

Die Vitamin B6-Biosynthese von
Plasmodium falciparum –
Interaktion von *PfPdx1* und *PfPdx2*

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

vorgelegt von

Julia Knöckel

aus Hannover



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT
FÜR TROPENMEDIZIN



Universität Hamburg

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. R. D. WALTER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Frau Professor Dr. S. DOBLER
Tag der Disputation: 04. Mai 2009

Hamburg, den 20. April 2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Ganzhorn".

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	I
1. Einleitung.....	1
1.1 Malaria.....	1
1.1.1 Geschichte der Malaria.....	1
1.1.2 Verbreitung.....	1
1.1.3 Der Erreger der Malaria.....	2
1.1.4 Systematik der Apicomplexa.....	3
1.1.5 Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	4
1.2 Vitamin B6.....	6
1.2.1 Allgemeines.....	6
1.2.2 Funktion.....	8
1.2.3 Vitamin B6-Biosynthese.....	9
1.3 Oxidativer Stress.....	12
1.3.1 Allgemeines.....	12
1.3.2 Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress.....	13
1.3.3 <i>P. falciparum</i> und oxidativer Stress.....	13
1.3.4 Auf oxidativem Stress basierende Malariamedikamente.....	14
1.4 Dephosphorylierung von Molekülen durch Phosphatasen.....	15
1.5 Zielsetzung.....	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Verwendete Geräte.....	18
2.1.2 Bezugsquellen von Chemikalien, Bioreagenzien und Kits.....	19
2.1.3 Bakterien- und Plasmodienstämme, Plasmidvektoren.....	24
2.1.4 Verwendete Medien.....	24

2.1.5 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten.....	25
2.1.6 Bioinformatische Hilfsmittel und verwendete Software.....	30
2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.2 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR).....	31
2.2.3 Site-directed-Mutagenesis-PCR (Mutagenese-PCR).....	32
2.2.4 Overlap Mutagenese-PCR.....	32
2.2.5 Entfernen der Template-DNA aus dem PCR-Ansatz.....	33
2.2.6 Aufreinigung von DNA.....	33
2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989).....	34
2.2.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	34
2.2.9 Restriktionsverdau.....	34
2.2.10 Ligation.....	35
2.2.11 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen durch CaCl ₂	35
2.2.12 Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
2.2.13 Plasmid-Isolation.....	36
2.2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Photometer.....	37
2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop.....	37
2.2.16 Fällung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.17 Isolation von genomischer DNA aus Parasiten.....	38
2.2.18 Isolation von Gesamt-RNA aus <i>P. falciparum</i> (Kyes et al, 2000).....	39
2.2.19 Analyse von RNA mittels Northern-Blot (Kyes et al, 2000).....	39
2.2.20 Herstellung einer radioaktiv markierten Hybridisierungssonde.....	40
2.2.21 Hybridisierung des Northern-Blots mit radioaktiv markierter Sonde.....	40
2.2.22 Strippen der Northern-Blot-Membran.....	40
2.3 Allgemeine biochemische Methoden.....	41
2.3.1 Rekombinante Expression.....	41

2.3.2	Aufschluss der Bakterien zur Proteinaufreinigung.....	41
2.3.3	Proteinaufreinigung über His-Tag.....	41
2.3.4	Proteinaufreinigung über Strep-Tag.....	42
2.3.5	Protein-Mengenbestimmung (Bradford, 1976).....	42
2.3.6	SDS-Gelelektrophorese.....	42
2.3.7	Gelfärbung mit Coomassie.....	43
2.3.8	Western-Blot.....	43
2.3.9	Färbung von Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S.....	44
2.3.10	Strippen von Nitrocellulosemembranen.....	44
2.3.11	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	44
2.3.12	Statische Lichtstreuung (Static Light Scattering, SLS).....	45
2.3.13	Circularer Dichroismus (CD).....	46
2.4	Zellbiologische Methoden.....	46
2.4.1	Herstellung von RPMI 1640-Medium für die <i>P. falciparum</i> Zellkultur.....	46
2.4.2	Kulturführung von <i>P. falciparum</i>	46
2.4.3	Bestimmung der Parasitämie.....	47
2.4.4	Synchronisation der <i>P. falciparum</i> Zellkultur mit Sorbitol.....	47
2.4.5	Isolation der Parasiten mittels Saponin.....	47
2.4.6	Einfrieren der <i>P. falciparum</i> Zellkultur.....	48
2.4.7	Auftauen der <i>P. falciparum</i> Zellkultur.....	48
2.4.8	Transfektion von <i>P. falciparum</i>	49
2.4.8.1	<u>Elektroporation von Erythrozyten</u>	49
2.4.8.2	<u>Elektroporation von Parasiten im Ringstadium</u>	49
2.4.8.3	<u>Cotransfektion von <i>P. falciparum</i></u>	50
2.4.9	Bestimmung des IC ₅₀ über Einbau von radioaktivem Hypoxanthin.....	50
2.4.10	Erstellung von Wachstumskurven.....	51

2.5 Methoden zur Untersuchung des PLP-Synthase-Komplexes von <i>P. falciparum</i>.	51
2.5.1 Test der vollständigen PLP-Synthesereaktion (Müller et al., 2008).....	52
2.5.2 Test der Aktivität von Pdx1 mit Ammoniumchlorid.....	53
2.5.3 Glutaminase-Aktivitätstest (Dong et al., 2004).....	54
2.5.4 Nachweis der Bildung von PLP über <i>Pf</i> ODC.....	55
2.5.5 Mutagenese von <i>Pf</i> Pdx1 und <i>Pf</i> Pdx2.....	56
2.5.6 Klonierung der Konstrukte IBA3- <i>Pf</i> Pdx1His und IBA3- <i>Pf</i> Pdx2His....	58
2.5.7 Coaufreinigung von <i>Pf</i> Pdx1Strep und <i>Pf</i> Pdx2His.....	58
2.5.8 Coaufreinigung von <i>Pf</i> Pdx1 und <i>Pf</i> Pdx2 aus Plasmodienextrakt.....	59
2.6 Überexpression von <i>Pf</i>Pdx1 und <i>Pf</i>Pdx2 in Plasmodien.....	59
2.6.1 Herstellung eines Transfektionsvektors mit Resistenz gegen Blasticidin S.....	59
2.6.2 Klonierung der Überexpressionskonstrukte pARL- <i>Pf</i> Pdx1Strep- WR, pARL- <i>Pf</i> Pdx2Strep-WR, pARL- <i>Pf</i> Pdx2Myc-Bsd und pARL- <i>Pf</i> Pdx2E53YMyC-Bsd.....	60
2.7 Methoden zur Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf die Vitamin B6-Biosynthese von <i>P. falciparum</i>.....	62
2.7.1 Analyse der Transkriptmenge von <i>Pf</i> Pdx1 und <i>Pf</i> Pdx2 mittels Northern-Blot.....	62
2.7.2 Genomweites Screening mittels Microarray-Analyse.....	62
2.7.2.1 Isolation von RNA aus <i>P. falciparum</i> mit dem RNeasy-Kit.....	62
2.7.2.2 Synthese von Amminoallyl-dUTP-markierter cDNA.....	64
2.7.2.3 RNA-Hydrolyse, cDNA-Aufreinigung und Dye- Inkorporation.....	64
2.7.2.4 Prähybridisierung.....	65
2.7.2.5 Hybridisierung.....	65

2.8 Methoden zur Analyse der plasmodialen Paranitrophenylphosphat-Phosphatase (<i>PfPNPase</i>).....	67
2.8.1 Klonierung und Expression der <i>PfPNPase</i>	67
2.8.2 Aktivitätstest der <i>PfPNPase</i> (Motomizu et al, 1983).....	67
2.8.3 Ermittlung der Substratspezifität der <i>PfPNPase</i>	67
2.8.4 Klonierung eines GFP-Fusionskonstruktes.....	68
2.8.5 Lokalisierung mittels GFP-Live Imaging.....	68
3. Ergebnisse.....	69
3.1 Der PLP-Synthase-Komplex von <i>P. falciparum</i>.....	69
3.1.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität von <i>PfPdx1</i> und <i>PfPdx2</i>	69
3.1.2 Nachweis von PLP als Reaktionsprodukt.....	69
3.1.3 Strukturanalyse des plasmodialen PLP-Synthase-Enzyms <i>PfPdx1</i>	70
3.1.4 Mutagenese des aktiven Zentrums und der alternativen Substratbindungsstelle von <i>PfPdx1</i>	72
3.1.5 Coaufreinigung von <i>PfPdx2His</i> mit <i>PfPdx1</i>	74
3.1.6 Analyse der Bindungsstelle zwischen verschiedenen <i>PfPdx1</i> - Molekülen.....	76
3.1.7 Analyse des oligomeren Status von <i>PfPdx1</i> mittels FPLC.....	78
3.1.8 Analyse des oligomeren Status von <i>PfPdx1</i> mittels statischer Lichtstreuung (SLS).....	80
3.1.9 Identifikation möglicher Interaktionspartner von K151.....	83
3.1.10 Einfluss der Flexibilität von K151 auf die Formation des <i>Pdx1</i> - Komplexes.....	86
3.1.11 Bestimmung der Aktivität von <i>PfPdx1G155A</i>	89
3.1.12 Analyse des Substratkanals zwischen <i>PfPdx1</i> und <i>PfPdx2</i>	89

3.2 Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von <i>PfPdx1</i> und <i>PfPdx2</i>	
<i>in vivo</i>	92
3.2.1 Coaufreinigung von <i>PfPdx1</i> Strep und <i>PfPdx2</i> Myc aus Plasmodienextrakt.....	92
3.3 Überexpression von <i>PfPdx1</i> und <i>PfPdx2</i> in <i>P. falciparum</i>.....	93
3.3.1 Die Überexpressionskonstrukte pARL- <i>PfPdx1</i> Strep-WR, pARL- <i>PfPdx2</i> Strep-WR, pARL <i>PfPdx2</i> Myc-Bsd und pARL <i>PfPdx2</i> E53Y Myc-Bsd.....	93
3.3.2 Einfluss der Überexpression von Pdx1 und Pdx2 auf das Wachstum von <i>P. falciparum</i>	97
3.4 Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf das Vitamin B6-Biosynthese-Enzym <i>PfPdx1</i>.....	101
3.4.1 Northern-Blot-Analyse von <i>PfPdx1</i> und <i>PfPdx2</i>	102
3.4.2 Microarray-Analysen zum genomweiten Screening der Gen- regulation von <i>P. falciparum</i> unter Einfluss von Singulett-Sauerstoff- Stress.....	104
3.5 Charakterisierung der plasmodialen Paranitrophenylphosphat- Phosphatase (<i>PfPNPase</i>).....	104
3.5.1 Genomische Struktur.....	105
3.5.2 Funktionsanalyse der <i>PfPNPase</i>	107
3.5.3 Lokalisierung der <i>PfPNPase</i>	110
4. Diskussion.....	112
4.1 Die Vitamin B6-Biosynthese von <i>P. falciparum</i>.....	112
4.1.1 Strukturelle Analyse des PLP-Synthase-Komplexes von <i>P. falciparum</i>	113
4.1.2 Die Bindung zwischen Pdx1-Molekülen.....	114
4.1.3 Das aktive Zentrum von Pdx1.....	114
4.1.4 Interaktionspartner der Aminosäure K151.....	116

4.1.5 Flexibilität von K151 ist entscheidend für die Formation des <i>PfPdx1</i> -Komplexes.....	117
4.1.6 Die Formierung des PLP-Synthase-Komplexes folgt einer definierten Sequenz.....	118
4.1.7 Zwischen <i>PfPdx2</i> und <i>PfPdx1</i> wird ein Substratkanal ausgebildet...	120
4.1.8 Überexpression der Vitamin B6-Biosyntheseenzyme in <i>P. falciparum</i>	120
4.1.9 Regulation der Vitamin B6-Biosynthese als Reaktion auf oxidativen Stress.....	122
4.2 Charakterisierung der plasmodialen Paranitrophenylphosphat- Phosphatase.....	125
5. Zusammenfassung.....	127
6. Literatur.....	129
Danksagung.....	139
Anhang.....	140
Publikationen	

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetrazyklin
APAD	Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circularer Dichroismus
CDC	Center for Disease Control
cDNA	Complementary DNA
DEPC	Diethylpolycarbonat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
gDNA	Gesamt-DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
hDHFR	Humane Dihydrofolatreduktase
HRP	Meerrettichperoxidase
HT-PBS	Human tonicity-phosphate-buffered saline
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration bei 50% Hemmung
kb, kbp	Kilobasen, Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
Ni-NTA	Nickel-Nitriolotriessigsäure
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfPdx1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Pdx1
<i>PfPdx2</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Pdx2
<i>PfPNPase</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Paranitrophenylphosphat-Phosphatase
<i>PfTPK</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Thiaminpyrophosphokinase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PlasmoDB	Plasmodium-Datenbank
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxalphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese
SLS	Statische Lichtstreuung
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Saline-Sodium Citrate
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethyldiamin
<i>Tg</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
(v/v)	(Volumen/Volumen)
(w/v)	(Gewicht/Volumen) (weight/volume)
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Geschichte der Malaria

Die Krankheit Malaria war bereits den Menschen in den ältesten Hochkulturen wie Ägypten, Indien und China bekannt. Ihre typischen Symptome wurden bereits 2.700 v. Chr. im Nei Ching, einer Schrift der chinesischen Medizin, und etwa 2.000 Jahre später, um 400 v. Chr., von Hippokrates beschrieben. Auch wirksame Medikamente, bzw. zur Therapie einsetzbare Pflanzen waren zu dieser Zeit bereits bekannt. Der einjährige Beifuß (*Artemisia annua*), dessen aktive Komponente Artemisinin heute in Form von Kombinationspräparaten als effektives Malariamedikament dient, wurde von chinesischen Ärzten schon im 2. Jahrhundert v. Chr. zur Therapie des Malariafiebers eingesetzt.

Im Jahr 1880 wurde von dem Mediziner Charles Louis Alphonse Laveran zum ersten Mal der Erreger der Malaria, *Plasmodium*, in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) entdeckt. Den Zusammenhang zum Überträger, den Mücken der Gattung *Anopheles*, stellte 1897 der britische Arzt Ronald Ross her (CDC, 2005).

1.1.2 Verbreitung

Zurzeit werden 109 Länder als Malaria-endemisch eingestuft. Sie erstrecken sich entlang des Äquators in tropischen und subtropischen Gebieten (siehe Abb. 1.1, blau dargestellte Bereiche). Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung lebt in Ländern mit Übertragungsrisiko für Malaria, ein Fünftel in Bereichen mit hoher Übertragungswahrscheinlichkeit.

Im Jahr 2006 traten weltweit 250 Millionen Malaria-Erkrankungen auf, 82% davon in Afrika südlich der Sahara. 900.000 der Malariafälle hatten einen tödlichen Verlauf, 85% waren Kinder unter 5 Jahren (World Malaria Report 2008, WHO).

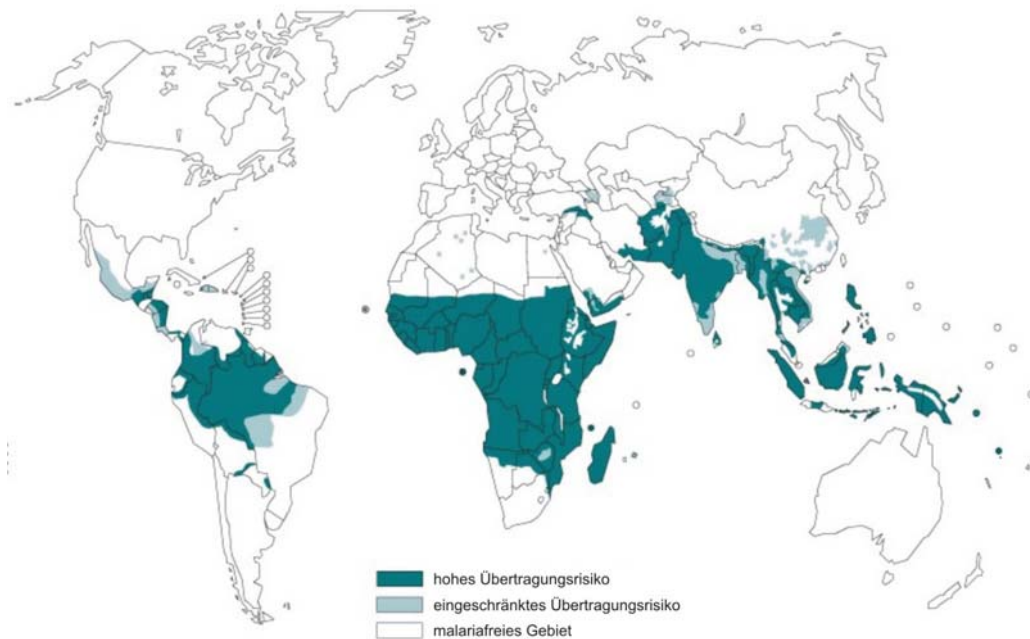


Abb. 1.1: Verbreitung der Malaria (WHO, 2007). Dunkelblaue Bereiche zeigen Gebiete mit hohem, hellblaue Bereiche Gebiete mit eingeschränktem Übertragungsrisiko. Die weiß dargestellten Bereiche gelten als malariafrei.

1.1.3 Der Erreger der Malaria

Erreger der Malaria sind Parasiten der Gattung *Plasmodium*. Diese umfasst über 170 Arten, die Reptilien, Vögel und Säugetiere befallen können, wobei vier *Plasmodium*-Arten, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* als humanpathogen beschrieben sind (Mehlhorn und Piekarski, 2002). Jedoch zeigen aktuelle Forschungsergebnisse, dass auch *P. knowlesi*, bislang als Erreger von Malaria bei Affen beschrieben, Menschen infizieren kann (Cox-Singh et al., 2008; Pain et al., 2008; White, 2008).

P. vivax und *P. ovale* verursachen die Malaria tertiana, bei der die auftretenden Fieberschübe in einem Rhythmus von 48 h wiederkehren. Die Parasitämie im Blut steigt dabei selten über 2%. Beide Arten sind im Unterschied zu den beiden Folgenden in der Lage, Ruhestadien in der Leber (sog. Hypnozoiten) zu bilden, die auch nach monate- bis jahrelangen symptomlosen Intervallen noch zu neuen Malariaschüben führen können.

Weniger häufig tritt die Malaria quartana auf, die durch eine Infektion mit *P. malariae* ausgelöst wird. Charakteristisch ist dabei eine Periodizität der Fieberschübe von 72 h. Die Parasitämie ist mit unter 1% auch hier sehr niedrig (Mehlhorn und Piekarski, 2002). Aktuelle Forschungen zeigten, dass bislang als *P. malariae*-Infektionen diagnostizierte, tödlich verlaufende Malariafälle häufig durch *P. knowlesi* verursacht wurden (Cox-Singh et al., 2008).

Die gefährlichste Form der Malaria ist die Malaria tropica. Sie wird durch *P. falciparum* hervorgerufen und weist eine hohe Letalitätsrate auf. Aufgrund der mit bis zu 20% sehr hohen Parasitämie nimmt die Infektion einen raschen und gravierenden Verlauf, der durch kurze, aber unregelmäßig auftretende Fieberschübe gekennzeichnet ist. Die Ursache für die hohe Letalität der Krankheit liegt in der Fähigkeit des Parasiten, seine Wirtszelle so zu verändern, dass diese sich an andere Erythrozyten und Endothelzellen anlagern kann. Durch Einlagerung parasitenspezifischer Proteine in die Wirtszellmembran kommt es zur Bildung so genannter „knobs“. Diese Erhebungen in der Erythrozytenoberfläche sowie die dadurch verursachte Versteifung des Cytoskeletts führen zu einer verringerten Flexibilität der Zellen, die in Verbindung mit zusätzlich außen auf der Membran aufgelagerten Substanzen (z.B. Adhäsine) zum Verklumpen der roten Blutkörperchen (Rosettenbildung) und zur Adhäsion an die Endothelien der Blutgefäße führt. Die daraus resultierenden Durchblutungsstörungen können zu schweren Schädigungen des Gehirns und anderen Organen führen. Die beschriebene zerebrale Form der Malaria ist nur schwer behandelbar und endet meist mit dem Tod des Patienten (CDC, 2005).

1.1.4 Systematik der Apicomplexa

Plasmodien sind parasitische Protozoen, die gemeinsam mit weiteren humanpathogenen obligaten Endoparasiten wie *Toxoplasma gondii* (Erreger der Toxoplasmose), *Cryptosporidium parvum* (Erreger der Cryptosporidiose) und Babesien (Erreger der Babesiose) zum Stamm der Apicomplexa gehören (Belli et al.,

2005). Die systematische Einordnung der Gattung *Plasmodium* ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

Stamm: Apicomplexa (ehem. Sporozoa)

Klasse: Haematozoa

Ordnung: Haemosporida

Familie: Plasmodiidae

Gattung: *Plasmodium*

Abb. 1.2: Systematische Einordnung der Gattung *Plasmodium* (Lucius, 1997)

Namensgebend für den Stamm der Apicomplexa ist eine spezielle, apikal gelegene Zellstruktur, der Apikalkomplex. Er besteht aus Conoid, Rhoptrien, Mikronemen und weiteren Organellen und beinhaltet unter anderem Proteine, die zur Invasion des Parasiten in die Wirtszelle benötigt werden.

1.1.5 Der Lebenszyklus von *P. falciparum*

Der Endwirt der humanpathogenen *Plasmodium*-Arten sind Mücken der Gattung *Anopheles*. Während der Blutmahlzeit einer weiblichen Mücke gelangen mit dem Speichel des Tieres etwa 8-15 Sporozoiten in die Blutbahn oder die Lymphe des Menschen, der als Zwischenwirt fungiert (siehe Abb. 1.3, (1)). Innerhalb kurzer Zeit gelangen die Sporozoiten in die Leber, wo sie Hepatozyten befallen. Hier kommt es zu einer ersten Vielteilung der Zellen, der sogenannten exoerythrozytären Schizogonie. Beim Eindringen in das Leberparenchym wird der Parasit von der Wirtszellmembran umschlossen und es entsteht eine parasitophore Vakuole. In dieser entwickeln sich innerhalb von 6 Tagen bis zu 30.000 Merozoiten (siehe Abb. 1.3, A (2)-(4)). Zum Ende dieser Phase induziert der Parasit den Tod seiner Wirtszelle und parasitengefüllte Vesikel (Merosomen) werden in die Blutbahn abgegeben (Sturm et al., 2006). Nach Freisetzung der Parasiten befallen diese die

Erythrozyten. Innerhalb von 48 h wächst der Parasit dort wiederum in einer parasitophoren Vakuole vom Ringstadium über den jungen und alten Trophozoiten zum Schizonten heran (siehe Abb. 1.3, B (5)-(6)). Aus dieser erythrozytären Schizogonie gehen Merozoiten hervor, die wieder neue Erythrozyten befallen. Bei der enzymatischen Lyse der Erythrozyten werden Merozoitenantigene und Abbauprodukte des Parasiten freigesetzt, wodurch die für die Malaria typischen Fieberschübe ausgelöst werden.

