouet F., Moulinoux J.P. (1995) Determination of erythrocyte polyamines as a predictive method on tumour diagnosis. An animal study with chemically induced tumours. Anticancer Res. 15(6B):2517-2522.

R

Rajam M.V., Weinstein L.H., Galston A.W. (1985) Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82(20):6874-6878.

Reczkowski R.S., Ash D.E. (1994) Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. Arch. Biochem. Biophys. 312(1):31-37.

Richard H.T., Foster J.W. (2003) Acid resistance in *Escherichia coli*. Adv. Appl. Microbiol. 52:167-186. Review.

Roberts S.C., Scott J., Gasteier J.E., Jiang Y., Brooks B., Jardim A., Carter N.S., Heby O., Ullman B. (2002) S-adenosylmethionine decarboxylase from *Leishmania donovani*. Molecular, genetic, and biochemical characterization of null mutants and overproducers. J. Biol. Chem. 277(8):5902-5909.

Rost B. (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. Protein Eng. 12(2):85-94.

Rubio J.P., Thompson J.K., Cowman A.F. (1996) The var genes of *Plasmodium falciparum* are located in the subtelomeric region of most chromosomes. EMBO J. 15(15):4069-4077.

S

Sabio G., Mora A., Rangel M.A., Quesada A., Marcos C.F., Alonso J.C., Soler G., Centeno F. (2001) Glu-256 is a main structural determinant for oligomerisation of human arginase I. FEBS Lett. 501(2-3):161-165.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74(12):5463-5467.

Schechter P.J., Sjoerdsma A. (1986) Difiuoromethylornithine in the treatment of African trypanosomiasis. Parasitol. Today. (8):223-224.

Schimke R.T. (1963) Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 238:1012-1018.

Scolnick L.R., Kanyo Z.F., Cavalli R.C., Ash D.E., Christianson D.W. (1997) Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochemistry.* 36:10558-10565

Seiler N, Atanassov CL, Raul F. (1998) Polyamine metabolism as target for cancer chemoprevention (review). *Int. J. Oncol.* 13(5):993-1006. Review.

Seiler N. (2003) Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Curr. Drug. Targets.* 4(7):537-564. Review.

Seiler N. (2005) Pharmacological aspects of cytotoxic polyamine analogs and derivatives for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 107(1):99-119. Review.

Sharma A., Eapen A., Subbarao S.K. (2004) Parasite killing in *Plasmodium vivax* malaria by nitric oxide: implication of aspartic protease inhibition. *J. Biochem. (Tokyo).* 136(3):329-334.

Shi H., Djikeng A., Mark T., Wirtz E., Tschudi C., Ullu E. (2000) Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA.* 6(7):1069-1076.

Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. (2000) Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res.* 60(12):3305-3312.

Singh S., Puri S.K., Singh S.K., Srivastava R., Gupta R.C., Pandey V. (1997) Characterization of simian malarial parasite (*Plasmodium knowlesi*)-induced putrescine transport in rhesus monkey erythrocytes. A novel putrescine conjugate arrests *in vitro* growth of simian malarial parasite (*Plasmodium knowlesi*) and cures multidrug resistant murine malaria (*Plasmodium yoelii*) infection *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 272(21):13506-13511.

Spalding J.B., Lammers P.J. (2004) BLAST Filter and GraphAlign: rule-based formation and analysis of sets of related DNA and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W26-32.

Spector E.B., Rice S.C., Moedjono S., Bernard B., Cederbaum S.D. (1982) Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem. Med.* 28(2):165-175.

Stamler J.S., Lamas S., Fang F.C. (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.* 106:675-683.

Stanley B.A., Shantz L.M., Pegg A.E. (1994) Expression of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase in *Escherichia coli*. Determination of sites for putrescine activation of activity and processing. *J. Biol. Chem.* 269(11):7901-7907.

Su X., Ferdig M.T., Huang Y., Huynh C.Q., Liu A., You J., Wootton J.C., Welles T.E. (1999) A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 286(5443):1351-1353.

Svensson F., Persson L. (1996) Regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase in a polyamine auxotrophic cell line. *Mol Cell Biochem.* 162(2):113-119.

Szafranski K., Lehmann R., Parra G., Guigo R., Glockner G. (2005) Gene organization features in A/T-rich organisms. *J. Mol. Evol.* 60(1):90-98.

T

Takagi K., Tatsumi Y., Kitaichi K., Iwase M., Shibata E., Nakao M., Matsumoto T., Takagi K., Hasegawa T. (2004) A sensitive colorimetric assay for polyamines in erythrocytes using oat seedling polyamine oxidase. *Clin. Chim. Acta.* 340(1-2):219-227.

Takatsuka Y., Yamaguchi Y., Ono M., Kamio Y. (2000) Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. *J. Bacteriol.* 182(23):6732-6741.