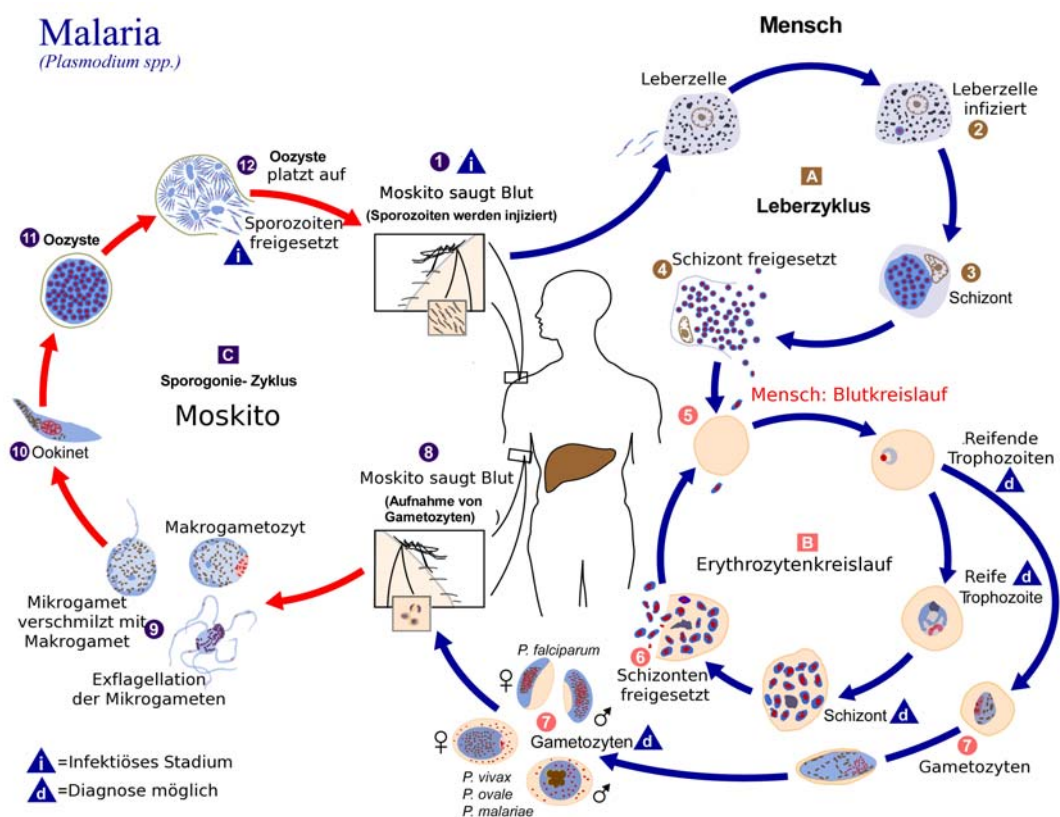


Abb. 1.3: Lebenszyklus der humanpathogenen Plasmodiumarten: Im Menschen, der den Zwischenwirt darstellt, erfolgen exoerythrozytäre (A) und erythrozytäre Schizogonie (B), Gamogonie und Sporogonie finden im Endwirt, der *Anopheles*-Mücke, statt (C). (Quelle: CDC)

Nach wenigen Schizogoniegenerationen entwickeln sich einige Merozoiten zu weiblichen und männlichen Gametozyten (Gamonten), die während einer Blutmahlzeit in den Darm einer Mücke gelangen (siehe Abb. 1.3, B (7)-(8)). Dort

entstehen aus dem weiblichen Makrogamont ein Makrogamet und aus dem männlichen Mikrogamont mehrere Mikrogameten, die den Makrogameten befruchten. Der so entstandene bewegliche Ookinet (Zygote) wandert durch die Mitteldarmwand und nistet sich zwischen Basalmembran und Epithelschicht ein. Dort kommt es zur Meiose und der Zellkern wird durch Endomitosen polyploid. Da dieser Vorgang in einer von den Wirtszellen abgeschiedenen Schicht abläuft, spricht man hier auch von der Oozyste, in der dann durch Sporogonie tausende Sporoziten entstehen (Mehlhorn und Piekarski, 2002). Über die Hämolymphe gelangen die Sporoziten in die Speicheldrüsen der Mücke, von wo aus sie wieder auf einen neuen Wirt übertragen werden können (siehe Abb. 1.3, C (9)-(12)).

1.2 Vitamin B6

1.2.1 Allgemeines

Zur Gruppe der B-Vitamine zählen die Vitamine B1 (Thiamin), B2 (Riboflavin), B6 (Pyridoxin) und B12 (Cobalamin) sowie Biotin, Folsäure, Nicotinsäure und Pantothersäure. Alle B-Vitamine sind wasserlöslich.

Unter dem Begriff Vitamin B6 werden die drei Derivate des 5-Hydroxymethyl-3-Pyridinols zusammengefasst. Sie unterscheiden sich in den Substituenten an der 4-Position des Moleküls. Diese ist an der Coenzymfunktion beteiligt und kann entweder aus einem Alkoholrest (Pyridoxol, Pyridoxin), einem Amin (Pyridoxamin) oder einem Aldehyd (Pyridoxal) bestehen. Die Strukturen der verschiedenen Vitamin B6-Moleküle sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

Die aktive Form des Vitamin B6 ist Pyridoxal-5-Phosphat (PLP), das als Coenzym an über 100 enzymatischen Reaktionen beteiligt ist (Percudani und Peracchi, 2003). Es wird zum Beispiel für den Abbau von Glykogen sowie zur Synthese von Δ -Aminolävulinsäure, einem Zwischenprodukt der Hämsynthese benötigt. Auch in der Polyaminsynthese spielt PLP eine entscheidende Rolle, da es der essentielle Cofaktor der Ornithin-Decarboxylase ist.

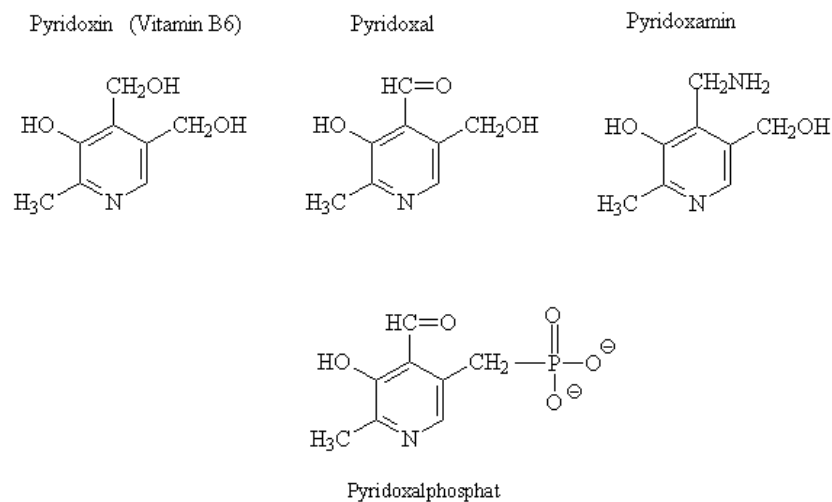


Abb. 1.4: Verschiedene Formen des Vitamin B6: Unterschiede liegen in den Substituenten an der 4-Position. (Quelle: www.uic.edu/.../PKU%Cases/vitb6.gif)

Vitamin B6 kommt in allen drei genannten, sowie den jeweils phosphorylierten Formen in der Nahrung vor und muss vom Menschen über diesen Weg aufgenommen werden. Besonders reich an Vitamin B6 sind Geflügel, Fisch, Leber, Schweinefleisch, Eier, Milch und Bäckerhefe. Aber auch ungeschälter Reis, Sojabohnen, Weizen, Erd- und Walnüsse haben einen hohen Vitamin B6-Gehalt. Pyridoxal und Pyridoxamin sind dabei vor allem in tierischen Produkten, Pyridoxin auch in Pflanzen zu finden (Food Standards Agency, 2003).

Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin werden im Dünndarm des Menschen über energieabhängige Transporter aufgenommen. Phosphorylierte Moleküle müssen hierfür zunächst im Dünndarm-Lumen dephosphoryliert werden. Alle drei Formen werden dann in die Leber transportiert, wo sie entweder durch die Pyridoxalkinase oder die Pyridoxinphosphat-Oxidase zu Pyridoxal-5-Phosphat umgebaut werden.

Der Transport von Pyridoxal und Pyridoxalphosphat im Blut erfolgt über die Bindung der Moleküle an Albumin im Blutserum und an Hämoglobin in den Erythrozyten. Um in die Erythrozyten zu gelangen, wird Pyridoxalphosphat durch

eine an der Erythrozytenoberfläche lokalisierte Pyridoxalphosphat-Oxidase dephosphoryliert und gelangt durch passive Diffusion in die Zelle. Dort wird es durch die erythrozytäre PdxK re-phosphoryliert und so in der Zelle gehalten. Durch die Bindung des PLP an das Hämoglobin wird ein Konzentrationsgradient aufgebaut, der die permanente Diffusion von Pyridoxal gewährleistet und zur Akkumulation von PLP in den Erythrozyten führt (Friedrich, 1988).

1.2.2 Funktion

In seiner aktiven Form Pyridoxalphosphat (PLP) ist Vitamin B6 als Cofaktor an vielen enzymatischen Reaktionen beteiligt. Eine wichtige Rolle spielt es zum Beispiel beim Abbau von Aminosäuren, da es als Coenzym aller Aminotransferasen und vieler weiterer Enzyme wirkt, die die Umwandlung von Aminosäuren katalysieren. PLP bildet dabei Schiff-Basen, die eine Übertragung von α -Aminogruppen zwischen Aminosäuren und Ketosäuren ermöglichen. Die α -Aminogruppen reduzieren α -Ketoglutarat und das entstandene Glutamat wird durch die Glutamat-Dehydrogenase desaminiert und in α -Ketoglutarat und NH_4^+ gespalten. Das NH_4^+ wird über den Harnstoffzyklus entgiftet und ausgeschieden, das α -Ketoglutarat an den Citratzyklus weitergeleitet, in dem es ein Zwischenprodukt ist und weiter metabolisiert werden kann.

PLP-abhängige Enzyme sind neben Transaminierungsreaktionen auch an Decarboxylierungen, Desaminierungen, Racemisierungen und Aldol-Abspaltungen sowie Eliminierungs- und Austauschreaktionen beteiligt. Auch für die phosphorylytische Spaltung von Glykogen ist es von essentieller Bedeutung. Hier wirkt es als Cofaktor der Glykogen-Phosphorylase, die Glykogen zu Glucose-1-Phosphat-Molekülen abbaut.

Einige Merkmale sind allen durch PLP katalysierten Reaktionen gemein: zum einen wird zwischen der Aldehydgruppe des PLP und der Aminosäure eine Schiff-Base gebildet. Den Ablauf der Reaktion zeigt Abbildung 1.5. Des Weiteren wirkt PLP als elektrophiler Katalysator und dient in seiner protonierten Form als Elektronenfalle,

wodurch negativ geladene Zwischenprodukte der Reaktion stabilisiert werden. Die Elektronen werden hierfür in den Pyridinring übertragen und gleichen dort die positive Ladung des Stickstoffatoms aus. Mit der Spaltung der Schiff-Base ist die Reaktion abgeschlossen.

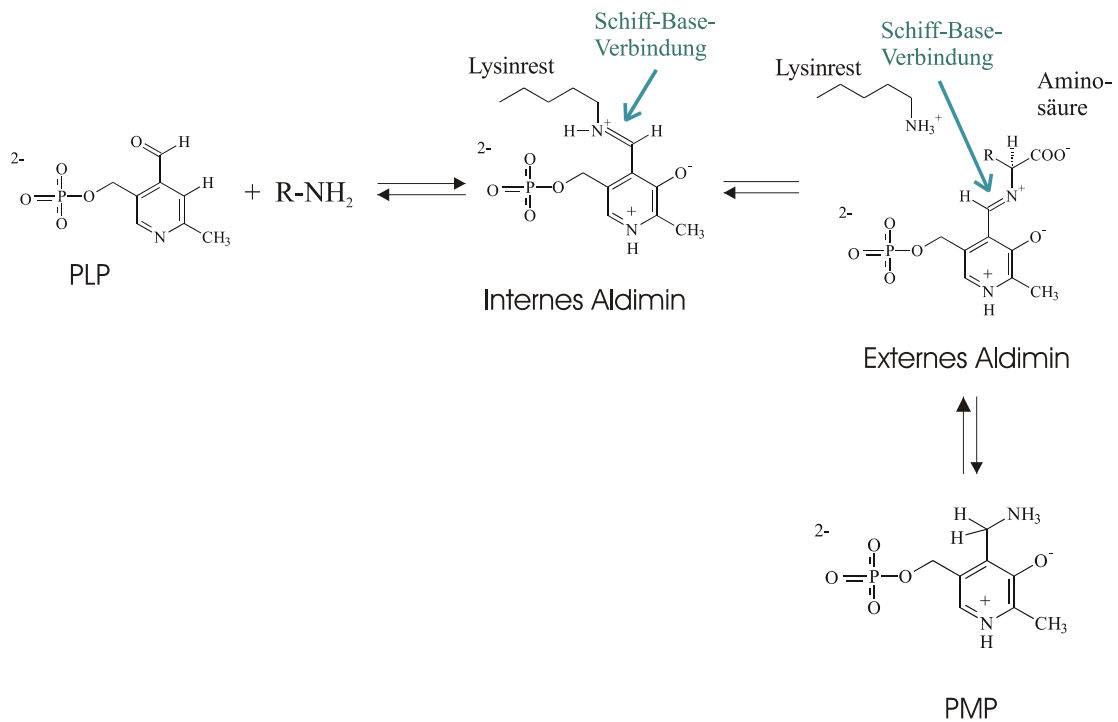


Abb. 1.5: Schema der Bildung einer Schiff-Base: Zwischen PLP und einem spezifischen Lysinrest des Enzyms kommt es zur Ausbildung einer Schiff-Base (internes Aldimin). Bei hinzukommen einer Aminosäure wird die Schiff-Base zwischen PLP und Aminosäure gebildet (externes Aldimin) und ihre Aminogruppe auf das PLP übertragen, wodurch PMP (Pyridoxaminphosphat) entsteht. Der zweite Teil der Reaktion stellt eine Umkehr der beschriebenen Reaktion dar, die in der Regeneration des PLP-Enzym-Komplexes resultiert (Berg et al., 2003).

1.2.3 Vitamin B6-Biosynthese

Im Gegensatz zum Menschen, der Vitamin B6 über die Nahrung aufnehmen muss, gibt es Organismen, die über eine Vitamin B6 *de novo*-Synthese verfügen. Bekannt sind zwei verschiedene Biosynthese-Wege, zum einen der DOXP- (1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat) abhängige, oder „*E. coli*-like“ Pathway, zum anderen der

DOXP-unabhängige, oder „Fungi-like“ Pathway (Begley et al., 1999; Ehrenshaft und Daub, 2001).

Im DOXP-abhängigen Weg, der zuerst für *E. coli* beschrieben wurde, wird durch die Enzyme PdxA und PdxJ aus 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) und 4-Phosphohydroxyl-L-Threonin Vitamin B6 in Form von Pyridoxalphosphat synthetisiert (Yang et al., 1998; Wetzel et al., 2004). Dieses wird durch die Pyridoxalphosphat-Oxidase PdxH zu Pyridoxalphosphat umgewandelt und so aktiviert.

Der zweite Biosyntheseweg, der DOXP-unabhängig ist, wurde zunächst für den pflanzenpathogenen Pilz *Cercospora nicotinae* beschrieben und später auch in weiteren Pilzen wie *Aspergillus nidulans* und *Saccharomyces cerevisiae*, der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, Bakterien wie *Bacillus subtilis* und *Thermotoga maritima* sowie den apicomplexen Parasiten *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* identifiziert (Ehrenshaft et al., 1999a; Osmani et al., 1999; Raschle et al., 2005; Wrenger et al., 2005; Zein et al., 2006; Knöckel et al., 2007). Eine schematische Darstellung der PLP-Synthese-Wege bei *P. falciparum* findet sich in Abbildung 1.6.

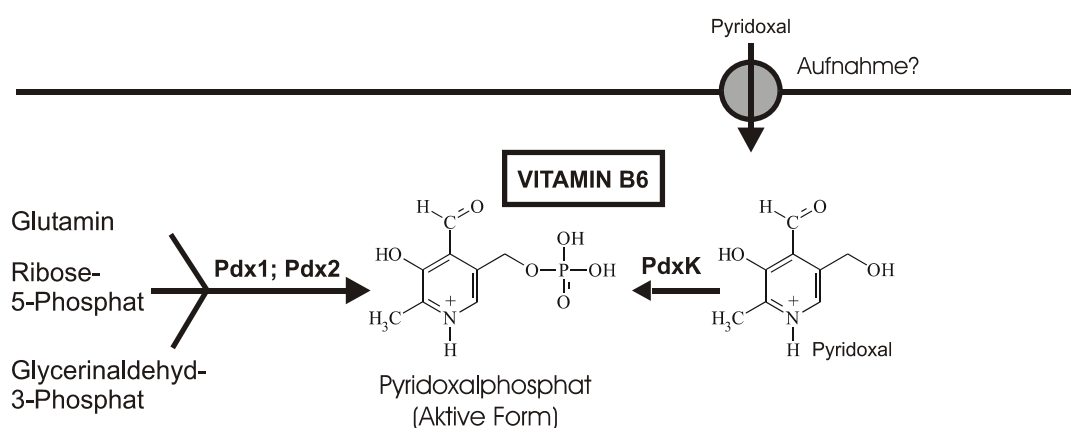


Abb. 1.6: Vitamin B6-Biosynthese bei *P. falciparum*. Der Enzymkomplex Pdx1/Pdx2 synthetisiert aus Glutamin, Ribose-5-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat PLP. Außerdem kann Pyridoxal durch das Enzym PdxK phosphoryliert und so ebenfalls in die aktive Form PLP überführt werden (Quelle: (Wrenger et al., 2008)).

An der Synthese von Vitamin B6 sind im DOXP-unabhängigen Weg zwei Enzyme, Pdx1 und Pdx2, beteiligt. Homolog dazu sind bei *S. cerevisiae* die Proteine Snz1-p und Sno1-p sowie YaaD und YaaE bei *B. subtilis* und *T. maritima* (Hohmann und Meacock, 1998; Raschle et al., 2005; Zein et al., 2006).

Kristallstrukturen der PLP-Synthase-Komplexe von *B. subtilis* und *T. maritima* zeigen, dass diese aus je zwölf Pdx1-Molekülen bestehen, an die zwölf Pdx2-Moleküle gebunden sind (Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006). Die Enzyme synthetisieren aus Glutamin, Ribose-5-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat direkt den aktiven Cofaktor Pyridoxalphosphat (PLP). Der Ablauf der Vitamin B6-Biosynthese ist in Abbildung 1.7 gezeigt.

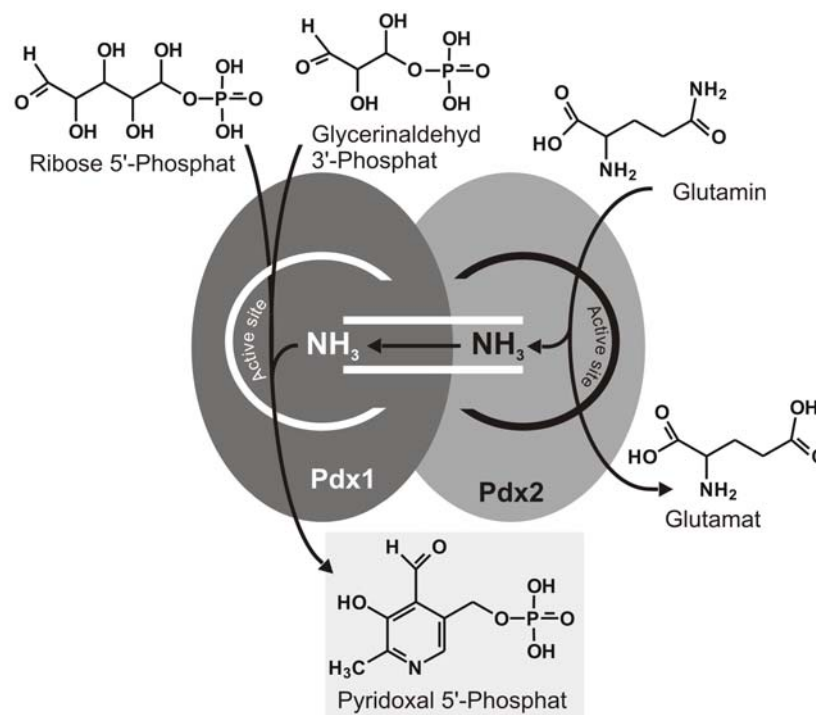


Abb. 1.7: Schema der PLP-Biosynthese. Das Enzym Pdx2 spaltet Glutamin zu Glutamat und einem Ammoniumion. Dieses wird an das Pdx1-Enzym weitergeleitet, das aus Ribose-5-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Ammonium PLP synthetisiert.

Das Enzym Pdx2 hat dabei die Funktion einer Glutaminase (Chaparian und Evans, 1991; Kondo et al., 2004), die Glutamin zu Glutamat und einem Ammoniumion spaltet. Dieses wird durch einen Substratkanal an das Pdx1-Enzym weitergeleitet (Bauer et al., 2004). Pdx1 wirkt als PLP-Synthase und stellt aus den Substraten Ribose-5-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat sowie dem von Pdx2 gelieferten Ammoniumion Pyridoxalphosphat her. Als alternative Substrate können auch Ribulose-5-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat verwendet werden (Burns et al., 2005).

1.3 Oxidativer Stress

1.3.1 Allgemeines

Oxidativer Stress wird durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) ausgelöst. Zu ihnen gehören Peroxide und freie Radikale, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) und Superoxid (O_2^-), sowie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$).

ROS treten zum einen als Nebenprodukte des Stoffwechsels, zum Beispiel in der Atmungskette auf, zum anderen kommt ihnen eine wichtige Funktion als Signalüberträger zu. So sind ROS unter anderem im Gehirn für die synaptische Plastizität und die Gedächtnisbildung von Bedeutung (Kishida und Klann, 2007). Bei der Immunabwehr werden von den Immunzellen reaktive Sauerstoffspezies produziert, um Pathogene abzuwehren und zu töten (Guzik et al., 2003).

Durch äußere Einflüsse kann es zu einem Anstieg der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies und damit zu oxidativem Stress kommen, der zu massiven Schädigungen der Zellen führen kann. Diese sind Beschädigungen der DNA, Oxidation von Fettsäuren in Lipiden und Aminosäuren in Proteinen, sowie die Inaktivierung von Enzymen durch die Oxidation ihrer Cofaktoren. Viele Krankheiten, wie Parkinson, Alzheimer, Diabetes und cardiovaskuläre Störungen, sowie der natürliche Alterungsprozess werden mit oxidativem Stress in Verbindung

gebracht (Squier, 2001; Pratico, 2008; Rattan, 2008; Zhou et al., 2008; Bashan et al., 2009).

1.3.2 Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress

Unter normalen Umständen kann sich die Zelle mit Hilfe verschiedener Enzyme, wie der Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Glutathion-Peroxidase und Peroxi-redoxin gegen ROS schützen. Auch molekulare Antioxidantien wie Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (Tocopherol), Harnsäure und Glutathion spielen eine wichtige Rolle für den Schutz der Zelle vor Schäden durch oxidativen Stress. Auch für Vitamin B6 (Pyridoxin) wurde ein hohes antioxidatives Potential gezeigt, das gleichwertig mit dem der Vitamine C und E ist (Ehrenshaft et al., 1999a; Stocker et al., 2003).

1.3.3 *P. falciparum* und oxidativer Stress

Plasmodien sind, bedingt durch ihre hohe Vermehrungsrate und die daraus resultierende hohe Stoffwechselaktivität, permanent oxidativem Stress ausgesetzt (Becker et al., 2003b). Die größte Quelle für oxidativen Stress ist dabei der Abbau des Wirtszell-Hämoglobins, das dem Parasiten als Hauptquelle für Aminosäuren dient. Bei der Degradation von Hämoglobin in der Nahrungsvakuole entstehen das toxische Häm (Ferri/ferroprotoporphyrin IX) und reaktive Sauerstoffspezies, die zusätzlich zu den im „normalen“ Metabolismus anfallenden redoxreaktiven Nebenprodukten vom Parasiten entgiftet werden müssen (Papalexis et al., 2001). Das Häm wird zum größten Teil in eine kristalline Form, das nicht toxische Hämozoin (Malaria-Pigment) umgewandelt (Slater und Cerami, 1992; Egan, 2002). Es kann außerdem degradiert werden (Zhang et al, 1992, Loria et al, 1999) oder durch Reaktion mit Glutathion (Ginsburg et al., 1998) oder Bindung an Haem-bindende Proteine wie die histidinreichen Proteine HRP2 und HRP3 (Wellems und Howard, 1986; Panton et al., 1989) entgiftet werden (Harwaldt et al., 2002; Campanale et al., 2003). Es kommt jedoch trotzdem zu Schädigungen von Enzymen

und Membranen durch ROS, die zur Lyse der Erythrozyten führen können (Papalexis et al., 2001).

Neben diesem durch seine eigene Stoffwechselaktivität bedingten oxidativen Stress ist der Parasit außerdem noch der Immunabwehr des Wirtes ausgesetzt, dessen Immunzellen zur Pathogenabwehr ebenfalls ROS produzieren.

Um sein Redoxgleichgewicht aufrecht zu erhalten und ROS zu entgiften, verfügt *P. falciparum* zum einen über niedermolekulare Antioxidantien wie Glutathion, Vitamin C und Vitamin E, zum anderen besitzt der Parasit verschiedene Enzyme wie Glutathion- und Thioredoxin-abhängige Proteine (Müller et al., 2001; Becker et al., 2003b; Rahlfs et al., 2003; Nickel et al., 2006), sowie zwei Superoxid-Dismutasen (Dive et al., 2003; Sienkiewicz et al., 2004). Zusätzlich konnte ein für Plasmodien spezifisches Enzym, Plasmoredoxin, identifiziert werden, welches zum Thioredoxinsystem gezählt wird (Becker et al., 2003a). Allerdings wurden bislang weder eine klassische Katalase, noch eine Glutathion-Peroxidase im Genom von *P. falciparum* nachgewiesen (Sztajer et al., 2001).

1.3.4 Auf oxidativem Stress basierende Malariamedikamente

Die Wirkung einiger zur Zeit eingesetzter Malariamedikamente beruht, wenn auch nur zum Teil, auf der Erhöhung des oxidativen Stresses in den infizierten Erythrozyten. Zum Beispiel wirkt Chloroquin, indem es die Detoxifizierung des Haems in der Nahrungsvakuole des Parasiten verhindert. Seine Wirkung kann durch die Verminderung des GSH-Spiegels im Parasiten und der resultierenden schlechteren Reaktionsfähigkeit auf oxidativen Stress, verstärkt werden (Deharo et al., 2003).

Auch der Redoxzyklus von 8-Aminoquinolinen wie Primaquin erhöht die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies im Erythrozyten. Die daraus folgende Verringerung der GSH- und NADPH-Spiegel der Zelle vermindert die Fähigkeit des Parasiten zur Entgiftung von ROS.

Der Wirkmechanismus des Endoperoxids Artemisinin wird ebenfalls mit dem Einfluss auf das Redoxgleichgewicht des Parasiten in Verbindung gebracht. Es reagiert mit der GSH und führt zu vermehrter Lipid-Peroxidation (Sibmooh et al., 2000). Reaktive Sauerstoffspezies spielen hier eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit des Medikamentes. Die Substanzen greifen mit großer Wahrscheinlichkeit gezielt Enzyme oder Membranproteine durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies an und schädigen dadurch die Zellen (Becker et al., 2003b).

1.4 Dephosphorylierung von Molekülen durch Phosphatasen

Die Regulation des Gleichgewichts zwischen phosphorylierten und dephosphorylierten Formen von Molekülen spielt im Stoffwechsel eine wichtige Rolle. So dienen Phosphorylierungsreaktionen häufig zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden. Die Regulation dieser Kaskaden wird durch Protein-Phosphatasen übernommen, welche die beteiligten Kinasen dephosphorylieren und sie dadurch inaktivieren (Alberts et al., 2004).

Auch bei der Aufnahme von Nährstoffen und der Aktivierung von Cofaktoren, wie z. B. Vitamin B₆, kommt den Phosphorylierungsreaktionen eine wichtige Funktion zu. Viele Moleküle, die in die Zelle aufgenommen werden, werden phosphoryliert, und damit in der Zelle gehalten, oder sie werden, wie bei der Phosphorylierung von Pyridoxal (PL) zu Pyridoxalphosphat (PLP), auf diese Weise aktiviert. Zur Regulation des Gleichgewichts zwischen aktivierten und inaktiven Molekülen dient eine zweite Gruppe von Phosphatasen. Diese können kleine Moleküle, wie Nukleotide, Zucker, Lipide oder Cofaktoren dephosphorylieren (Berg et al., 2003; Alberts et al., 2004).

Bezogen auf Vitamin B₆ ist z. B. von Erythrozyten, die den Transport und die Versorgung des Gewebes mit Vitamin B₆ gewährleisten, bekannt, dass diese ihre PL-PLP-Homöostase und die Abgabe an die umliegenden Zellen über eine

Pyridoxalkinase (PdxK) zur Phosphorylierung und eine Pyridoxalphosphat-Phosphatase zur Dephosphorylierung von PLP regulieren (Fonda, 1992; Gao und Fonda, 1994).

Bei *P. falciparum* konnte zur Deckung des Bedarfs an aktivem Vitamin B6 sowohl eine PLP-*de novo* Synthese unter Beteiligung der Enzyme *PfPdx1* und *PfPdx2*, als auch eine Pyridoxalkinase (*Pf PdxK*) identifiziert werden, die Pyridoxal zu PLP phosphoryliert (Wrenger et al., 2005; Müller et al., 2009). Ein Enzym, welches die Dephosphorylierung von PLP katalysiert, wurde bislang jedoch nicht beschrieben.

1.5 Zielsetzung

Malaria ist eine der bedeutendsten Tropenkrankheiten und stellt in vielen Entwicklungsländern ein großes Problem dar. Die zunehmende Resistenz der Malariaerreger - Parasiten der Gattung *Plasmodium* - gegen die verfügbaren Medikamente macht es nötig, nach neuen Angriffspunkten für parasitenspezifische Chemotherapeutika zu suchen. Einen solchen Angriffspunkt stellt die Vitamin B6-Biosynthese von *P. falciparum* dar, da der Mensch Vitamin B6 nicht selbst synthetisieren kann und auf die Aufnahme aus der Nahrung angewiesen ist.

Durch Strukturanalysen der PLP-Synthase-Komplexe von *B. subtilis* und *T. maritima* ist bekannt, dass diese aus zwölf Pdx1-Molekülen bestehen, die zwei hexamere Ringe bilden, die sich zusammenlagern. An jedes Pdx1-Molekül bindet ein Pdx2-Molekül (Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Zusammenlagerung des Pdx1-Pdx2-Enzymkomplexes von *P. falciparum* analysiert werden. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf das *Pf Pdx1*-Enzym gelegt, das die Kernstruktur des Gesamtzymkomplexes darstellt. Durch Site-directed-mutagenesis-PCR sollten verschiedene Aminosäuren in *Pf Pdx1* mutiert werden. Die Proteine sollten rekombinant exprimiert und die Aktivität von *Pf Pdx1* und *Pf Pdx2* in verschiedenen

Aktivitätstests bestimmt werden. Über Coaufreinigungsexperimente sollte der Einfluss der Mutationen auf die Bindungsfähigkeit von *Pf* Pdx2 an *Pf* Pdx1 untersucht werden. Static light scattering (SLS)-Analysen sollten außerdem Auskunft über den oligomeren Status der mutierten *Pf*Pdx1-Enzyme geben.

Für *B. subtilis* wurde beschrieben, dass die von Pdx2 produzierten Ammoniumionen über einen Substratkanal an das Pdx1-Enzym weitergeleitet werden (Bauer et al). Die homologen Aminosäuren im *P. falciparum* Pdx2 sollten gegen Aminosäuren mit größeren Seitenketten ausgetauscht und der Einfluss der Mutationen auf Enzymaktivität und Bindungsfähigkeit der Enzyme analysiert werden.

Zur Untersuchung der Vitamin B6-Biosynthese *in vivo* sollten verschiedene Überexpressionskonstrukte für *Pf* Pdx1 und *Pf* Pdx2 kloniert und in Plasmodien transfiziert werden. Der Einfluss der Überexpression der Enzyme sollte über die Analyse des Wachstums der Zellen bestimmt werden.

Eine weitere Fragestellung, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet werden sollte, war die Bedeutung der Vitamin B6 *de novo*-Biosynthese für *P. falciparum*. Bei Pilzen und Pflanzen wurde ein Zusammenhang der PLP-Synthese mit oxidativem Stress beschrieben (Ehrenshaft et al., 1998). Es sollte daher untersucht werden, ob die Vitamin B6-Biosyntheseenzyme *Pf* Pdx1 und *Pf* Pdx2 bei *P. falciparum* stressregulierbar sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

<u>Axon Instruments</u>	GenePix 4000B-Microarrayscanner
<u>Biometra</u>	Thermocycler UNO II, Hybridisierungsofen OV1
<u>Branson</u>	Sonifier 250
<u>Eppendorf</u>	Centrifuge 5424
<u>EquiBio</u>	EasyjecT GenePulser
<u>GFL</u>	Schüttelwasserbad GFL 1092, Brutschrank GFL 3033
<u>Heraeus</u>	Megafuge 1.0R
<u>Inotech</u>	IH 110 Cell Harvester
<u>Jasco</u>	J810-CD-Spektropolarimeter
<u>Sorvall</u>	Zentrifuge Sorvall Evolution RC
<u>Stratagene</u>	UV-Stratalinker 1800
<u>Uvicon</u>	Spektrophotometer 932
<u>Wallac</u>	Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter 1450 MicroBeta
<u>Wyatt Technologies</u>	Mini-Dawn Tristar
<u>Zeiss</u>	Axioskop 20, Axioskop 2 plus

2.1.2 Bezugsquellen von Chemikalien, Bioreagenzien und Kits

Ambion

Microcon Ultracel YM-3-Säulen zur Konzentration von Proteinen

AppliChem

RPMI 1640-Medium

Becton Dickinson

Agar-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Yeast-Extract

Biochrom

TPP Zellkultur Flaschen 150 cm²

Biomol

Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Lysozym, Rinder-serumalbumin Fraktion V (BSA)

Biorad

Filterpapier extra dick, Gel Filtration Standard, Elektroporationsküvetten (GenePulser Cuvette 0,2 cm), Precision Plus Protein Standards Dual Color

Eurogentec

Agarose, Kaninchen-Anti-*Pf*TPK-Serum, Ratte-Anti-*Pf*Pdx1-Serum

Fermentas

Generuler 1 kb DNA-Standard, High Fidelity PCR Enzym-Mix, 6x Loading Dye, TopVision LM GQ Agarose

FLUKA

Blasticidin S-Hydrochlorid

Fotochemische Werke Berlin

Medizinischer Röntgenfilm, blauempfindlich

GE Healthcare

Cy 3-Dye, Cy 5-Dye, Illustra Microspin-S-200 HR-Säulen

GERBU

Dextransulfat 500.000-Dinatriumsalz

GIBCO

Albumax II

Hartmann Analytik

[Alpha-³²P]-dATP, [8-³H]-Hypoxanthin, L-[1-¹⁴C]-Ornithin-Hydrochlorid

Institut für Bioanalytik (IBA)

Anhydrotetrazyklin (AHT), D-Desthiobiotin-Lösung (10x Puffer E), Strep-Tactin
Sepharose, Strep-tag II spezifischer, monoklonaler Antikörper

Invitrogen

Hoechst 33342, Maus-Anti-c-Myc Antikörper, PCR-Supremix, Precast-Gelkassetten
1,0 mm, PureLink PCR Purification Kit, PureLink Quick Plasmid Miniprep-Kit,
PureLink Quick Gel Extraction Kit, RNase A, Superscript Reverse Transkriptase,
Trizol, Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L) HRP-Konjugat

Jackson Immuno Research

Peroxidase-konjugiertes AffiniPure Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiertes AffiniPure Ziege-Anti-Ratte IgG,

Macherey-Nagel

Chromabond-Leersäulen, Nucleospin Extract II-Kit

Merck

Ammoniumchlorid, Ammoniumpersulfat (APS), β -Mercaptoethanol, Borat, Calciumchlorid-Dihydrat, Chloroform, Coomassie Brilliant Blue G-250, D-(+)-Glucose-Monohydrat, Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dinatriumcarbonat, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Formamid, Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Guanidiniumthiocyanat, Isopropanol, Kalilauge, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Methylenblau, Natriumacetat-Trihydrat, N,N-Dimethylformamid (DMF), Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Paranitrophenylphosphat-Dinatriumsalz, Phosphorsäure, Pyridoxal-5-Phosphat (PLP), 37% Salzsäure, N',N',N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED), Trichloroessigsäure (TCA), Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat

MP Biomedicals

D,L Glutamin

New England Biolabs

Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, M-MuLV-Reverse Transkriptase, ssRNA-Standard

Nunc

Cryo Tube Vials, Zellkulturschalen Nunclon Delta

Operon

Oligonukleotid-Primer, OpArray-Hybridisierungslösung, OpArray-Microarray-Slides, OpArray Prehyb-Lösung, OpArray Wash A, OpArray Wash B

Packard Bioscience

Solvable Tissue and Gel Solubilizer

Perkin Elmer

Ultima Gold-Szintillationsflüssigkeit

Pierce

His-Probe HRP

Promega

Pfu-DNA-Polymerase

Qiagen

Ni-NTA-Agarose, Qiagen Plasmid Maxi Kit, QIAquick PCR Purification-Kit, QiaShredder-Kit, RNase-freies DNase Set, RNeasy Mini-Kit

Roche

Expand High Fidelity PCR System, 4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES), Nylonmembran (positiv geladen), Random Primed DNA Labeling Kit

Roth

40% Acrylamid-Lösung, Ampicillin-Natriumsalz, dNTP Set 1, Essigsäure, Ethanol, Gentamycinsulfat, Glycerin, Glycin, Imidazol, Methanol, Natriumchlorid, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20), Ponceau S, Tris Ultra Qualität

Serva

Bromphenolblau, Saponin, SERVA Blue R (Coomassie Brilliant Blue R-250)

Sigma-Aldrich

Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid (APAD), Cercosporin, Diethylpolycarbonat (DEPC), D-Sorbitol, Ethidiumbromid, Glutamat-Dehydrogenase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA), Hypoxanthin, Malachitgrün-Oxalatsalz, MOPS, Natriumbicarbonat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Proteinase K (aus *Engyodontium album*), Ribose-5-Phosphat, TRI-Reagent, Xylencyanol

Thermo Scientific

Pierce ECL Western Blotting Substrate

Universitätskrankenhaus Eppendorf

Humane Erythrozyten (Blutgruppe 0⁺) in SAG-M-Additivlösung und CPD Stabilisator

Universität Mannheim, Institut für technische Mikrobiologie, Prof. Dr. M. Mack

Roseoflavin

Wallac

Betaplate Scint Szintillationslösung, Filterpapiere für Hypoxanthin-Einbautest

Whatman (Schleicher u. Schuell)

Chomatographie-Papier 3MM Chr, Chomatographie-Papier 1CHR, Protran Nitro-cellulose-Transfermembran

2.1.3 Bakterien- und Plasmodienstämme, Plasmidvektoren

Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5 α	Stratagene
<i>E.coli</i> XL10 Gold	Stratagene
<i>E.coli</i> BLR DE3	Stratagene

P. falciparum-Stamm

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

Plasmidvektoren

pASK-IBA3	IBA, Göttingen
pARL1a-	Prof. A. F. Cowman, WEHI, Melbourne, Australien

2.1.4 Verwendete Medien

Medien für *E. coli*

LB-Medium / LB-Agar (Luria-Bertani-Broth)	1,0% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Yeast-Extract, 1,0% NaCl in dH ₂ O - für LB-Agar zusätzlich 1,5% Agar Sterilisation im Autoklaven
Antibiotikum zur Selektion	Ampicillin (Endkonzentration 50 μ g/ml) (Ampicillin inhibiert die D-Alanin-Trans- Peptidase bei der Synthese des Murreinsacculus)

Medium für die *P. falciparum*-Zellkultur

RPMI 1640-Medium (1 l)	15,9 g RPMI 1640, 1 g Natriumbicarbonat, 2 g D-(+)- Glucose, 5 g Albumax II, 27,2 mg Hypoxanthin, 20 mg Gentamycinsulfat, pH 7,4
------------------------	--

2.1.5 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

Allgemeine Puffer

10x TBE	900 mM Tris, 900 mM Borat, 20 mM EDTA, pH 8,0
Puffer W	100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0
1x PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 2,6 mM KCl, 136,9 mM NaCl, pH 7,4
1x HT-PBS	16 mM Na ₂ HPO ₄ , 4 mM NaH ₂ PO ₄ , 126,6 mM NaCl, pH 7,2
20x SSC	350 g NaCl, 176,4 g TriNaCitrat in 1600 ml H ₂ O lösen, mit 10 N HCl auf pH 7,0 einstellen, ad 2000 ml
TE	10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA

Agarose-Gelelektrophorese

Proben-Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 1 mM EDTA, 50% Glycerin
Ethidiumbromid	Stammlösung 10 mg/ml in dH ₂ O

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Lösung 1	80 mM CaCl ₂
Lösung 2	80 mM CaCl ₂ , 20% (v/v) Glycerin

Isolation von gDNA

gDNA-Lysispuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 2% SDS, 20 mM EDTA
Proteinase K	Stammlösung 10 mg/ml
Salzlösung	NaCl, gesättigt in dH ₂ O

Ausfällen von gDNA

Salzlösung	3 M Natriumacetat, pH 4,8
------------	---------------------------

Northern-Blot

DEPC-H ₂ O	0,2% (v/v) DEPC in dH ₂ O
Blotting-Lösung	7,5 mM NaOH in DEPC-dH ₂ O
Hybridisierungslösung	7% SDS, 0,5 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,5, 2% Dextransulfat
Waschlösungen	2x SSC, 0,1% SDS 1x SSC, 0,1% SDS
Stripping-Lösung	0,1 M NaOH, 0,1% SDS

Proteinexpression

Anhydrotetrazyklin	Stammlösung 2 mg/ml in 50% Ethanol oder DMF
--------------------	---

Proteinaufreinigung

PMSF	Stammlösung 0,1 M PMSF in Isopropanol
------	---------------------------------------

Puffer E (Elutionspuffer)	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8,0 (Einstellen mit HCl)
Puffer R (Regenerationspuffer)	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM HABA, pH 8,0 (Einstellen mit HCl)

His-Lysis/Binding- Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 8,0 (Einstellen mit NaOH)
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol pH 8,0 (Einstellen mit NaOH)
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 8,0 (Einstellen mit NaOH)

Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% Ethanol (w/v), 8,5% (v/v) H ₃ PO ₄
------------------	--

SDS-Gelelektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v) in dH ₂ O
Trenngelpuffer	3 M Tris/HCl in 100 ml dH ₂ O, pH 8,9
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl in 100 ml dH ₂ O, pH 6,7
Elektrophoresepuffer	0,1% SDS (w/v), 192 mM Glycin, 25 mM Tris
6x SDS- Probenpuffer	2% SDS (w/v), 50 mM Tris, pH 6,8, 10% (w/v) Glycin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (v/v) β-Mercapto- ethanol
Coomassie-Färbelösung	Färbelösung A und B im Verhältnis 1:1 Färbelösung A: 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 96% Ethanol Färbelösung B: 20% (v/v) Eisessig in dH ₂ O
Coomassie-Entfärber- Lösung	20% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig in dH ₂ O

Western-Blot

Ponceau S	0,2% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
Stripping-Lösung	50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 2,5

Circularer Dichroismus

Mess-Puffer	20 mM NaPO ₄ , pH 8,0
-------------	----------------------------------

P. falciparum-Kulturführung und Transfektion

Sorbitol	5% (w/v) D-Sorbitol in HT-PBS
Saponin	0,2% (w/v) Saponin in HT-PBS
Einfrüer-Lösung	30% (v/v) Glycerin in PBS
Auftau-Lösungen	27% (w/v) D-Sorbitol in HT-PBS

	5% (w/v) D-Sorbitol in HT-PBS
Cytomix	10 mM K_2HPO_4 , 120 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,15 mM $CaCl_2$, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7,6
WR99210	Stammlösung (20 mM): 8,6 g WR99210 in 1 ml DMSO (Lagerung bei $-80^\circ C$), in der Plasmodienkultur eingesetzte Lösung ist 1:4000 in RPMI 1640-Medium verdünnt (Arbeitslösung 5 μM)
Blasticidin S	1 mg/ml in 50% Ethanol
Giensa-Färbelösung	Giensas Azur-Eosin-Methylenblaulösung (10x Konzentrat) 1:10 in dH_2O verdünnt