Thoden J.B., Phillips G.N. Jr., Neal T.M., Raushel F.M., Holden H.M. (2001) Molecular structure of dihydroorotase: A paradigm for catalysis through the use of a binuclear metal center. *Biochemistry.* 40:6989-6997.

Torreilles F., Salman-Tabcheh S., Guerin M., Torreilles J. (1999) Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 30(2):153-163. Review.

Trager W., Jensen J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 193(4254):673-675.

Tsai Y.L., Hayward R.E., Langer R.C., Fidock D.A., Vinetz J.M. (2001) Disruption of *Plasmodium falciparum* chitinase markedly impairs parasite invasion of mosquito midgut. *Infect Immun.* 69(6):4048-4054.

U

Urano K., Yoshida Y., Nanjo T., Ito T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2004) Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313(2):369-375.

V

Van Huffel C., Dubois E., Messenguy F. (1994) Cloning and sequencing of *Schizosaccharomyces pombe* car1 gene encoding arginase. Expression of the arginine anabolic and catabolic genes in response to arginine and related metabolites. *Yeast.* 10(7):923-933.

Vickerman K., Cox F.E.G. (1967). The Protozoan. Murray.

Vincendeau P., Gobert A.P., Daulouede S., Moynet D., Mossalayi M.D. (2003) Arginases in parasitic diseases. Trends. Parasitol. 19(1):9-12.

W

Wagner C., Russwurm M., Jager R., Friebe A., Koesling D. (2005) Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. J. Biol. Chem. 280(18):17687-17693.

Walliker D., Hunt P., Babiker H. (2005) Fitness of drug-resistant malaria parasites. Acta. Trop. 94(3):251-259. Review.

Wang C.C. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35:93-127. Review.

Wang Z., Morris J.C., Drew M.E., Englund P.T. (2000) Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. J. Biol. Chem. 275(51):40174-40179.

Westheide W., Rieger R. (1996) Spezielle Zoologie. Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Wickert H., Wissing F., Andrews K.T., Stich A., Krohne G., Lanzer M. (2003) Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of *P. falciparum*-infected erythrocytes via a complex membrane network. Eur. J. Cell Biol. 82(6):271-284.

Wilce M.C.J, Bond C.S., Dixon N.E., Freeman H.C., Guss J.M., Lilley P.E., Wilce J.A. (1998) Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3472-3477.

Wirtz E., Clayton C. (1995) Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. Science. 268(5214):1179-1183.

Wrenger C., Lüersen K., Krause T., Müller S. and 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. 276:29651-29656

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(11):1713-1718.

Wu G., Morris S.M. Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem. J. 336:1-17

Wu Y., Sifri C.D., Lei H.H., Su X.Z., Wellems T.E. (1995) Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(4):973-977.

Y

Yanagisawa H.; Suzuki Y. (1982) Purification and properties of N-carbamylputrescine amidohydrolase from maize shoots Phytochemistry. 21:2201-2203.

Z

Zabaleta J., McGee D.J., Zea A.H., Hernandez C.P., Rodriguez P.C., Sierra R.A., Correa P., Ochoa A.C. (2004) *Helicobacter pylori* arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). J. Immunol. 173(1):586-593.

Zein S.S., Levene S.D. (2005) Structural aspects of RecA-dependent homologous strand exchange involving human telomeric DNA. Biochemistry. 44(12):4817-4828.

Zuegge J., Ralph S., Schmuker M., McFadden G.I., Schneider G. (2001) Deciphering apicoplast targeting signals-feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins. Gene. 280(1-2):19-26.

Zuniga M., Champomier-Verges M., Zagorec M., Perez-Martinez G. (1998) Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*. J. Bacteriol. 180(16):4154-4159.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Rolf D. Walter, dass ich die Möglichkeit hatte, hier in Hamburg zu promovieren. Auch möchte ich mich für die vielen angeregten Diskussionen und die Nachsicht bezüglich meines „alpinen“ Sprachgebrauchs bedanken.

Prof. Dr. Michael Böttger, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg, danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferates.

Dank auch an Prof. Dr. Abraham I. Louw, Dr. Lyn-Marié Birkholtz und Gordon Wells für die freundliche Aufnahme in Pretoria, Südafrika, und für den Einblick ins Modellieren von Proteinstrukturen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Kollegen Robin Das Gupta, Dr. Zita Krnajski, Dr. Carsten Wrenger, Dr. Kai Lüersen und insbesondere meinem Freund Matthias Schneider, die sich die Mühe gemacht haben, meine Arbeit kritisch durchzulesen sowie für die vielen guten Verbesserungsvorschläge.

Für die Unterstützung im Labor möchte ich mich vor allem bei Christine Langer, Marie-Luise Eschbach und Bärbel Bergmann bedanken.

Meinen Eltern, Dr. Ingrid Müller-Landgraf und Prof. Dr. Otfried M. Müller, danke ich für ihre Unterstützung, Förderung und besonders für ihr Vertrauen in mich.