Aktivitätsbestimmungen

Test der vollständigen PLP- Synthesereaktion

Substrate	50 mM Ribose-5-Phosphat in dH_2O 50 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1 M HCl 100 mM D,L-Glutamin in dH_2O
-----------	---

Test der Aktivität von Pdx1 mit Ammoniumchlorid

Substrat:	100 mM NH_4Cl in dH_2O
-----------	----------------------------

Glutaminase-Aktivitätstest

Reaktionspuffer 1	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
Reaktionspuffer 2	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA
Substrate	100 mM D,L Glutamin in dH_2O 50 mM APAD (Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid) in dH_2O

Aktivitätstest der PfODC

Reaktionspuffer	0,5 M Tris/HCl pH 7,5
Stammlösungen	1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Ornithin, 2 mM PLP, 0,1M NaHCO ₃

Aktivitätstest der PfPNPase

Reaktionspuffer	0,5 M MOPS, pH 7,5
Stammlösungen	50 mM MgCl ₂ , je 10 mM Paranitrophenylphosphat, 10 mM ATP, 10 mM ADP, 10 mM AMP, 10 mM CTP, 10 mM PLP, 10 mM Thiaminpyrophosphat (TPP), 10 mM Thiaminmonophosphat (TMP), 10 mM Fructose-6-Phosphat (F-6-P), 10 mM Glucose-6-Phosphat (G-6-P)

Microarrays

10x Amminoallyl-Labeling-Mix	0,5 µl 100 mM dATP, je 0,25 µl 100 mM dCTP, dGTP und dTTP, 2,5 µl 10 mM Amminoallyl-dUTP, 2 µl RNase-freies dH ₂ O, 10 µl 5x FS-Puffer (Superscript-Puffer), 5 µl 100 mM DTT, 2,25 µl Superscript Reverse Transkriptase, optional 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor
Puffer für Dye-Inkorporation	0,2 M Na ₂ CO ₃ , pH 9,0 Lösung I: 0,84 g NaHCO ₃ in 50 ml DEPC-H ₂ O, Lösung II: 1,05 g Na ₂ CO ₃ in 50 ml DEPC-H ₂ O 45 ml Lösung I mit 2,75 ml Lösung II mischen und pH durch Zugabe von Lösung I oder Lösung II einstellen
Waschlösung 1	OpArray Wash B 1:40 in dH ₂ O verdünnt
Waschlösung 2	OpArray Wash A 1:10, Wash B 1:20 in dH ₂ O
Waschlösung 3	OpArray Wash A 1:10 in dH ₂ O
Waschlösung 4	OpArray Wash A 1:100 in dH ₂ O

Live-Imaging

Zellkern-Färbung Hoechst 33342, 10 mg/ml in DMSO

2.1.6 Bioinformatische Hilfsmittel und verwendete Software

ASTRA	Wyatt Technologies, USA
SELCON3	(Sreerama und Woody, 1993)
CONTILL	(Provencher und Glockner, 1981; van Stokkum et al., 1990)
DichroWeb-Server	(Whitmore und Wallace, 2004; Whitmore und Wallace, 2008)
GenePix Pro 5.1	Axon Instruments
Limma GUI	(Wettenhall und Smyth, 2004)
OpenLab 5	Improvision, Image Processing & Vision Company Limited, 2006
Adobe Photoshop	Version CS2, Adobe Systems Inc, 2006
NCBI-BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Clustal W	(Chenna et al., 2003; Larkin et al., 2007)
PlasmoDB	www.plasmodb.org
ExpASy	www.expasy.org
Generunner	Hasting Software Inc., 1994

2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde unter Verwendung verschiedener Polymerasen durchgeführt. Eingesetzt wurden entweder *Taq*-Polymerase in Form von PCR-Supermix (Invitrogen), *Pfu*-Polymerase (Promega), welche die Fähigkeit zum 3'-Proofreading besitzt, oder High-Fidelity-Enzym-Mix (Fermentas, Roche), eine Mischung aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase. Die Durchführung der PCR erfolgte nach Vorschrift des jeweiligen Herstellers.

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler UNO II (Biometra) durchgeführt und begannen mit einem einleitenden Denaturierungsschritt von 5 min bei 94°C. Darauf folgten 30-35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (45 sec bei 94°C), Annealing (1,5 min bei 41-55°C je nach verwendeten Oligonukleotiden) sowie Extension (1-2 min/kb des zu amplifizierenden Fragmentes bei 60-68°C, abhängig von der verwendeten Polymerase). Zum Abschluss wurden die Ansätze weitere 5 min bei 60-68°C inkubiert.

2.2.2 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)

Für die Reverse-Transkription-PCR wurde M-*Mu*LV-Reverse Transkriptase (NEB) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt neben dem Reaktionspuffer 1-2 Einheiten reverse Transkriptase, 0,5-1 µg plasmodiale Gesamt-RNA sowie 30 pmol eines Antisense-Oligonukleotids. Die Erststrang-Synthese erfolgte für 45 min bei 42°C. Im Anschluss wurden 1-5 µl des RT-PCR-Ansatzes als Template für eine PCR (siehe Abschnitt 2.2.1) eingesetzt.

2.2.3 Site-directed-Mutagenesis-PCR (Mutagenese-PCR)

Mit Hilfe der Site-directed-mutagenesis-PCR kann an einer gewünschten Stelle eine Mutation in ein Plasmid eingebracht werden. Die Mutation wird in die Sequenz der verwendeten Primer integriert und mittels PCR in das Plasmid eingefügt.

Die Mutagenese-PCR wurde unter Verwendung von *Pfu*-Polymerase nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Reaktionen wurden wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben angesetzt und die PCR mit einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 94°C gestartet. Darauf folgten 17 Zyklen, beginnend mit einer Denaturierung für 45 sec bei 94°C, dem anschließenden Annealing für 1,5 min bei 55°C und der Elongation für 7 min bei 68°C. Zum Abschluss erfolgte wiederum eine Inkubation für 5 min bei 68°C.

2.2.4 Overlap Mutagenese-PCR

Die Overlap Mutagenese-PCR verläuft in drei Stufen. In den ersten beiden PCR-Reaktionen werden je ein mutagener und ein flankierender Primer verwendet. Man erhält so PCR-Produkte, deren Sequenzen sich teilweise überlappen. Für die dritte PCR werden dann die Produkte der ersten beiden Reaktionen gemischt. Da die beiden zuvor eingesetzten mutagenen Primer komplementär zueinander sind, hybridisieren beide PCR-Produkte an dieser Stelle miteinander. Sie dienen als Template für die dritte PCR, in der die beiden flankierenden Primer zur Amplifikation eingesetzt werden. Die bestehenden Lücken werden dann durch die DNA-Polymerase aufgefüllt und man erhält ein PCR-Produkt, das die gewünschte Mutation trägt.

Für die Overlap-Mutagenese wurde der High-Fidelity-Enzym-Mix (Fermentas) eingesetzt. Als Template für die ersten beiden PCR-Ansätze diente das Konstrukt IBA3-*Pf* Pdx1 (Wrenger et al., 2005). Eine Reaktion wurde mit den Oligonukleotiden *Pf*Pdx1RHE-AAA-S und IBA-AS, die andere mit den Oligonukleotiden IBA-S und *Pf*Pdx1RHE-AAA-AS durchgeführt. Nach einer einleitenden Inkubation von 2 min bei 62°C wurde die Reaktion mit 33 Zyklen, bestehend aus je einer

Denaturierung der DNA für 30 sec bei 94°C, einem Annealing der Primer für 1 min bei 42°C, sowie einem Elongationsschritt für 2 min bei 62°C, fortgesetzt. Zum Abschluss folgte eine Inkubation der Ansätze für weitere 7 min bei 72°C. Die eingesetzte Template-DNA wurde anschließend durch Inkubation für 1 h mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I verdaut (siehe Kapitel 2.2.5). Zur weiteren Verwendung wurde das PCR-Produkt mit Hilfe eines PCR-Aufreinigungskits (Qiagen, Invitrogen) aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.6).

Im Anschluss folgte eine weitere PCR, bei der je 1 µl der beiden zuvor hergestellten PCR-Produkte als Template eingesetzt wurden. Die verwendeten Oligonukleotide waren hier IBA-S und IBA-AS. Die PCR wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt, wie die ersten beiden Reaktionen.

2.2.5 Entfernen der Template-DNA aus dem PCR-Ansatz

Die Template-DNA konnte wieder aus dem Ansatz entfernt werden, indem sie mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I verdaut wurde. Dieses Enzym schneidet methylierte DNA mit der Erkennungssequenz GA-(CH₃)-TC.

Für den *Dpn* I-Verdau wurde 1 µl des Enzyms direkt zum PCR-Ansatz gegeben und dieser für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz aufgereinigt.

2.2.6 Aufreinigung von DNA

Für die Verwendung von DNA im Restriktionsverdau musste diese zunächst aufgereinigt werden, um Salze und kleine Moleküle zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder dem PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) und wurde nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente. Die DNA wandert dabei als negativ geladenes Molekül in einem elektrischen Feld, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülgröße, DNA-Konformation, Agarosekonzentration und angelegter Feldstärke abhängig ist. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge zwischen 0,5 und 7 kb verwendet man ein 1% Agarosegel:

1 g Agarose wurden in 100 ml 1x TBE aufgekocht, auf etwa 60°C abgekühlt und das Gel nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gegossen. Vor dem Beladen des Gels wurden die DNA-Proben zur Erhöhung der Dichte mit Proben-Ladepuffer versetzt. Die Proben, sowie der DNA-Größenmarker wurden in die Taschen des Gels pipettiert und eine Spannung von 80-120 V angelegt. Nach Beenden des Gellaufs wurde das Ergebnis durch eine Aufnahme unter UV-Licht dokumentiert.

2.2.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA wurde zunächst in einem 0,8-1% Low melting point-Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Mit Hilfe des Gel-Extraction Kit (Invitrogen) wurde die DNA nach Angaben des Herstellers isoliert und in TE-Puffer eluiert.

2.2.9 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zur Analyse von DNA-Mini-Präparationen sowie zur Vorbereitung von Vektor und PCR-Produkt für eine spätere Ligation verwendet. Er erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen und unter Verwendung des mitgelieferten Puffers.

Für eine spätere Ligation wurden das PCR-Produkt und 3-4 µg Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von je 100 µl verdaut.

Der analytische Restriktionsverdau wurde mit 0,5 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Zur Analyse der entstandenen Fragmente wurde die verdaute DNA auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.10 Ligation

Der Ligationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer, 1-5 µl zuvor verdauten Vektor, 12-16 µl ebenso verdautes PCR-Produkt, sowie 1 µl T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.2.11 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen durch CaCl₂

Eine *E. coli*-Einzelkolonie wurde in 10 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:100 in 250 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C im Schüttler bei 150 rpm kultiviert. Nach Erreichen einer Absorption von 0,5-0,7 bei 600 nm (A_{600}) wurde die Bakterienkultur für ca. 15 min in Eiswasser abgekühlt.

Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt (Lösungen und Rotoren gekühlt).

Die Kultur wurde zunächst für 15 min bei 3.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet vorsichtig in 50 ml 80 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach einer Inkubation für 40 min auf Eis wurde die Kultur erneut 15 min bei 3.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet in 5 ml 80 mM CaCl₂, 20% (v/v) Glycerin gelöst und die Zellen in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert (ca. 200 µl). Die Aliquote wurden sofort bei -80°C schockgefroren.

2.2.12 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*- Zellen

Die bei -80°C eingefrorenen kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis gelagert und auftauen lassen. Dann wurde die Plasmid-DNA zugegeben (10 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl isoliertes Plasmid) und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert.

Nach einem Hitzeschock für 1 min bei 42°C und erneuter Inkubation für 3 min auf Eis wurden 700 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 30 min bei 37°C auf dem Heizblock unter schütteln kultiviert. Die Kultur wurde für 1 min bei 13.200 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet im Rückfluss resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (hier Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Plasmid-Isolation

Für die Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurde der PureLink-Quick Plasmid Miniprep-Kit (Invitrogen) verwendet. Die Plasmid-Isolation wurde unter Einsatz von 2 ml einer *E. coli*-Übernacht-Kultur entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt.

Für die Maxi-Präparation von DNA wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Als Ausgangsmaterial dienten 500 ml einer Bakterien-Übernachtkultur. Es wurde bis zu 1 mg DNA gewonnen.

Die so erhaltene DNA konnte direkt für Restriktionsanalysen, Transformationen oder Sequenzierungen, die von der Firma MWG durchgeführt wurden, verwendet werden.

Für die Verwendung der DNA zur Transfektion von *Plasmodium falciparum* wurden Aliquote von 100-150 µg DNA hergestellt, die DNA gefällt (siehe Abschnitt 2.2.16) und bis zur Benutzung bei -20°C gelagert.

2.2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Photometer

Die Reinheit, sowie die Konzentration von DNA- bzw. RNA-Lösungen können mittels UV-Absorptionsspektrometrie im Photometer bestimmt werden. Dafür wurden 1-2 µl der Probe mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt und in eine Quarzküvette gegeben. Als Referenz diente Wasser. Im Photometer wurde dann die Absorption (A) der Probe bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes.

$$c = A_{260} \cdot \epsilon \cdot f$$

c : Konzentration [µg/ml]

ε : Extinktionskoeffizient (dsDNA ε = 50, RNA ε = 40)

f : Verdünnungsfaktor

Die Reinheit der Probe bezüglich Protein-Verunreinigungen ergibt sich aus dem Koeffizient A_{260}/A_{280} . Der Wert sollte zwischen 1,6 und 2 liegen (Sambrook et al., 1989).

2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren konnte alternativ mittels NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Inquaba Biotech) durchgeführt werden. 1-2 µl der Probe wurden dazu auf den Messfuß des Gerätes pipettiert und die Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Die Qualität der Probe konnte durch Berechnung der Verhältnisse A_{230}/A_{280} und A_{260}/A_{280} bestimmt werden, die beide zwischen 1,6 und 2 liegen sollten.

2.2.16 Fällung von Nukleinsäuren

Für die Fällung wurden zur gelösten DNA bzw. RNA 2,5 Vol. 100% Ethanol (alternativ 1 Vol. Isopropanol) sowie 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,8) gegeben. Die wässrige und die alkoholische Phase wurden durch mehrmaliges invertieren des Gefäßes gemischt. Durch Einfrieren der Probe bei -20°C für 1-24 Stunden wurde die Fällung verstärkt.

Nach der Zentrifugation (30 min, 13.200 rpm, 4°C) wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in vorgewärmtem dH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.17 Isolation von genomischer DNA aus Parasiten

Zur Gewinnung von genomischer DNA (gDNA) aus *P. falciparum* wurde ein Pellet zuvor mittels Saponin-Lyse isolierter Parasiten mit 500 µl Lysispuffer versetzt und die Zellen durch resuspendieren aufgeschlossen. Die Suspension wurde mit 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zugabe von 0,3 Vol. gesättigter NaCl-Lösung und Inkubation für 10 min auf Eis ausgefällt und durch anschließende Zentrifugation bei 4°C und 6.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge) pelletiert. Der Überstand wurde zur Entfernung der RNA mit 2 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und die Lösung für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zur Entfernung des restlichen Phenols mit 1 Vol. Chloroform versetzt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 4°C wurde die wässrige Phase mit 2,5 Vol. 100% Ethanol versetzt und für 30 min bei -20°C gelagert. Die darin befindliche DNA wurde so ausgefällt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4°C wurde die pelletierte gDNA mit 100 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde danach mit einer abgeschnittenen sterilen Pipettenspitze in 50 µl warmem TE-Puffer resuspendiert und die Konzentration der gDNA im Photometer bestimmt.

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

Zur Extraktion von Gesamt-RNA wurde eine Zellkultur, die überwiegend Trophozoiten und Schizonten enthielt, abzentrifugiert und die Parasiten wurden mittels Saponin-Lyse isoliert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Trizol aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Das gefrorene Trizol-Lysat wurde zur Isolation der RNA für 5 min bei 37°C aufgetaut, mit 0,2 ml Chloroform/Trizol (v/v) versetzt und die Suspension für 30 min bei 4°C und 13.200 rpm zentrifugiert. Zur wässrigen Phase wurden anschließend 0,5 ml eiskaltes Isopropanol/Trizol (v/v) zugegeben. Die RNA wurde durch Inkubation auf Eis für mindestens 4 Stunden ausgefällt und pelletiert (13.200 rpm, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl Formamid oder DEPC-dH₂O aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde im Photometer bestimmt und die Probe bei -80°C gelagert.

2.2.19 Analyse von RNA mittels Northern-Blot (Kyes et al., 2000)

Alle für die RNA-Analyse verwendeten Lösungen wurden mit 0,2% (v/v) DEPC-dH₂O angesetzt. Gelkammer, Gelträger und Kamm wurden vor dem Gellauf für ca. 3 Stunden in 3% (v/v) H₂O₂ inkubiert, um RNasen zu inaktivieren.

Zur Analyse der RNA wurde die Probe zunächst für 5 min bei 60°C aufgetaut. 25 µg Gesamt-RNA, 4 µg RNA-Marker, sowie 10 µl Ladepuffer wurden mit je 10 µl Formamid versetzt und für 10 min bei 60°C denaturiert. Die Proben wurden in einem 1,2% TBE-Agarosegel mit 5 mM Guanidiniumthiocyanat aufgetrennt, das Gel für 20 min in TBE-Puffer mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Als Skalierung wurde ein Lineal verwendet. Die RNA wurde mittels Kapillarblot-Verfahren auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Gel und Membran wurden dafür vorher für 10 min in 7,5 mM NaOH inkubiert. Nach dem Blotten wurde die Membran für 5 min in 2x SSC gewaschen, getrocknet und die RNA mit dem UV-Statalinker 1800 (Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

2.2.20 Herstellung einer radioaktiv markierten Hybridisierungssonde

25 ng PCR-Produkt eines gewünschten DNA-Abschnittes wurden für 10 min bei 95°C denaturiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Die DNA wurde durch Zugabe von je 1 µl dCTP, dGTP, dTTP, 2 µl Hexanukleotiden und 1 µl Klenow-Polymerase aus dem Random Primed Labeling Kit (Roche) und 50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (Hartmann) für 30 min bei 37°C radioaktiv markiert. Nicht eingebaute dNTPs wurden über eine Illustra MicroSpin™ S-200 HR Säule (GE Healthcare) abgetrennt.

2.2.21 Hybridisierung des Northern-Blots mit radioaktiv markierter Sonde

Für die Hybridisierung des Northern-Blots mit einer radioaktiv markierten Sonde wurde die Membran zunächst für mindestens 3 h in zuvor aufgekochter Northern-Blot-Hybridisierungslösung bei 55°C prähybridisiert. Die mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP radioaktiv markierte Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und zur Prähybridisierungslösung gegeben. Der Blot wurde über Nacht bei 55°C hybridisiert. Zum Entfernen nicht gebundener Sonde wurde der Blot bei 55°C 2x für 20 min mit 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS und 1x mit 1x SSC, 0,1% (w/v) SDS gewaschen. Anschließend wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt, ein Röntgenfilm (Retina) aufgelegt und bei -80°C exponiert. Je nach Signalstärke wurde der Film nach 24-96 Stunden entwickelt.

2.2.22 Strippen der Northern-Blot-Membran

Um die Sonde von der Membran zu entfernen wurde diese zwei Mal für 15 min bei 37°C mit 0,1 M NaOH, 0,1% (w/v) SDS inkubiert. Vor der erneuten Prähybridisierung wurde die Membran mit 2x SSC gewaschen.

2.3 Allgemeine biochemische Methoden

2.3.1 Rekombinante Expression

Für die Expression wurde das gewünschte DNA-Konstrukt zunächst in einen expressionsfähigen Bakterienstamm wie *E. coli* BLR DE3 transformiert. Eine Einzelkolonie wurde in Ampicillin-haltiges LB-Medium (10 µg/ml) überführt und zur Herstellung einer Vorkultur im Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert.

5 ml der Übernacht-Kultur wurden am nächsten Tag in 500 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Ampicillin bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer A_{600} von 0,5 wurde die Kultur mit Anhydrotetrazyklin (AHT, 2 mg/ml) im Verhältnis 1:10.000 induziert. Nach 4 Stunden wurde die Expression beendet und die Kulturen für 10 min bei 6.000 rpm abzentrifugiert.

Das Pellet wurde für die spätere Aufreinigung mittels Strep-Tag in 20 ml Puffer W, für eine Aufreinigung mittels His-Tag in His-Lysis/Binding-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Aufschluss der Bakterien zur Proteinaufreinigung

Das eingefrorene Bakterienpellet wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde 1/1000 Volumen des Proteaseinhibitors PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,1 M) zugegeben. Der Aufschluss der Bakterien wurde durch Beschallung in einem Branson Sonifier bei 40 kHz erreicht. Das erhaltene Bakterienlysat wurde bei 20.000 rpm für 50 min pelletiert (Sorvall Evolution).

2.3.3 Proteinaufreinigung über His-Tag

Die Proteinaufreinigung mittels His-Tag erfolgte mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose. Der Überstand des beschallten Bakterienlysats wurde dafür mit zuvor in His-Lysis/Binding-Puffer equilibrierter Ni-NTA-Agarose versetzt und für 45 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Zum Waschen der Matrix wurde diese pelletiert und 3x

für 5 min mit Waschpuffer versetzt. Zur Elution wurde die Matrix mit 3 ml Elutionspuffer versetzt, in eine Leersäule gegeben und das Eluat aufgefangen.

2.3.4 Proteinaufreinigung über Strep-Tag

In eine Leersäule wurden 700 µl Strep-Tactin-Sepharose (50% Suspension) gegeben und die Matrix mit 0,5 Säulenvolumen Puffer W equilibriert. Der Überstand des zentrifugierten Bakterienlysats wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Sepharose 3x mit je 1 Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Zur Elution des Proteins wurde 10x Puffer E 1:10 mit Puffer W verdünnt, auf die Matrix gegeben und das Eluat aufgefangen.

Zur Regeneration der Sepharose wurden nacheinander je ein Säulenvolumen Puffer R sowie 2x ein Säulenvolumen Puffer W auf die Matrix gegeben und der Durchfluss verworfen.

2.3.5 Protein-Mengenbestimmung (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinmenge im Eluat wurden 10 µl der Proteinlösung mit 90 µl Puffer W und 900 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 min wurde im Photometer die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert aus 100 µl Puffer W und 900 µl Bradford-Reagenz gemessen und mit Hilfe einer Eichgeraden die Proteinmenge bestimmt.

2.3.6 SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden 0,5-4 µg Protein in SDS-Ladepuffer für 10 min bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses wurde zuvor in eine Höfer-Gelelektrophoresekammer eingesetzt, die dann mit SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Der Gellauf erfolgte bei einer Stromstärke von max. 40 mA pro Gel.

Die Auftrennung der hier bearbeiteten Proteine, die zwischen 25 und 38 kDa groß sind, erfolgte mit einem 5% Sammelgel und einem 10% Trenngel. Zur Herstellung der Gele wurden die im Folgenden aufgeführten Substanzen der Reihenfolge nach zusammenpipettiert:

<u>Trenngel (10%)</u>		<u>Sammelgel (5%)</u>	
Trenngelpuffer	1,5 ml	Sammelgelpuffer	1 ml
dH ₂ O	2,5 ml	dH ₂ O	2,3 ml
30% Acrylamid	2 ml	30% Acrylamid	667 µl
10% SDS	60 µl	10% SDS	40 µl
10% APS	50 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

2.3.7 Gelfärbung mit Coomassie

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Entfärber-Lösung, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

2.3.8 Western-Blot

Aufgereinigte Proteine oder Gesamt-Zellextrakte wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Standardmethoden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Sambrook et al., 1989). Geblottet wurde dabei für 1-1,5 h bei 40 mA pro Gel.

Die Membran wurde anschließend entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur in PBS, 3% (w/v) BSA geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem 1. Antikörper (entsprechende Verdünnung in PBS, 0,03% (v/v) Tween 20, 1% (w/v) BSA) inkubiert und 3x für 10 min in Waschpuffer (PBS, 0,3% (v/v) Tween 20) gewaschen.

Danach wurde der Blot für 1 h mit dem 2. Antikörper, an den eine Meerrettichperoxidase (HRP) für die spätere Detektion gekoppelt war, inkubiert (entsprechende Verdünnung in PBS, 0,03% (v/v) Tween 20, 1% (w/v) BSA) und wiederum 3x für 10 min gewaschen.

Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem ECL-Plus Detection Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt, entwickelt und die Signale detektiert.

2.3.9 Färbung von Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S

Für die Färbung wurde die Nitrocellulosemembran für ca. 1 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde mit H₂O entfernt.

2.3.10 Strippen von Nitrocellulosemembranen

Um gebundene Antikörper von einer Nitrocellulosemembran zu entfernen, wurde die Membran für 5 min in 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 2,5 inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1N NaOH im Verhältnis 1:250 gestoppt und die Membran in PBS gewaschen. Anschließend wurde sie mit PBS 3% (w/v) BSA geblockt und konnte wieder mit Antikörpern beprobt werden.

2.3.11 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Zur Untersuchung des oligomeren Status von Proteinen können diese mittels FPLC aufgetrennt und die Proteingröße durch Vergleich mit einer zuvor erstellten Eichgerade ermittelt werden.

Dazu wurden 100 µg des Proteins auf eine HiLoad 10/30 Superdex 200-Chromatographiesäule geladen und mittels Gelfiltration aufgetrennt. Als Elutionspuffer wurde Puffer W verwendet, der zuvor entgast werden musste.

Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 250 µl bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und einem Maximaldruck von 1,5 MPa.

Der Proteingehalt der Eluatfraktionen wurde über Bradford-Bestimmung ermittelt und die Größe des Proteins über Vergleich mit der Eichgerade bestimmt.

Zum Erstellen der Eichgerade wurden 100 µl Protein-Eichstandard (Biorad) durch die Säule aufgetrennt und der Proteingehalt der Fraktionen mittels Bradford-Bestimmung ermittelt. Die Größe der eingesetzten Proteine wurde anschließend in einen Graph mit halblogarithmischer Skalierung gegen die Eluatfraktionen aufgetragen. Die resultierende Eichgerade ist in Abb. 2.3 dargestellt.

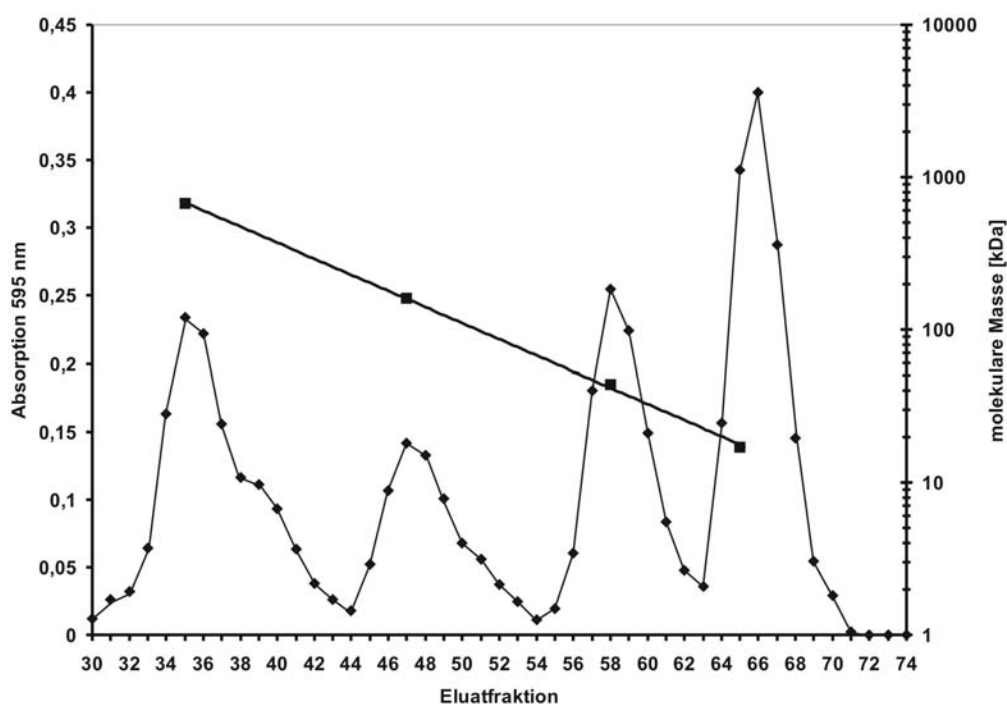


Abb. 2.3: Eichgerade der FPLC. Raute: Absorption der Eluatfraktionen nach Bradford-Proteinbestimmung (linke y-Achse), Quadrat: Molekulare Masse der im Eichstandard verwendeten Proteine (rechte y-Achse).

2.3.12 Statische Lichtstreuung (Static Light Scattering, SLS)

Zur Durchführung der SLS-Analysen wurden 100 µg Protein über eine HiLoad 10/30-Superdex 200-Säule aufgetrennt und mit einem miniDAWN Tristar (Wyatt Technologies, USA) SLS-Daten aufgezeichnet. Diese wurden im Anschluss mit dem Software-Paket ASTRA (Wyatt Technologies, USA) analysiert.

2.3.13 Circularer Dichroismus (CD)

Für die CD-Analyse wurden 200 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 1mg/ml benötigt. Das Protein wurde zuvor in einen 20 mM NaPO₄-Puffer, pH 8,0 umgepuffert, da dieser im Gegensatz zum Elutionspuffer des Proteins eine geringe Eigenabsorption bei der zu messenden Wellenlänge aufweist. Das Absorptionsspektrum von 190 nm bis 240 nm wurde in einem Jasco J-810 CD-Spektrophotometer aufgenommen und die gewonnenen Daten mit der Software SELCON3 (Sreerama und Woody, 1993) und CONTILL (Provencher und Glockner, 1981; van Stokkum et al., 1990) sowie dem DichroWeb-Server (Whitmore und Wallace, 2004; Whitmore und Wallace, 2008) analysiert. Verwendet wurde das Protein-Referenzset 4 (Sreerama et al., 2000) sowie eine mittlere molekulare Masse von 110 kDa/Aminosäurerest.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Herstellung von RPMI 1640-Medium für die *P. falciparum* Zellkultur

Für die Herstellung des RPMI 1640-Kulturmediums wurden 15,9 g RPMI 1640, 1 g Natriumbicarbonat und 2 g D-(+)-Glucose in ca. 800 ml dH₂O gelöst. Parallel wurden 5 g Albumax II in ca. 100 ml dH₂O bei 37°C und 27,2 mg Hypoxanthin in 2 ml 1 N NaOH gelöst und zum Medium hinzugefügt. Der pH wurde mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt und das Volumen mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt. Nach Zugabe von 20 mg Gentamycin wurde das Medium sterilfiltriert. Bei einer Lagerung des Mediums bei 4°C beträgt die Haltbarkeit ca. 4 Wochen.

Zur Untersuchung des Einbaus von radioaktiv markiertem Hypoxanthin wurde RPMI 1640-Medium ohne Hypoxanthin verwendet.

2.4.2 Kulturführung von *P. falciparum*

Die Parasitenkultur wurde in RPMI 1640-Medium bei einem Hämatokrit von 2-4% gehalten. Es wurde Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0⁺ verwendet und die

Parasiten bis zu einer maximalen Parasitämie von 10% kultiviert. Die Kultur wurde regelmäßig alle 2 Tage im Verhältnis 1:10 oder 1:5 verdünnt und das Medium gewechselt. Die Führung der Kultur erfolgte entweder in Petrischalen (Ø 60 mm, 92 mm oder 144 mm, Nunc) oder in Flaschen (150 cm², TPP) und unter sauerstoffarmer Atmosphäre (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) (Trager und Jensen, 1976; Jensen und Trager, 1977).

2.4.3 Bestimmung der Parasitämie

Zur Bestimmung der Parasitämie wurden Blutausstriche angefertigt und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Ausstriche wurden zunächst für etwa 10 sec mit Methanol fixiert und dann für 15 min in Giemsa-Lösung (1:10 in dH₂O) inkubiert. Die Ausstriche wurden mit Leitungswasser gespült, getrocknet und unter dem Mikroskop (Axioskop 20, Zeiss) bei 1.000-facher Vergrößerung ausgewertet. Zur Bestimmung der Parasitämie wurden 500 Zellen ausgezählt und der Anteil der infizierten Erythrozyten als Prozentwert berechnet.

2.4.4 Synchronisation der *P. falciparum* Zellkultur mit Sorbitol

Zur Synchronisation wurden 10 ml einer Kultur, die mindestens 5% Ringstadien enthielt, für 5 min bei RT und 1.500 rpm pelletiert (Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 5 Volumen HT-PBS, 5% (w/v) Sorbitol resuspendiert. Die Zellen wurden 5 min bei 37°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem RPMI 1640-Medium aufgenommen und wieder in eine Zellkulturschale überführt (Lambros und Vanderberg, 1979).

2.4.5 Isolation der Parasiten mittels Saponin

Zur Isolation der Parasiten aus den Erythrozyten wurden 10 ml einer Zellkultur bei 1.500 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 2 Vol. HT-PBS, 0,2% (w/v) Saponin resuspendiert und mit kaltem HT-PBS auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 3.500 rpm und 4°C pelletiert (Heraeus). Der Überstand wurde

abgenommen, das Pellet erneut in 1 ml HT-PBS resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 3.500 rpm) (Umlas und Fallon, 1971). Der Überstand wurde abgenommen, die Parasiten in dem jeweils für die Weiterverwendung benötigten Puffer aufgenommen und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

2.4.6 Einfrieren der *P. falciparum* Zellkultur

Zur Herstellung von Stabilaten wurde eine *P. falciparum*-Zellkultur mit einem Anteil von mindestens 3% Ringstadien bei 1.500 rpm und RT abzentrifugiert (Heraeus). Der Überstand wurde bis auf 1 Pelletvolumen abgenommen, die Zellen in 2 Pelletvolumen sterilem PBS, 30% (v/v) Glycerin vorsichtig resuspendiert und in Aliquoten von 500 µl in 1,8 ml Cryotubes (Nunclon) gefüllt. Die Tubes wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff (bei -196°C) gelagert.

2.4.7 Auftauen der *P. falciparum* Zellkultur

Das gefrorene Stabilat wurde unter leichtem Schütteln im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und danach sofort auf Eis gelagert. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Tube überführt und 2 Vol. kaltes HT-PBS, 27% (w/v) Sorbitol tropfenweise unter Schütteln hinzugegeben. Nach 13 min Inkubation auf Eis wurden 5 Vol. kaltes HT-PBS, 5% (w/v) Sorbitol, ebenfalls tropfenweise und unter schütteln, hinzugegeben und die Zellen für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C und 1.500 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 Vol. HT-PBS, 5% (w/v) Sorbitol resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation für 8 min auf Eis wurden die Zellen erneut in der Zentrifuge pelletiert (Heraeus, 5 min, 1.500 rpm, 4°C), das Pellet in frischem RPMI 1640-Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

2.4.8 Transfektion von *P. falciparum*

Die genetische Manipulation von Plasmodien erfolgt im Blutstadium. Es werden zwei verschiedene Methoden angewendet, um die Fremd-DNA in die Parasiten zu schleusen. Zum einen kann die DNA zunächst in die Erythrozyten eingebracht werden, von wo sie vom Parasiten aufgenommen wird (Deutsch et al., 2001). Die zweite Methode ist die Elektroporation von Parasiten im Ringstadium, bei der die DNA direkt in den Parasiten transfiziert wird (Crabb et al., 2004).

2.4.8.1 Elektroporation von Erythrozyten

Die für die Parasiten schonende Methode ist die Transfektion von Erythrozyten. Dafür wurden frische Erythrozyten in 10 Volumen Cytomix gewaschen und bei 1.500 rpm und 4°C in der Zentrifuge (Heraeus) pelletiert. Parallel wurden 100-150 µg Plasmid-DNA in 50 µl TE-Puffer gelöst. Diese wurde dann mit 450 µl gewaschenen Erythrozyten vermischt, in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm, BIORAD) gefüllt und in einem GenePulser (EquiBio) bei 310 V und 900 µF elektroporiert. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 10 ml RPMI 1640-Medium gegeben. Anschließend wurde eine synchrone Parasitenkultur, die 8-10% Schizonten enthielt bei 1.500 rpm und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und 50-80 µl gepackte Zellen zu den transfizierten Erythrozyten gegeben. 4 Stunden nach der Transfektion wurde ein Medienwechsel vorgenommen und die Zellen bis zum nächsten Tag ohne Selektionsdroge kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt und mit 5 nM WR99210 versehen. Dies wurde in der ersten Woche nach der Transfektion täglich, danach alle zwei Tage wiederholt, bis Transfektanden zu beobachten waren.

2.4.8.2 Elektroporation von Parasiten im Ringstadium

Für die Elektroporation von Parasiten im Ringstadium wurde eine mit etwa 5% Ringen infizierte synchrone Plasmodienkultur pelletiert (5 min, 1.500 rpm, RT, Heraeus). 200 µl der gepackten Erythrozyten wurden dann mit 250 µl Cytomix und

100-150 µg DNA, die zuvor in 50 µl TE-Puffer resuspendiert wurde, gemischt. Die Suspension wurde in Elektroporationsküvetten gefüllt und im GenePulser bei 310 V und 900 µF elektroporiert. Die so behandelten Zellen wurden in 10 ml RPMI 1640-Medium überführt und mit 300 µl frischen Erythrozyten versetzt. Medienwechsel und Selektion wurden wie bei der vorangegangenen Methode beschrieben durchgeführt.

2.4.8.3 Cotransfektion von *P. falciparum*

Die Cotransfektion von *P. falciparum* wurde ebenfalls durch die oben beschriebenen Techniken durchgeführt. Bei der Transfektion von Erythrozyten wurden die Zellen nach der Elektroporation mit Parasitenkultur einer bereits stabilen transgenen Zelllinie versetzt. Die Cotransfektion von Ringstadien erfolgte durch erneute Transfektion einer bereits transgenen stabilen Plasmodienkultur. Die Selektion erfolgte hier mit 5 nM WR99210 und 1 µg/ml Blasticidin S.

2.4.9 Bestimmung des IC₅₀ über Einbau von radioaktivem Hypoxanthin

Da *P. falciparum* keinen *de novo*-Biosyntheseweg für Purine, wie z.B. Hypoxanthin, besitzt, ist der Parasit auf deren Aufnahme aus dem Kulturmedium angewiesen. Ist im Medium radioaktives Hypoxanthin vorhanden, korreliert der Einbau an Radioaktivität mit Wachstumsvermögen und metabolischer Aktivität der Parasiten. Bei Zugabe einer Substanz zur Zellkultur kann der Einbau an radioaktivem Hypoxanthin somit als Maß für die inhibitorische Wirkung des Stoffes (IC₅₀-Wert) genutzt werden.

Die Bestimmung von IC₅₀-Werten wurde in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Jedes Well enthielt 250 µl Plasmodienkultur (2% Hämatokrit, 2% Parasitämie, Ringstadien), die zuvor in hypoxanthinfreiem RPMI 1640-Medium gewaschen wurde, sowie 5 µl der zu testenden Substanz (aufsteigende Konzentrationen in 50% Ethanol). Nach Inkubation der Zellen für 24 h bei 37°C wurden zu jedem Ansatz 10 µl [8-³H]Hypoxanthin (19 µCi/µl) gegeben und die

Kultur für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Inotech IH110 Cell Harvester über Vakuum auf ein Filterpapier transferiert. Nach dem Trocknen des Papiers bei 80°C wurde dies mit 4 ml Betaplate Scint Szintillationsflüssigkeit angefeuchtet und luftblasenfrei in eine Plastiktüte eingeschweißt. Die Messung der Menge an radioaktivem Hypoxanthin erfolgte mit Hilfe eines Trilux Liquid Scintillation Counters (Wallac). Jede Konzentration der zu testenden Substanz wurde mindestens vier Mal in dreifachem Ansatz getestet.

2.4.10 Erstellung von Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden täglich Blutausstriche von der Kultur angefertigt und diese mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Parasitämie wurde als Prozentwert infizierter Erythrozyten in der Kultur bestimmt. Die Kultur wurde alle 1-2 Tage 1:2 oder 1:5 verdünnt und der Verdünnungsfaktor in die Berechnung der Parasitämie einbezogen.

2.5 Methoden zur Untersuchung des PLP-Synthase-Komplexes von *P. falciparum*

In den im Folgenden beschriebenen Aktivitätstests wurde die Aktivität des aus den Proteinen Pdx1 und Pdx2 bestehenden Enzymkomplexes, sowie jeweils den Einzelkomponenten getestet. Zur Herstellung des Proteingemisches wurden die Enzyme Pdx1 und Pdx2 in einem Mengenverhältnis von 1:1 gemischt und die Proteinmenge bestimmt.

2.5.1 Test der vollständigen PLP-Synthesereaktion (Müller et al., 2008)

In diesem Test wird die Aktivität des gesamten PLP-Synthase-Komplexes untersucht. Es werden die Substanzen in den Testansatz gegeben, die mutmaßlich als Substrate zur Synthese von Pyridoxalphosphat (PLP) dienen.

PLP bildet mit dem im Reaktionspuffer enthaltenen Tris eine Schiff-Base aus, wodurch es zu einer Gelbfärbung kommt. Diese kann im Photometer bei 414 nm detektiert werden. Mit Hilfe einer Eichgeraden wird aus der Absorption die Menge an gebildetem PLP und daraus die spezifische Aktivität des Enzymkomplexes berechnet.

Zur Durchführung des Tests wurden zu 150 µg Proteingemisch (Mischverhältnis 1:1), 10 mM Glutamin, 1 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat und 0,5 mM Ribose-5-Phosphat gegeben und der Ansatz mit Puffer W auf 1 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und bei 13.200 rpm für 2 min zentrifugiert.

Im Photometer wurde die Absorption bei 414 nm gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen. Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung der Testreaktion.

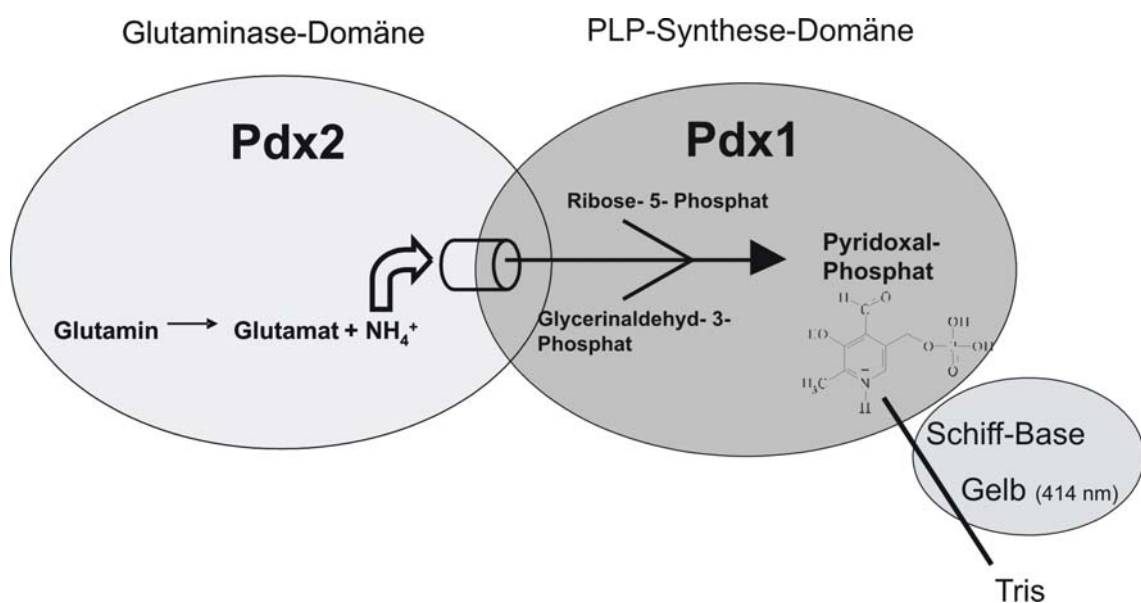


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Tests für die vollständige PLP-Synthese-Reaktion. Gemessen wird die Menge an PLP, die aus den Substraten Glutamin, Ribose-5-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat gebildet wird.

Zur Bestimmung der Eigenabsorption des Proteins wurden außerdem Proben angesetzt, bei denen die Absorption ohne Inkubation direkt nach Zugabe des Proteins gemessen wurde (Nullzeit).

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte mit Hilfe der im Photometer bestimmten Absorption, sowie der Steigung einer zuvor mit PLP erstellten Eichgeraden nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Absorption 414nm}}{0,00597} = x \text{ nmol PLP}$$

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{nmol PLP}}{\text{Reaktionszeit (min) Proteinmenge (mg)}}$$

2.5.2 Test der Aktivität von Pdx1 mit Ammoniumchlorid (Müller et al., 2008)

Die Aktivität des Proteins Pdx1 kann bestimmt werden, wenn man im oben beschriebenen Aktivitätstest anstatt Glutamin Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle einsetzt.

Hierbei wurden zu 150 µg Protein Pdx1 5 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl), 1 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat und 0,5 mM Ribose-5-Phosphat gegeben, der Ansatz mit Puffer W auf 1 ml aufgefüllt und für 60 min bei 37°C inkubiert.

Der Ansatz wurde bei 13.200 rpm für 2 min zentrifugiert und die Absorption bei 414 nm gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen. Die Testreaktion ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt.

Zur Bestimmung der Eigenabsorption des Proteins wurden auch hier Proben angesetzt, bei denen die Absorption ohne Inkubation direkt nach Zugabe des Proteins gemessen wurde (Nullzeit).

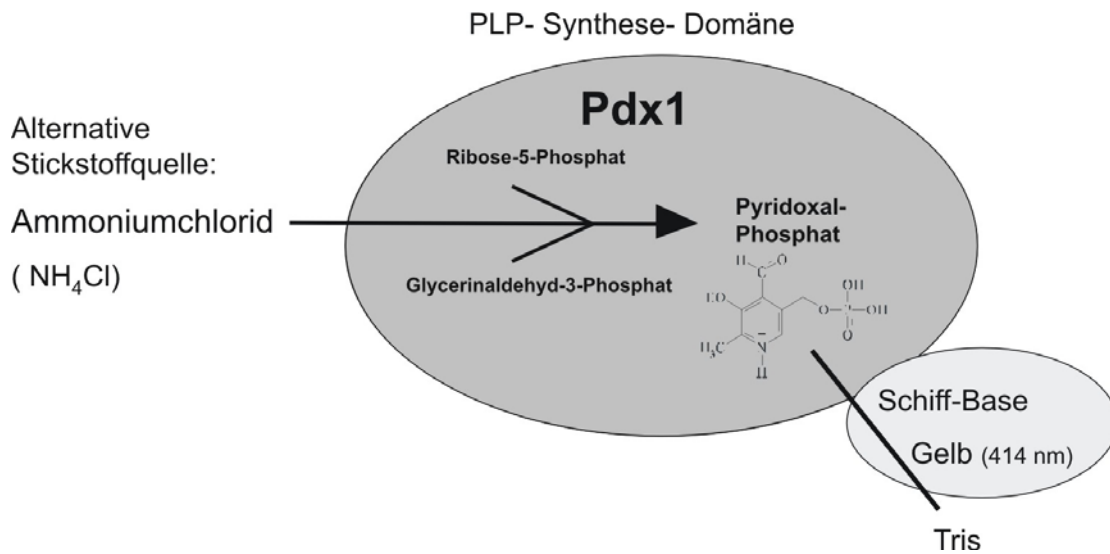


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Pdx1-Aktivitätstests mit Ammoniumchlorid. Untersucht wird die Aktivität des Enzyms Pdx1. Als N-Quelle für den Pyridoxinring dient NH_4Cl .

2.5.3 Glutaminase-Aktivitätstest (Dong et al., 2004)

Der Glutaminase-Aktivitätstest beruht auf dem Nachweis von Glutamat, das durch Umsatz von Glutamin durch das Enzym Pdx2 entsteht. Glutamat wird durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase zu 2-Oxoglutarat und einer Aminogruppe gespalten. Als Cosubstrat wird Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid (APAD) benötigt. Dieses wird reduziert, was eine Gelbfärbung zur Folge hat, die im Photometer bei 363 nm detektiert werden kann. Die spezifische Aktivität des Enzyms wird mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für APADH von $8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet.

Für die Aktivitätsbestimmung wurden $30 \mu\text{g}$ des Pdx1/Pdx2- Proteingemisches und 10 mM Glutamin mit 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 auf ein Gesamtvolumen von $300 \mu\text{l}$ aufgefüllt und für 20 min bei 37°C inkubiert.

Um die Enzymreaktion zu stoppen, wurde das Protein für 1 min bei 95°C denaturiert, nach Abkühlen der Probe 7 U Glutamat-Dehydrogenase und $0,5 \text{ mM}$ APAD zugeben und mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA auf 1 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 90 min bei 37°C inkubiert, für 3 min bei 13.200 rpm zentrifugiert und die Absorption der Probe im Photometer bei 363 nm gemessen. Eine schematische Darstellung des Testablaufes findet sich in Abbildung 2.6.

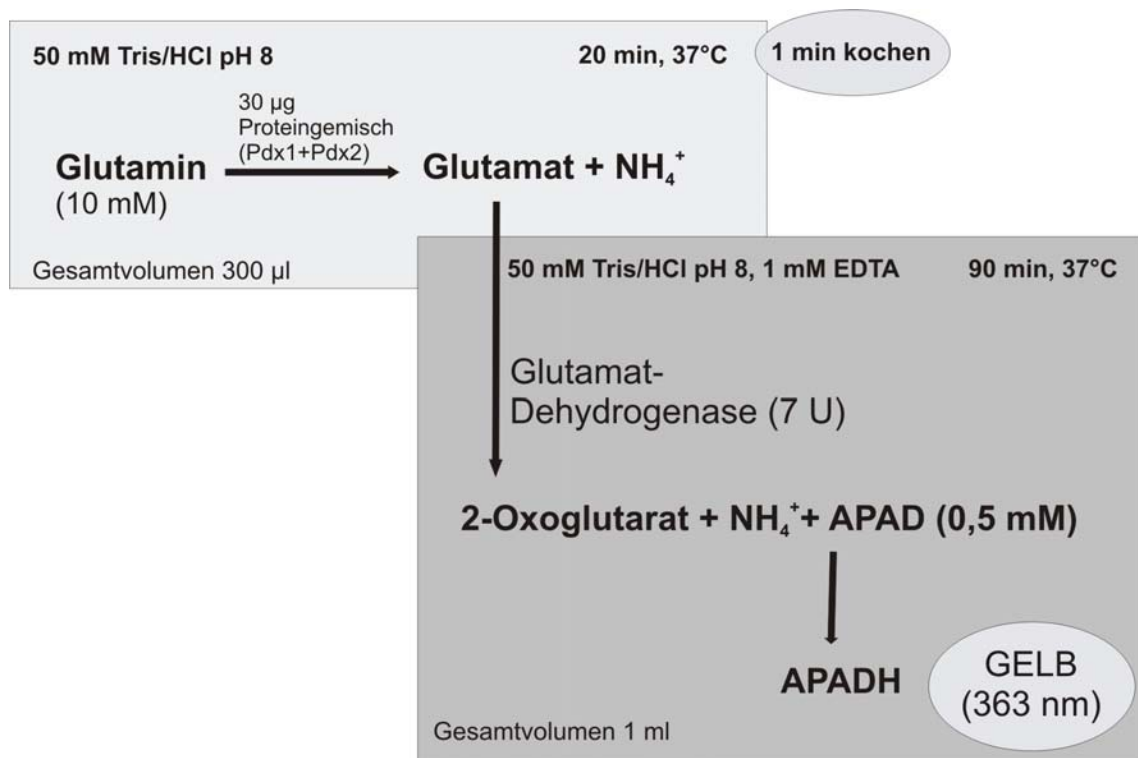


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Glutaminase-Aktivitätstests. Bestimmt wird die Menge an Glutamat, die durch den Umsatz von Glutamin durch das Enzym Pdx2 gebildet wurde.

2.5.4 Nachweis der Bildung von PLP über *Pf*ODC

Zur Bestimmung der Aktivität der plasmodialen ODC wurden 1-2 µg *Pf* SamDC/ODC in einem Reaktionsansatz aus 40 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 µM Ornithin, 125 nCi ¹⁴C-Ornithin und 10 µM PLP in einem Gesamtvolumen von 250 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Das entstehende radioaktiv markierte CO₂ wurde an einem mit 40 µl „Solvable“-Flüssigkeit benetzten Filterpapier gebunden. Anschließend wurden 0.5 ml 50% (v/v) Trichloressigsäure (TCA) und 0.5 ml 0,1 M NaHCO₃ zum Testansatz gegeben und dieser erneut für 10 min inkubiert. Die Filterpapiere wurden in Szintillationsröhrchen überführt, 4 ml Ultima Gold-Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Proben im TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer (United Technologies Packard) gemessen. Zum Nachweis der Bildung von PLP durch die Enzyme *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 wurden an

Stelle von 10 μ M PLP 150 μ l der Ansätze des *PfPdx1/PfPdx2*-Aktivitätstests zum *Pf* ODC-Testansatz gegeben.

2.5.5 Mutagenese von *PfPdx1* und *PfPdx2*

Zur Herstellung von Mutanten der Proteine *Pf Pdx1* und *Pf Pdx2* wurden verschiedene Aminosäuren mittels Site-directed-Mutagenesis-PCR ausgetauscht. Als Templates für die PCR dienten die Expressionskonstrukte IBA3-*PfPdx1* und IBA3-*Pf Pdx2*. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Die Mutante *Pf Pdx1*RHE-AAA wurde mit Hilfe der Overlap-Mutagenese-PCR generiert und das erhaltene PCR-Produkt anschließend in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert.

Tab. 2.1: Sequenzen der für die Mutagenese verwendeten Primer. Mutationsstellen sind fett gedruckt, mit der Mutation eingefügte Restriktions-Schnittstellen unterstrichen.

Name	Sequenz (5' - 3')
<u>Pdx1</u>	
PfPdx1-D26A-S	GCTTAAAGGAGGAGTTATTATGGCTGTAAAAAGTGTAGAACAAGC
PfPdx1-D26A-AS	GCTTGTCTACACTTTTTACAGCCATAATAACTCCTCCTTTAAGC
PfPdx1-K83A2-S	GTTTCTATTAATGTTCTTGCTGCTGTTTCGTATTGGTCATTTTG
PfPdx1-K83A2-AS	CAAAATGACCAATACGAACAGCAGCAAGAACATTAATAGAAAC
PfPdx1-K151A-S	GGAGCTTCTATGATAAGAAGCTGCCGGCGAAGCTGGTACAGGTAATATTATAG
PfPdx1-K151A-AS	CTATAATATTACCTGTACCAGCTTCGCCGGCAGTTCTTATCATAGAAGCTCC
PfPdx1-R85A-S	GTTCTTGCTAAAGTTGCAATTGGTCATTTTGTGGAAG
PfPdx1-R85A-AS	CTTCAACAAAATGACCAATTGCAACTTTAGCAAGAAC
PfPdx1-H88A-S	CTTGCTAAAGTTCGTATTGGCGCCTTTGTTGAAGCACAAATTTTAG
PfPdx1-H88A-AS	CTAAAATTTGTGCTTCAACAAAAGCGCCAATACGAACTTTAGCAAG
PfPdx1-E91A-S	GTATTGGTCATTTTGTGCGCAGCACAAATTTTAGAAGAGC
PfPdx1-E91A-AS	GCTCTTCTAAAATTTGTGCTGCAACAAAATGACCAATAC
PfPdx1-RHE-AAA-S	CGTTTCTATTAATGTTCTTGCTAAAGTTGCTATTGGCGCCTTTGTTGCAGCACA AATTTTAGAAGAGCTTAAAATTG

PfPdx1-RHE-AAA-AS	CAATTTTAAGCTCTTCTAAAATTTGTGCT GC AACAAAG GGCGCCAATAGCAACT TTAGCAAGAACATTAATAGAAACG
PfPdx1-E107A-S	GCTTAAAATTGATATGATAGATGAAAGCGCTGTATTAACAATTG
PfPdx1-E107-AS	CAATTGTTAATACAGCGCTTTCATCTATCATATCAATTTTAAGC
PfPdx1-ERR-A-nar-S	GTATGTGGGTGTACAAATTTA GGCGCC GCTCTAG CAGCA ATATCTGAAG GAGCTTCTATG
PfPdx1-ERR-A-nar-AS	CATAGAAGCTCCTTCAGATATT GGCTGCT AGAGC GGCGCC TAAATTTGTAC ACCCACATAC
PfPdx1-H117A-S	CAATTGCTGATGAAATGCAT GCT ATTGATAAGCATAAAATTTAAAAC
PfPdx1-H117A-AS	GTTTTAAATTTATGCTTATCAAT AGCAT GCATTTTCATCAGCAATTG
PfPdx1G144P-S	CTAAGAAGAATATCTGA ACCAG CTTCTATGATAAGAAC
PfPdx1-G144P-AS	GTTCTTATCATAGAAGCT TGG TTCAGATATTCTTCTTAG
PfPdx1-G152P-S	GCTTCTATGATAAGA ACTAAA CCAGAAAGCTGGTACAGG
PfPdx1-G152P-AS	CCTGTACCAGCTTCT TGG TTTAGTTCTTATCATAGAAGC
PfPdx1-G155P-S	GA ACTAA AGGAGAAGCT CCT TACAGGTAATATTATAGAAGC
PfPdx1-G155P-AS	GCTTCTATAATATTACCTGT AGG AGCTTCTCCTTTAGTTC
PfPdx1-G144A-S	CTAAGAAGAATATCTGA AGCT GCTTCTATGATAAGA ACTAA AGG
PfPdx1-G144A-AS	CCTTTAGTTCTTATCATAGAAGC AGCT TTCAGATATTCTTCTTAG
PfPdx1-G152A-NaeI-S	CTATGATAAGA ACTAAA GCTGAAG CCGGC CACAGGTAATATTATAGAAGC
PfPdx1-G152A-NaeI-AS	GCTTCTATAATATTACCTGT GCCGGC TTC AGCT TTAGTTCTTATCATAG
PfPdx1-G155A-S	GATAAGA ACTAA AGGAGAAGCT GCT TACAGGTAATATTATAGAAG
PfPdx1-G155A-AS	CTTCTATAATATTACCTGT AGC AGCTTCTCCTTTAGTTCTTATC
PfPdx1-K189A-S	GTGAAGTCTATCATTTTGCT GCT AAAATAAATGCACCTATCGATC
PfPdx1-K189A-AS	GATCGATAGGTGCATTAATTTT AGC AGCAAAATGATAGACTTCAC
<u>Pdx2</u>	
PfPdx2-E53Y-S	GGGCTTGTAATTCCAGGTGGAT ATT CCACA ACTGT ACGTCG
PfPdx2-E53Y-AS	CGACGTACAGTTGTGGA ATAT CCACCTGGAATTACAAGCCC
PfPdx2-R154W-S	CTTAACAGCGGCCTGCATAT TGGG CACCTTATATAAGAGAA
PfPdx2-R154W-AS	TTCTCTTATATAAGGTG CCCA TATGCAGGCCGCTGTTAAG

pASK-IBA3

pASK-IBA-S	GAGAAAAGTGAAATGAATAG
pASK-IBA-AS	CAGACAAAAAAAATGTCGCACAAT

2.5.6 Klonierung der Konstrukte IBA3-*PfPdx1His* und IBA3-*PfPdx2His*

Um die Enzyme *PfPdx1* und *PfPdx2* über Strep-Tactin-Sepharose coaufreinigen zu können, musste der standardmäßig an die Proteine fusionierte Strep-Tag durch einen 6x-His-Tag ersetzt werden. Dafür wurden die offenen Leserahmen beider Gene durch PCR mit den Oligonukleotiden *Pf Pdx1*-IBA3-S (5'-gcgcgcggtctcGAATGGAAAATCATAAAGATG ATGC-3') und *PfPdx1His*-IBA3-AS (5'-gcgcgcggtctcAGCGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGTCCTTGTGGTGTTAA AAATTTGGTGTGTTTC-3') bzw. *Pf Pdx2*-IBA3-S (5'-gcgcgcggtctcGAATGTCA GAAATAACTATAGGG-3') und *Pf Pdx2His*-IBA3-AS (5'-gcgcgcggtctcAGCGCTT TAATGATGATGATGATGATGACCTGAATATTTGTAATTTTTTAACC-3'), Schnittstellen unterstrichen, 6x-HisG-Tags fett gedruckt) unter Verwendung der Templates IBA3-*PfPdx1* und IBA3-*PfPdx2* amplifiziert. Die PCR-Produkte sowie der Vektor pASK-IBA3 wurden mit der Restriktionsendonuklease *Bsa* I für 3 h bei 50°C verdaut und nach der anschließenden Aufreinigung der DNA ligiert. Die Fusion des im Vektor codierten Strep-Tags an das Protein wurde durch Einfügen von zwei Stopp-Codons in den Antisense-Primer am Ende des His-Tags unterbunden.

2.5.7 Coaufreinigung von *PfPdx1Strep* und *PfPdx2His*

Für die Coaufreinigung von *PfPdx1Strep* und *PfPdx2His* bzw. *PfPdx1His* und *Pf Pdx2Strep* über Strep-Tactin-Sepharose wurden die Überstände der beiden Proteine nach dem Ultraschall-Aufschluss und der folgenden Zentrifugation gemischt und wie unter 2.3.4 beschrieben aufgereinigt.

2.5.8 Coaufreinigung von *PfPdx1* und *PfPdx2* aus Plasmodienextrakt

Zur Coaufreinigung von *Pf Pdx1*Strep und *Pf Pdx2*Myc aus Plasmodienextrakt wurden 1000 ml einer Kultur der cotransgenen Zelllinie 3D7-*Pf Pdx1*Strep/*Pf Pdx2*Myc (siehe Abschnitt 2.6.2) verwendet, die Parasiten bei einer Parasitämie von 8-10% Trophozoiten mittels Saponin-Lyse isoliert und in 8 ml Puffer W aufgenommen. Die Parasiten wurden durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen (ca. 8 Wiederholungen) aufgeschlossen und die Zellen nach Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF im Verhältnis 1:1000 für 45 min bei 4°C und 13.200 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Der Überstand wurde mit 150 µl Strep-Tactin-Sepharose unter Rotation bei 4°C inkubiert und auf eine Leersäule gegeben. Die Matrix wurde einmal mit Puffer W gewaschen und das Protein in 500 µl Puffer E eluiert. Das Eluat wurde in der SpeedVac eingengt, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels Western-Blot analysiert.

2.6 Überexpression von *PfPdx1* und *PfPdx2* in Plasmodien

2.6.1 Herstellung eines Transfektionsvektors mit Resistenz gegen Blasticidin S

Für die Klonierung der Transfektionskonstrukte wurde der Vektor pARL1a- (Crabb et al., 2004) verwendet. Dieser trägt als Selektionsmarker die humane Dihydrofolat-Reduktase (hDHFR), sowie als C-terminales Fusionsprotein die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Die hDHFR ist weniger sensitiv gegenüber einer Selektion mit dem Pyrimethamin-Analogon WR99210, als die plasmodiale Dihydrofolat-Reduktase und ermöglicht so die Positivselektion transgener Parasiten. Zur Cotransfektion von Parasiten mit zwei verschiedenen Konstrukten musste ein Transfektionsvektor mit einer Resistenz gegen einen weiteren Selektionsmarker hergestellt werden. Es wurde die Resistenz gegen Blasticidin S gewählt und die Blasticidin-Resistenz-Kassette unter Verwendung der Oligonukleotide Blasticidin-BamHI-S (5'-gcgcgatccATGCATAAGCCTTTGTCTCAAG-3', *Bam* HI-Schnittstelle unterstrichen) und Blasticidin-SacI-AS (5'-gcgcgagctcTTATTAGCCCTCCCA

CACATAACC-3', *Sac* I-Schnittstelle unterstrichen) mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt, sowie der Vektor pARL1a- wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Sac* I verdaut und miteinander ligiert. Durch den *Bam* HI/*Sac* I-Verdau wurde der Hauptteil der hDHFR-Kassette aus dem Plasmid herausgeschnitten und der Vektor verlor die Resistenz gegen WR99210, welche durch die Blasticidin S-Resistenz (Bsd) ersetzt wurde.

2.6.2 Klonierung der Überexpressionskonstrukte pARL-*Pf*Pdx1Strep-WR, pARL-*Pf*Pdx2Strep-WR, pARL-*Pf*Pdx2Myc-Bsd und pARL-*Pf*Pdx2 E53YMyc-Bsd

Um die Enzyme *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 in *P. falciparum* zu überexprimieren, wurden die vollständigen offenen Leserahmen der Gene in die Vektoren pARL1a- (WR) und pARL1a- (Bsd) kloniert.

Zur Herstellung des Überexpressionskonstruktes pARL-*Pf* Pdx1Strep-WR wurden die Oligonukleotide *Pf*Pdx1-pARL-Kpn-S (5'-gagaggtaccATGGAAAATCATAAAGATGATGC-3') und IBA3-Strep-Avr-AS (5'-gagacctaggTTATTATTTTTTCGAAC TGCGGG-3') verwendet und der offene Leserahmen durch PCR auf dem Template IBA3-*Pf* Pdx1 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn* I und *Avr* II verdaut und in den ebenso verdauten Vektor pARL1a- (WR) kloniert.

Die PCR zur Amplifikation von *Pf*Pdx2-Strep wurde mit den Oligonukleotiden *Pf* Pdx2-pARL-Kpn-S (5'-gcgcGGTACCATGTCAGAAATAACTATAGGGG-3') und IBA3-Strep-Avr-AS unter Verwendung des Expressionskonstruktes IBA3-*Pf* Pdx2 als Template durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Avr* II verdaut und in den Vektor pARL1a- (WR) kloniert.

Zur Herstellung der Konstrukte pARL-*Pf* Pdx2Myc-Bsd und pARL-*Pf* Pdx2E53Y Myc-Bsd wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden *Pf* Pdx2-pARL-Kpn-S (5'-gcgcgggtacc ATGTCAGAAATAACTATAGGGG-3') und *Pf* Pdx2-Myc-Avr-AS (5'-gagacctaggTTATTATAAATCTTCTTCTGATATTAATTTTTGTTCTGAATATTTGTAATTTTAACC-3') durchgeführt und die Sequenz von den Templates IBA3-*Pf*Pdx2

und IBA3-*PfPdx2E53Y* amplifiziert. Die PCR-Produkte, sowie der Vektor pARL1a⁻ (Bsd) wurden ebenfalls mit den Enzymen *Kpn* I und *Avr* II verdaut und ligiert.

Für die Klonierung der Konstrukte wurden AS-Primer verwendet, die zusätzlich zur genspezifischen Sequenz die Sequenz für einen Strep- bzw. Myc-Tag enthielten. Die Translation der Proteine führt so zu Tag-fusionierten Proteinen. Die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP), das normalerweise an die Proteine fusioniert wird, wurde durch Einfügen von zwei Stopp-Codons am Ende der Tag-Sequenzen unterbunden. Abbildung. 2.7 zeigt schematisch die hergestellten Konstrukte.

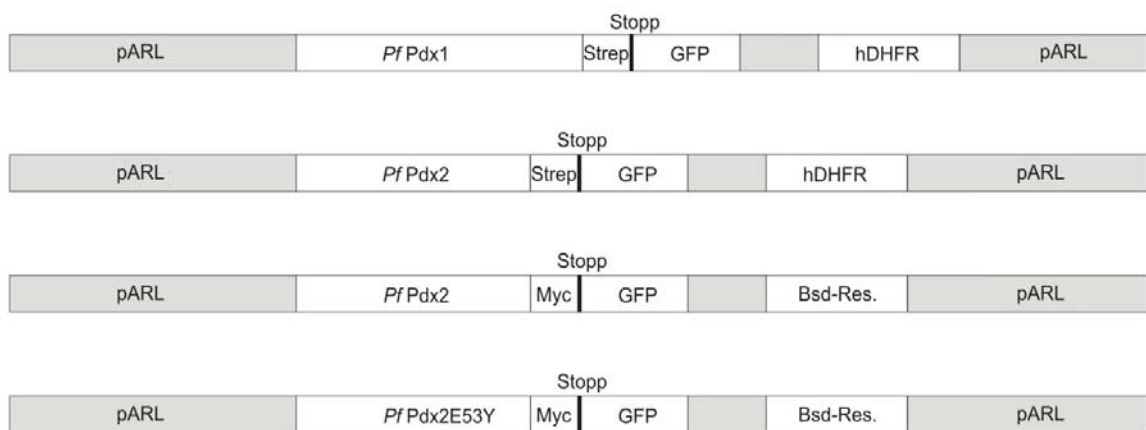


Abb. 2.7: Klonierschema der Überexpressionskonstrukte pARL-*PfPdx1Strep*-WR, pARL-*PfPdx2Strep*-WR, pARL-*PfPdx2Myc*-Bsd und pARL-*PfPdx2E53YMyc*-Bsd

Die Konstrukte pARL-*PfPdx1Strep*-WR, pARL-*PfPdx2Strep*-WR und pARL-*PfPdx2Myc*-Bsd wurden anschließend in Parasiten transfiziert. Nachdem die ersten transgenen Parasiten nachweisbar waren, wurde die transgene Zelllinie 3D7-*PfPdx1Strep* verwendet, um die Parasiten mit je einem zweiten Konstrukt, pARL-*PfPdx2Myc*-Bsd bzw. pARL-*PfPdx2E53YMyc*-Bsd, cozutransfizieren.

2.7 Methoden zur Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf die Vitamin B6-Biosynthese von *P. falciparum*

2.7.1 Analyse der Transkriptmenge von *PfPdx1* und *PfPdx2* mittels Northern-Blot

Um den Einfluss von oxidativem Stress auf Plasmodien zu untersuchen, wurden je 100 ml Zellkultur nach Zugabe von 4 nM Methylenblau, 5 µM Roseoflavin, 150 nM Cercosporin oder 50 mU/ml Glucoseoxidase für 4 h bzw. 5 h (Glucoseoxidase) bei 37°C inkubiert. Die Inkubation der Zellen in Gegenwart von Glucoseoxidase erfolgte in Medium mit 4 g/l Glucose. Die Parasiten wurden mittels Saponin-Lyse aus den Erythrozyten isoliert und die RNA mittels Northern-Blot analysiert.

2.7.2 Genomweites Screening mittels Microarray-Analyse

Zur Durchführung der Microarray-Analysen wurde eine Plasmodienkultur (10% Parasitämie, 5% Hämatokrit), die überwiegend junge Trophozoiten enthielt, einer erhöhten Belastung an oxidativem Stress ausgesetzt. Die Kultur wurde dafür 4 h bzw. 8 h mit 4 nM Methylenblau behandelt. Als Kontrolle wurde eine Hälfte der Ausgangskultur unbehandelt geführt und parallel zu den behandelten Zellen abgeerntet. Die Kulturen wurden pelletiert und die Erythrozyten nach einem Waschschrift mit 1x PBS bei -70°C gelagert.

2.7.2.1 Isolation von RNA aus *P. falciparum* mit dem RNeasy-Kit (Qiagen)

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation diente ein Erythrozytenpellet aus 10-15 ml Plasmodienkultur. Die Extraktion erfolgte über eine kombinierte Methode aus Bestandteilen des QiaShredder- und des RNeasy Mini-Kits (Qiagen) und TRI-Reagent (Sigma).

Das Plasmodienpellet wurde zunächst aufgetaut und in 600 ml Puffer RLT resuspendiert. 600 µl der Suspension wurden auf eine QiaShredder-Säule gegeben und für 1 min bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der

Durchfluss wurde auf zwei Eppendorf-Gefäße verteilt und die verbliebene Zellsuspension mit weiteren 200 µl Puffer RLT vermischt, ebenfalls auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum auf die beiden Eppendorf-Gefäße verteilt, die Suspension mit 700 µl TRI-Reagent (Sigma) versetzt und durch vortexen gemischt. Nach Inkubation des Ansatzes für 5 min bei RT wurden 450 µl Chloroform hinzugegeben und erneut gevortext. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in frische Eppendorf-Gefäße überführt, mit 700 µl 70% (v/v) Ethanol versetzt, auf eine RNeasy-Säule geladen und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde pro Zentrifugationsschritt mit 700 µl Lösung beladen und die Zentrifugation wiederholt, bis die Lösung vollständig aufgebraucht war.

Nach Zugabe von 350 µl Waschpuffer RW1 wurde die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und als nächstes ein DNaseI-Verdau auf der Säule durchgeführt. Dafür wurden 10 µl DNaseI mit 70 µl Puffer RDD (RNase-freies DNaseI-Set) gemischt, auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde daraufhin erneut mit 350 µl Puffer RW1 beladen und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 500 µl Puffer RPE sowie eine Zentrifugation für 2 min bei 10.000 rpm zum Entfernen von Ethanolresten von der Säule. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und nach 3 min Inkubation bei RT für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die beiden pro Probe gewonnenen Eluate wurden vereinigt und die Konzentration der RNA mittels NanoDrop ermittelt. Der Quotient aus OD₂₈₀ und OD₂₆₀ musste dabei größer 1,8 sein, ansonsten ist die RNA für die nachfolgende cDNA-Synthese nicht geeignet. Die Eluate wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.7.2.2 Synthese von Amminoallyl-dUTP-markierter cDNA

12 µg RNA wurden in der SpeedVac auf ein Volumen von 16,5 µl eingengt. Anschließend wurden 5 µl Random Primer Stock (0,5 µg/µl) und 2,5 µl Oligo d(T) Primer Stock (2 µg/µl) zugegeben, der Ansatz für 15 min bei 70°C inkubiert und für 5 min auf Eis abgekühlt.

Während dessen wurde ein 10x Amminoallyl-Labeling-Mix vorbereitet. Dieser bestand pro Reaktion aus 0,5 µl 100 mM dATP, je 0,25 µl 100 mM dCTP, dGTP und dTTP, 2,5 µl 10 mM Amminoallyl-dUTP, sowie 1,75 µl RNase-freiem dH₂O.

Zu dem Ansatz wurden im Folgenden 10 µl 5x FS-Puffer (Superscript-Puffer), 5 µl 100 mM DTT, 0,25 µl RNase-freies dH₂O, 2,25 µl Superscript Reverse Transkriptase (Invitrogen) und optional 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor zugegeben. Der Mastermix wurde zur vorbehandelten RNA gegeben und der Ansatz für 16-20 h bei 42°C inkubiert.

2.7.2.3 RNA-Hydrolyse, cDNA-Aufreinigung und Dye-Inkorporation

Um die im Reaktionsansatz verbliebene RNA zu hydrolysieren, wurden zu jeder cDNA-Synthese-Reaktion je 10 µl 0,5 M EDTA und 1 N NaOH gegeben und der Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die cDNA mit Hilfe des Nucleospin Extract II-Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Es wurden dabei 10 Vol. Binding Buffer NT verwendet, um eine vollständige Bindung der cDNA an die Säule zu gewährleisten. Die Elution erfolgte mit 2x 31,5 µl RNase-freiem dH₂O. Die Konzentration wurde unter Verwendung von 1,5 µl Lösung mittels NanoDrop bestimmt.

Zur Markierung der DNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 wurden 2 µg cDNA in der SpeedVac auf ein Volumen von 2,5 µl eingengt. Dann wurden 5 µl 0,2 M Na₂CO₃ Puffer, pH 9,0 und 2 µl Cy3-Dye bzw. 5 µl Cy5-Dye zur cDNA gegeben und die Ansätze für 2 h im Dunkeln in einem Exikator inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Aufreinigung der Reaktionen mit dem Qiagen PCR-

Purification-Kit (Qiagen) unter Verwendung von 10 Vol. Binding-Puffer entfernt und die Effizienz der Labeling-Reaktion mittels NanoDrop bestimmt.

2.7.2.4 Prähybridisierung

Zur Prähybridisierung wurden die Microarray-Slides in vorgewärmter OpArray Pre-Hyb Solution (Operon) für 60 min bei 42°C inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurden die Slides für 5 min in Waschlösung 1 inkubiert, danach direkt in dH₂O überführt und für 30 sec gewaschen. Dieser Schritt wurde noch zwei Mal wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Arrays in einer Microplate-Zentrifuge für 15 sec getrocknet.

2.7.2.5 Hybridisierung

Eine Hybridisierungskassette wurde gründlich mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt und gut getrocknet. In die Vertiefungen in der Kassette wurden 15 µl dH₂O pipettiert und die getrockneten Microarrays in der Kassette platziert. Jeder Array wurde mit einem ebenfalls in 70% (v/v) Ethanol gereinigten Lifter-Slip abgedeckt. Die folgenden Schritte wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

Für die Hybridisierung der Arrays wurden je 50 pmol Cy3- und Cy5-markierte cDNA verwendet und die Sonden wurden wie in Tab. 2.2 dargestellt kombiniert.

Tab. 2.2: Sondenkombinationen zur Hybridisierung der Microarrays. 3D7 (I) und 3D7 (II): Behandlung von zwei unabhängigen Zellkulturen für 4 Stunden mit Methylenblau, 3D7 (8h): Behandlung der Zellen mit Methylenblau für 8 Stunden.

Anzahl Slides	Cy3	Cy5	Dye-Menge
2	3D7 (I) unbehandelt	3D7 (I) + Methylenblau	je 50 pmol
2	3D7 (II) unbehandelt	3D7 (II) + Methylenblau	je 50 pmol
1	3D7 (I) + Methylenblau	3D7 (I) unbehandelt	je 50 pmol
1	3D7 (II) + Methylenblau	3D7 (II) unbehandelt	je 50 pmol
2	3D7(8h)+ Methylenblau	3D7 (8h) unbehandelt	je 40 pmol

Das Volumen wurde auf 2,5 µl eingengt, mit 45 µl OpArray Hyb-Buffer (Operon) gemischt und die Proben für 5 min bei 65°C denaturiert. Die Lösung wurde direkt an den Rand des Lifter-Slips pipetiert, von wo aus sie sich unter das Glas sog und auf dem Array verteilt wurde. Die Hybridisierungskassette wurde fest verschlossen, mit Alufolie abgedeckt und über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen hybridisiert.

Zum Entfernen der Sondenreste wurde Waschlösung 2 auf 42°C vorgewärmt und die Arrays darin für 10 min bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Slides direkt in Waschlösung 3 überführt und für weitere 10 min bei RT gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei RT in Waschlösung 3, wonach die Slides zwei Mal für 5 min in Waschlösung 4 inkubiert wurden. Danach wurden die Arrays in einer Microslide-Zentrifuge getrocknet, dunkel gelagert und so schnell wie möglich im GenePIX 4000B-Microarray-Scanner (Axon Instruments) gescannt.

Dabei wurden die zuvor in die Sonde integrierten Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 mit Licht der Wellenlängen 532 nm bzw. 635 nm angeregt und die Intensitäten der roten und grünen Fluoreszenz für alle Spots gemessen.

Die Bilder wurden für die weitere Analyse gespeichert und im nächsten Schritt überlagert, was zu einem Bild mit roten, grünen und gelben Spots führen sollte. Die roten und grünen Spots zeigten eine höhere bzw. niedrigere Transkriptmenge der entsprechenden Gene unter Behandlung der Zellen mit Methylenblau, bei gelben Spots waren die Intensitäten beider Farbstoffe gleich und die Transkriptmengen unter Methylenblau-Behandlung identisch zu denjenigen unter Standardbedingungen

Die weitere Bearbeitung erfolgte mit der Software GenePix Pro 5.1, sowie der Microarray-Analyse-Software LimmaGUI (Wettenhall und Smyth, 2004).

2.8 Methoden zur Analyse der plasmodialen Paranitrophenylphosphat-Phosphatase (*Pf*PNPase)

2.8.1 Klonierung und Expression der *Pf*PNPase

Der offene Leserahmen des Gens PF07_0059, einer putativen Paranitrophenylphosphat-Phosphatase, wurde mittels RT-PCR von *P. falciparum* gDNA amplifiziert. Die gewonnene cDNA wurde als Template für eine PCR mit den Oligonukleotiden *Pf* PNPase-IBA3-S (5'-gcgcgcggtctcGAATGGCTTTAATTTATTCGAGTG-3') und *Pf* PNPase-IBA3-AS (5'-gcgcgcggtctcAGCGCTTAATAATTCCGATATGGATTTC-3') verwendet (*Bsa* I-Schnittstellen unterstrichen). Das PCR-Produkt wurde mit dem Enzym *Bsa* I verdaut und in den ebenso geschnittenen Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert.

Nach der Isolation eines positiven Klons und Sequenzierung des Konstruktes wurde das Plasmid in *E. coli* BLR DE3-Zellen transformiert und das Protein bei 37°C für 4 h exprimiert.

2.8.2 Aktivitätstest der *Pf*PNPase (Motomizu et al, 1983)

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der *Pf* PNPase wurden 20 µl Proteinlösung, 1,25 mM MgCl₂ und 1 mM Paranitrophenylphosphat in eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben und mit 150 mM MOPS, pH 7,5 auf 150 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Absorption der Probe bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen. Bestimmt wird hierbei die Menge an entstandenem Paranitrophenylphosphat, das zu einer Gelbfärbung der Probe führt. Diese kann photometrisch detektiert werden.

2.8.3 Ermittlung der Substratspezifität der *Pf*PNPase

Zur Untersuchung der Substratspezifität des Enzyms wurden im Aktivitätstest anstatt 1 mM Paranitrophenylphosphat je 1 mM AMP, ADP, ATP, CTP, TMP, TPP,

Glucose-6-Phosphat (G-6-P), Fructose-6-Phosphat (F-6-P), sowie Pyridoxalphosphat (PLP) als Substrat angeboten. Nach der Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 0,225 mM (= 30 mg/ml) Ammoniummolybdat in 4,5 M H₂SO₄ und erneute Inkubation für 10 min bei RT gestoppt. Danach wurden 200 µl 0,5 µM Malachit-Grün in 0,1% (v/v) Polyvinylalkohol (PVA) zum Reaktionsansatz gegeben und nach einer Inkubation von 20 min bei RT die Absorption bei 620 nm im ELISA-Reader bestimmt.

2.8.4 Klonierung eines GFP-Fusionskonstruktes

Um die *Pf* PNPase in Parasiten lokalisieren zu können, wurde ein GFP-Fusionsprotein hergestellt. Dafür wurde der vollständige offene Leserahmen mit den Oligonukleotiden *Pf* PNPase-pARL-Kpn-S (5`-gcgcgggtaccATGGCTTTAATTTATTC GAGTG-3`) und *Pf* PNPase-pARL-Avr-AS (5`-gagacctaggACCTGCCCATTTTTGTT TAGATG-3`, Schnittstellen unterstrichen) vom bereits vorhandenen Expressionskonstrukt *Pf* PNPase-IBA3 über PCR amplifiziert und das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Avr* II geschnitten. Das PCR-Produkt wurde dann in den ebenso verdauten Vektor pARL1a- kloniert.

Nach Isolation eines positiven Klons wurde die Plasmid-DNA in *P. falciparum* transfiziert.

2.8.5 Lokalisierung mittels GFP-Live Imaging

Um die *Pf* PNPase in den Parasiten zu lokalisieren, wurde 1 ml der transgenen Plasmodienkultur im Verhältnis 1: 100.000 mit Hoechst-Farbstoff versetzt.

40 µl der so behandelten Kultur wurden auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und mit dem Axioskop 2 plus-Mikroskop (Zeiss) im Durchlicht-, im Blau- sowie im GFP-Kanal analysiert und fotografiert. Die Bilder wurden mit Hilfe der Software OpenLab 5 sowie Adobe Photoshop CS2 nachbearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Der PLP-Synthase-Komplex von *P. falciparum*

3.1.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität von *PfPdx1* und *PfPdx2*

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der Enzyme *PfPdx1* und *PfPdx2* wurden die offenen Leserahmen zunächst in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert. Anschließend wurden die Proteine rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Die Expressionsleistung lag für *PfPdx1* bei 4 mg und für *PfPdx2* bei 2,5 mg pro Liter Expressionskultur.

Zur Bestimmung der Aktivität des *PfPdx1/PfPdx2*-Enzymkomplexes wurde der Aktivitätstest der vollständigen PLP-Synthesereaktion (siehe Abschnitt 2.5.1) durchgeführt. Die spezifische Aktivität des Enzymkomplexes betrug 662 ± 54 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein (n=6).

Wird im beschriebenen Aktivitätstest Glutamin durch NH_4Cl als Substrat ersetzt, lässt sich die Aktivität des *Pdx1*-Enzyms bestimmen (siehe Kapitel 2.5.2). Diese betrug für *PfPdx1* 746 ± 76 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (n=6) und lag somit im gleichen Bereich wie die Aktivität des Gesamtkomplexes.

Zur Bestimmung der Aktivität von *PfPdx2* wurde der Glutaminase-Aktivitätstest (vergl. Abschnitt 2.5.3) durchgeführt. Sie betrug 266 ± 19 nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (n=6).

3.1.2 Nachweis von PLP als Reaktionsprodukt

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem in der *PfPdx1/PfPdx2*-Enzymreaktion gebildeten Produkt um PLP handelt, wurden die Reaktionsprodukte aus dem *Pdx1*-Aktivitätstest mit Hilfe der plasmodialen Ornithin-Decarboxylase (*PfODC*)

analysiert. Bei der *Pf* ODC handelt es sich um ein Schlüsselenzym der Polyamin-Biosynthese, welches für seine Katalyse PLP als Cofaktor benötigt.

Anstelle der Zugabe von PLP wurden 150 µl der Ansätze der zuvor durchgeführten Aktivitätstests von *Pf* Pdx1 zum ODC-Testansatz gegeben und die Aktivität der *Pf* ODC bestimmt (siehe Abschnitt 2.5.4). Als Kontrollen dienten Testansätze ohne Zugabe von PLP und mit Zugabe von Pyridoxin bzw. Pyridoxal.

Die *Pf* ODC zeigte bei Fehlen von PLP sowie beim Angebot von 10 µM Pyridoxin oder 10 µM Pyridoxal keine Aktivität. Bei Zugabe der Reaktionsprodukte der *Pf* Pdx1-Reaktion hingegen war eine Aktivität von $5 \pm 1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=3) nachweisbar. Die Aktivität bei Zugabe von 10 µM PLP, die als Positivkontrolle diente, betrug $9 \pm 1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein (n=3).

3.1.3 Strukturanalyse des plasmodialen PLP-Synthase-Enzyms *Pf* Pdx1

Analysen der Kristallstruktur des Pdx1- (PdxS) Enzyms von *Geobacillus stearothermophilus* ließen eine Beteiligung der Aminosäuren D24, K82 und K149 an der Bindung von Ribulose-5-Phosphat und somit an der Katalyse der PLP-Synthese vermuten (Zhu et al., 2005).

Auch für die Aminosäurereste K149 im Pdx1-Homolog YaaD von *Bacillus subtilis* und K82 im YaaD-Enzym von *Thermotoga maritima* wurde kürzlich eine kovalente Bindung des Substrates Ribulose-5-Phosphat beschrieben (Burns et al., 2005; Zein et al., 2006).

Das in Abbildung 3.1 dargestellte Alignment der Aminosäuresequenz von *Pf* Pdx1 mit den oben genannten Sequenzen identifizierte die homologen Aminosäuren D26, K83 und K151 für das plasmodiale Enzym (Abb. 3.1, \$).

Weitere Analysen der Kristallstruktur des PLP-Synthase-Komplexes YaaD/YaaE von *T. maritima* ließen auf eine Beteiligung der Aminosäurereste H116, R131, E135, R138, R139, K150 und K188 an einer Phosphatbindungsstelle schließen (Zein et al., 2006). Bis auf R132 sind alle genannten Aminosäurereste auch in der Sequenz des

plasmodialen Pdx1-Enzyms konserviert. Die zugehörigen Positionen sind H117, E136, R139, R140 (Abb 3.1, £), K151 (Abb 3.1, \$) und K189 (Abb. 3.1, Ø).

<i>BsYaaD</i>	-----MAQTGTERVKRGMAEMQKGGVIMDVINAE	29
<i>GsPdxS</i>	MGSSHHHHHSSGLVPRGSGTENLTPQHMASMALTGTDVVKRGMAEMQKGGVIMDVVNAE	60
<i>TmYaaD</i>	-----MEIKKGTWIKKGFEMFKGGVIMDVTSAE	30
<i>PfPdx1</i>	-----MENHKDDAVLLKHGWCCEMLKGGVIMDVKSVE	31
	. : : * : * . * * * * * * * . . *	
	\$	
<i>BsYaaD</i>	QAKIAEEAGAVAVMALERVPADIRAAGGVARMADPTIVEEVMNAVSIPVMAKARIGHIVE	89
<i>GsPdxS</i>	QAKIAEAAAGAVAVMALERVPADIRAAGGVARMADPTIVEEVMNAVSIPVMAKVRIGHYVE	120
<i>TmYaaD</i>	QAKIAEEAGAVAVMALERVPADIRKEGGVARMASIAKIREIMEAVSIPVMAKVRIGHIAE	90
<i>PfPdx1</i>	QAKIAEEAGAIGVMLENIPSELNKEGVARSVDPSKVEEIKKCVSINVLAKVRIGHFVE	91
	***** * * * : * * . * * . * : * : * : * * * * * . . : : . * : : * * * * * * * * * * . *	
	\$ # # #	
<i>BsYaaD</i>	ARVLEAMGVDYIDSEVLTPADEEFHLNKNNEYTVPFVCGCRDLGEATRRIAEGASMLRTK	149
<i>GsPdxS</i>	ARVLEALGVDYIDSEVLTPADEEFHIDKRQFTVPFVCGCRDLGEAARRIAEGASMLRTK	180
<i>TmYaaD</i>	AKILEELGVDFIDSEVLTPAADDRFHINKHEFKVPFVCGARDLGEALRRIAEGAAMIRTK	150
<i>PfPdx1</i>	AQILEELKIDMIDSEVLTIADEMHHIDKHKFKTPFVCGCTNLGEALRRISEGASMIRTK	151
	* : * * * : * : * * * * * * * * * * * : * : * : * : * * * * * . : * * * * * * * * * * * * * * *	
	Ø £ Ø/£ ££ ¥ \$	
<i>BsYaaD</i>	GEPGTGNIVEAVRHRMKVNAQVRKVVAMSEDELMTEAKNLGAPYELLQIKKDGKLPVNVN	209
<i>GsPdxS</i>	GEPGTGNIVEAVRHRMKVNAQIRKVVNMSEDELVAEAKQLGAPVEVLRREIKRLGRLPVNVN	240
<i>TmYaaD</i>	GEAGTGNVVEAVKHMRVMEQIKQVTKMEDEELVAYGKEIGAPVELLREVKRLGRLPVNVN	210
<i>PfPdx1</i>	GEAGTGNIIIEAIKHIRTVNNEIKYLCSLSDSEVYHFVAKKINAPIDLVLTKKLRKLPVNVN	211
	* * . * * * * : * * * * * * * * * * * : * * : * : * * * * * : * * : * * * * * * * *	
	¥ ¥ Ø	
<i>BsYaaD</i>	FAAGGVATPADAALMMQLGADGVFVSGIFKSDNPAKFAKAIVEATHTFTDYKLIAELSK	269
<i>GsPdxS</i>	FAAGGVTPADAALMMHLGADGVFVSGIFKSENPEKYARAIVEATHTHYEDYELIAHLSK	300
<i>TmYaaD</i>	FAAGGVATPADAALMMLGADGVFVSGIFKSKDPRKMAKAMVLAVTYWDNPRILLKISE	270
<i>PfPdx1</i>	FAAGGVATPADAAMCMLGMDGVFVSGIFESENPCKMAASIVSAVSNFNNPKILLDVSM	271
	***** : ***** : *	
<i>BsYaaD</i>	ELGTAMKG-IEISNLLPEQRMQERGW----	294
<i>GsPdxS</i>	GLGGAMRG-IDIATLLPEHRMQERGW----	325
<i>TmYaaD</i>	DIGEPMRG-LDVEEL--EVRMQERGW----	293
<i>PfPdx1</i>	NLGKAMCGSTRVSDKWKNKNEEHTKFLTPQ	301
	: * . * * : : . : . :	

Abb. 3.1: Alignment der Aminosäuresequenzen von Pdx1 verschiedener Organismen. Identische Sequenzabschnitte sind durch Sternchen, ähnliche Bereiche je nach Grad der Ähnlichkeit durch Doppelpunkte oder einfache Punkte gekennzeichnet. Grau unterlegt sind Aminosäuren, die in *Pf* Pdx1 zu Alanin mutiert wurden: \$: Aktives Zentrum (D26, K83, K151); £: Substratbindungsstelle für Glycerinaldehyd-3-Phosphat (E136, R139, R140) #: Pdx1-Pdx1-Interaktion (R85, H88, E91); Ø: mögliche Interaktionspartner von K151 (E107, E136, K189); ¥: K151 flankierende, hoch konservierte Glycin-Reste (G144, G152, G155).

Ein Strukturmodell der Pdx1-Enzyme von *P. falciparum*, dargestellt in Abb. 3.2, zeigte außerdem eine mögliche Involvierung der Aminosäurereste R85, H88 und E91 in die Interaktion zwischen verschiedenen Pdx1-Molekülen zur Bildung des Pdx1-Enzymkomplexes (Abb. 3.1; Abb. 3.2, Mitte; (Müller et al., 2008)).

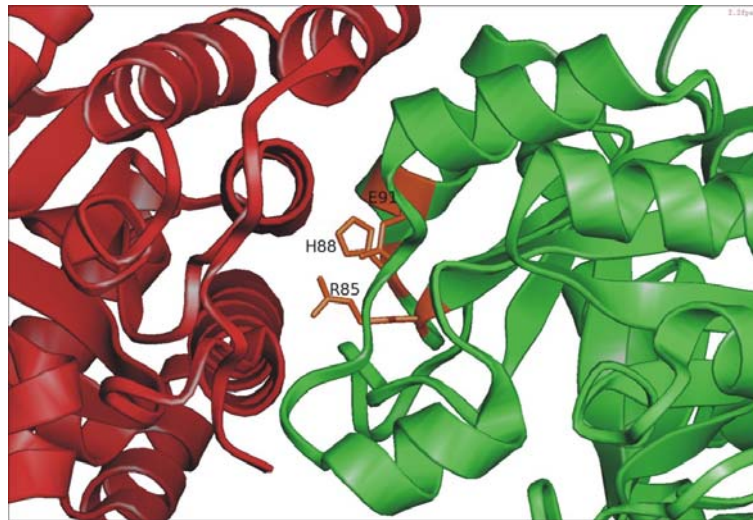


Abb. 3.2: Strukturmodell von zwei im selben hexameren Ring lokalisierten *PfPdx1*-Proteinen zur Darstellung der an der Bindung zwischen *PfPdx1*-Molekülen beteiligten Aminosäuren R85, H88 und E91.

3.1.4 Mutagenese des aktiven Zentrums und der alternativen Substratbindungsstelle von *PfPdx1*

Zur Analyse des aktiven Zentrums und der potentiellen Phosphatbindungsstelle von *Pf Pdx1* wurden verschiedene Aminosäurereste im Protein mutiert. Die Aminosäuren D26, K83 und K151 wurden einzeln, sowie als Dreifachmutante DKK mittels Site-directed-Mutagenesis-PCR gegen Alanin ausgetauscht, um ihre Beteiligung an der Bildung des aktiven Zentrums zu untersuchen. Die Aminosäuren E136, R139 und R140, die möglicherweise die Bindungsstelle des zweiten Substrats, Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G-3-P), formen, wurden in Form der Dreifachmutante *PfPdx1ERR* (Abb. 3.1, £) ebenfalls mittels Site-directed-Mutagenesis-PCR zu Alanin mutiert. Die Proteine wurden zunächst exprimiert und aufgereinigt. Pro

Liter Expressionskultur konnten 1 mg *PfPdx1D26A*, 4 mg *PfPdx1K83A*, 3,5 mg *PfPdx1K151A* und 6 mg *PfPdx1DKK*, bzw. 9 mg *PfPdx1ERR* isoliert werden.

Die Aktivität der Einzelmutanten *PfPdx1D26A*, *PfPdx1K83A*, *PfPdx1K151A*, sowie der Dreifachmutanten *PfPdx1DKK* (D26, K83, K151) und *PfPdx1ERR* (E136, R139, R140) wurde im Pdx1-Aktivitätstest mit Ammoniumchlorid bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 dargestellt. Da die hierbei gemessene Aktivität für das WT-Enzym derjenigen entsprach, die im vollständigen Aktivitätstest unter Einsatz von *PfPdx1* und *PfPdx2* sowie dem Substrat Glutamin gemessen wurde, wurde zur Analyse der *PfPdx1*-Mutanten auf die Durchführung des vollständigen Aktivitätstests verzichtet. Der Pdx1-Aktivitätstest ergab, dass alle Mutanten inaktiv waren.

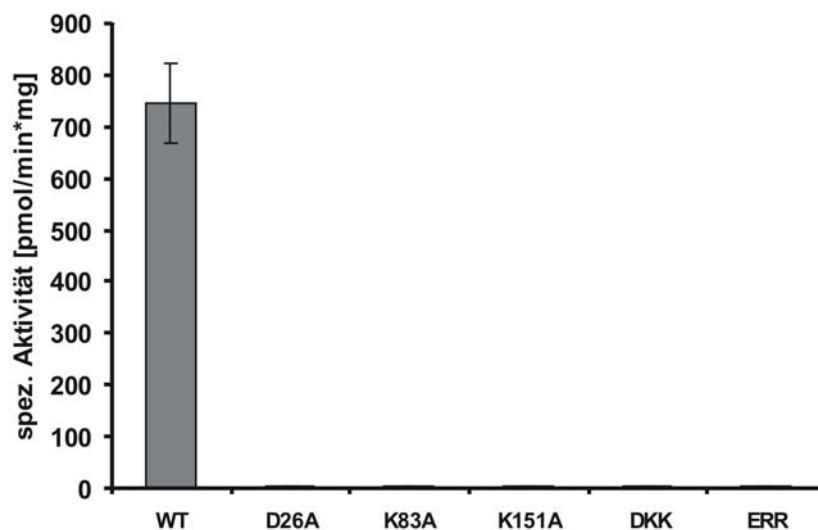


Abb. 3.3: Aktivität der Mutanten *PfPdx1D26A*, *PfPdx1K83A*, *PfPdx1K151A*, *PfPdx1DKK* und *PfPdx1ERR* im Aktivitätstest mit Ammoniumchlorid im Vergleich zum WT.

Die Aktivität von *PfPdx2* in Kombination mit den mutierten *PfPdx1*-Enzymen wurde mit Hilfe des Glutaminase-Aktivitätstests bestimmt. Dieser gibt neben der Aktivität des Pdx2-Enzyms auch Auskunft über die Bindung zwischen Pdx1 und Pdx2, da Pdx2 nur dann Aktivität zeigt, wenn es an Pdx1 gebunden ist (Wrenger et al., 2005).

Die spezifische Aktivität für *Pf* Pdx2 im Glutaminase-Aktivitätstest lag in Kombination mit der *Pf* Pdx1-Mutante D26A bei $285 \pm 30 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=6), mit *Pf* Pdx1K83A bei $291 \pm 22 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=7), mit *Pf* Pdx1K151A bei $251 \pm 16 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=6) und für die Dreifachmutante *Pf* Pdx1DKK bei $274 \pm 44 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein (n=6). Ein ähnliches Ergebnis erhielt man auch für die Dreifachmutante *Pf* Pdx1ERR der zweiten Substratbindungsstelle. Diese zeigte eine spezifische Aktivität von $268 \pm 8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein (n=6). Die Aktivität von *Pf* Pdx2 lag somit in allen Fällen im Bereich der in Kombination mit dem *Pf* Pdx1-WT-Enzym ermittelten Aktivität von $266 \pm 19 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 3.4.

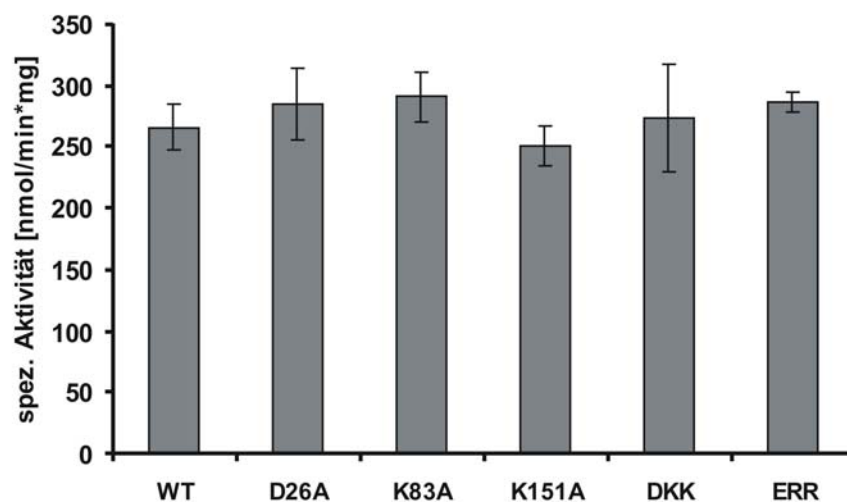


Abb. 3.4: Aktivität von *Pf* Pdx2 im Glutaminase-Aktivitätstest in Kombination mit den Mutanten des aktiven Zentrums (*Pf* Pdx1D26A, *Pf* Pdx1K83A, *Pf* Pdx1K151A, *Pf* Pdx1DKK) und einer möglichen zweiten Substratbindungsstelle von Pdx1 (*Pf* Pdx1ERR).

3.1.5 Coaufreinigung von *Pf* Pdx2His mit *Pf* Pdx1

Um die Bindungsfähigkeit von *Pf* Pdx2 an das *Pf* Pdx1-Enzym zu untersuchen, wurden beide Proteine über den bei der rekombinanten Expression an das Pdx1-Enzym fusionierten Strep-Tag coaufgereinigt und mittels Western-Blot analysiert.

Dafür wurde der Strep-Tag des *Pf*Pdx2-Enzyms mittels PCR gegen einen 6x-His-Tag ausgetauscht (siehe Kapitel 2.5.6). Die Proteine wurden in *E. coli* rekombinant exprimiert und die Bakterienzellen per Ultraschall aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation für 50 min bei 20.000 rpm wurden die Überstände der *Pf*Pdx1- und *Pf*Pdx2His-Expressionen gemischt und die Proteine unter Verwendung von Strep-Tactin-Sepharose aufgereinigt. Als Kontrollen wurden beide Enzyme separat aufgereinigt, um eine unspezifische Bindung von *Pf* Pdx2His an die Sepharose auszuschließen.

Die Western-Blot-Analyse der Eluate ergab sowohl für die WT-Enzyme *Pf* Pdx1 und *Pf* Pdx2His, als auch für die Coaufreinigung der Mutanten des aktiven Zentrums und der G-3-P-Bindungsstelle von *Pf* Pdx1, D26A, K83A, K151A, DKK und ERR in Kombination mit *Pf*Pdx2His zwei Banden der Größen 35 kDa und 25 kDa (Abb. 3.5). Die Größen korrespondieren zu denen der Enzyme *Pf*Pdx1 (35 kDa) und *Pf*Pdx2 (25 kDa) und zeigen somit eine Coaufreinigung beider Enzyme.

Bei den zur Kontrolle einzeln aufgereinigten Enzymen war lediglich im Fall von *Pf* Pdx1 eine Bande detektierbar. Diese lag bei einer molekularen Masse von 35 kDa und entsprach damit der erwarteten Größe des Proteins (Abb. 3.5 A, Spur 1). Das Protein konnte mit seinem Strep-Tag an die Strep-Tactin-Matrix binden und nachfolgend mit Desthiobiotin eluiert werden. Das *Pf*Pdx2-Enzym, das einen His-Tag trägt, interagiert nicht mit der Matrix und konnte somit nur aufgereinigt werden, wenn es an Pdx1 gebunden war (Abb. 3.5 A, Spur 2).

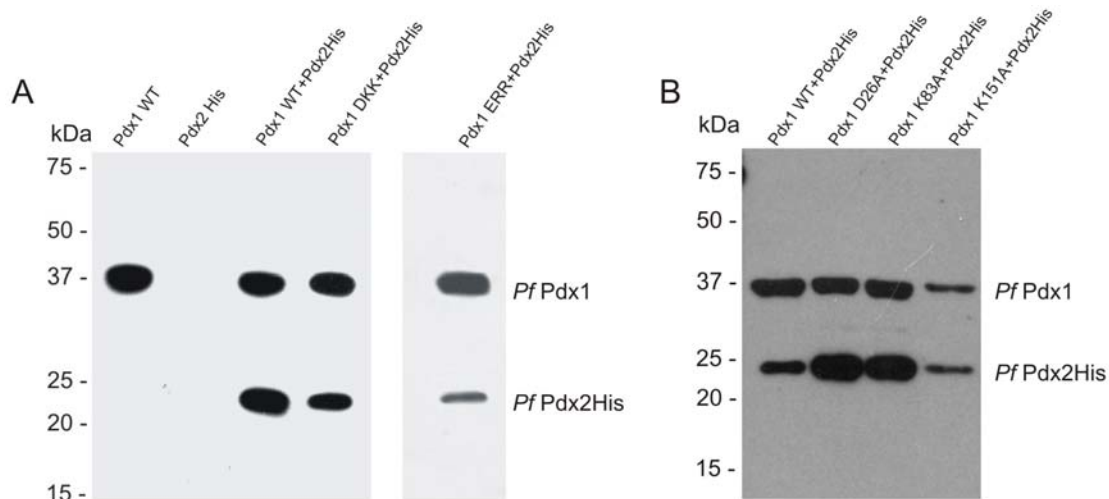


Abb. 3.5: Western-Blot der Coaufreinigung von *PfPdx2His* mit den Mutanten des aktiven Zentrums von *PfPdx1*. (A) *PfPdx1* WT und Mutanten *PfPdx1*DKK und *PfPdx1*ERR. Als Kontrollen wurden *PfPdx1* WT und *PfPdx2His* jeweils einzeln über Strep-Tactin-Sepharose aufgereinigt. (B) Mutanten *PfPdx1*D26A, *PfPdx1*K83A und *PfPdx1*K151A im Vergleich zum WT. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des Strep-Antikörpers (1:20.000) kombiniert mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP (1:20.000) sowie His-Probe-Reagent (1:5.000).

3.1.6 Analyse der Bindungsstelle zwischen verschiedenen *PfPdx1*-Molekülen

Zur Analyse der *PfPdx1*-*PfPdx1*-Interaktion wurden die Aminosäuren R85, H88 und E91 mittels Site-Directed-Mutagenese-PCR zu Alanin mutiert. Außerdem wurde mit Hilfe der Overlap-Mutagenese-PCR die Dreifachmutante *PfPdx1*RHE hergestellt, bei der alle drei Aminosäuren gleichzeitig gegen Alanin ausgetauscht wurden.

Die Proteine wurden exprimiert und aufgereinigt. Die Expressionsleistung lag für die Mutante *PfPdx1*H88A bei 2,5 mg, für *PfPdx1*E91A bei 3 mg und für *PfPdx1*RHE bei 0,6 mg pro Liter Expressionskultur. Die Mutante *PfPdx1*R85A war nicht exprimierbar und konnte daher nicht analysiert werden.

Die spezifische Aktivität der mutierten Proteine wurde mit Hilfe des Pdx1-Aktivitätstests mit Ammoniumchlorid ermittelt. Alle drei Mutanten zeigten bei Angebot von Ribose-5-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Ammonium-

chlorid keine Aktivität. Das Ergebnis des Aktivitätstests ist in Abbildung 3.6 A graphisch dargestellt.

Die Aktivität von *PfPdx2* in Verbindung mit den mutierten *Pdx1*-Enzymen wurde unter Anwendung des Glutaminase-Aktivitätstests bestimmt. Sie ergab für die Kombination von *PfPdx2* mit *PfPdx1H88A* eine Aktivität von $172 \pm 13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=8), was 66% der Aktivität des Enzyms in Kombination mit *PfPdx1WT* entspricht. In Verbindung mit *PfPdx1E91A* lag die spezifische Aktivität von *PfPdx2* mit $95 \pm 14 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=6) bei nur 36% im Vergleich zum Wildtyp. Bei Kombination von *Pdx2* mit der Dreifachmutante *PfPdx1RHE* war das Enzym inaktiv. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 3.6 B.

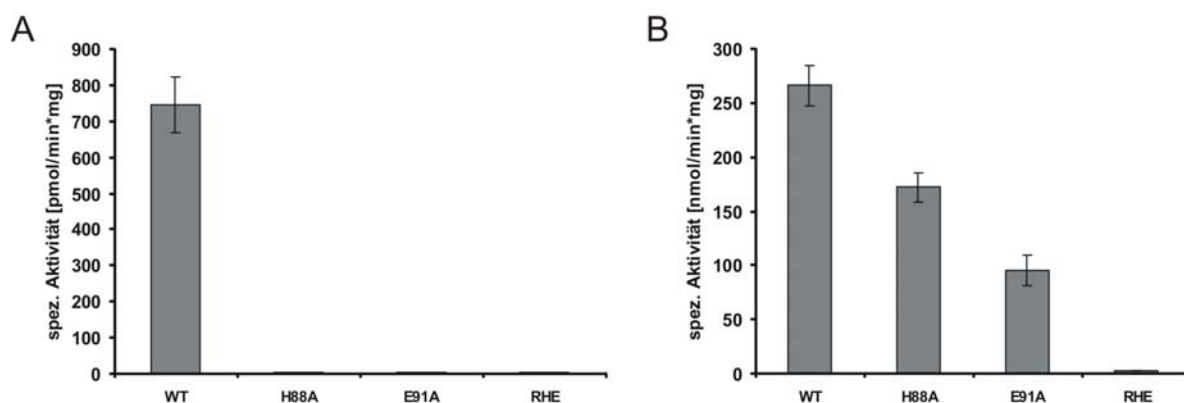


Abb. 3.6: Aktivität von *PfPdx1H88A*, *PfPdx1E91A* und *PfPdx1RHE*. (A) Aktivität von *PfPdx1* im Aktivitätstest mit Ammoniumchlorid; (B) Aktivität von *PfPdx2* im Glutaminase-Aktivitätstest.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die eingefügten Mutationen nicht nur einen Einfluss auf die Bildung des *PfPdx1*-Enzymkomplexes haben, sondern ebenfalls die Bindung von *PfPdx2* beeinträchtigen bzw. unmöglich machen.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die mutierten *PfPdx1*-Proteine mit *PfPdx2His* coaufgereinigt. Der Western-Blot zeigte hier eine Coaufreinigung von *PfPdx2His* mit den *PfPdx1*-Mutanten H88A und E91A (Abb. 3.7, rechts), allerdings in einer weitaus geringeren Menge, als für die Wildtyp-Enzyme gezeigt wurde (Abb.

3.7, links). Im Falle der Mutante *Pf* Pdx1RHE konnte kein Pdx2His-Protein detektiert werden (Abb. 3.7, Mitte).

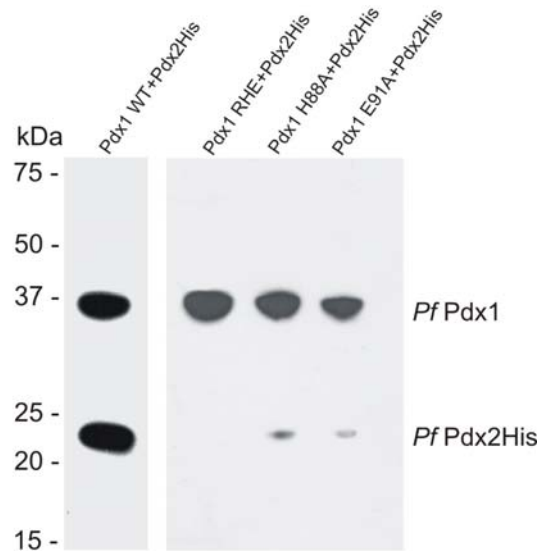


Abb. 3.7: Western-Blot der Coaufreinigung von *Pf*Pdx2His mit den *Pf*Pdx1-Mutanten H88A, E91A und RHE. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem monoklonalen Strep-Antikörper (1:20.000) in Kombination mit dem Anti-Maus-HRP-Antikörper (1:20.000) und His-Probe-Reagent (1:5.000).

3.1.7 Analyse des oligomeren Status von *Pf*Pdx1 mittels FPLC

Die Kristallstrukturen der PLP-Synthase-Komplexe verschiedener Organismen zeigten, dass der Enzymkomplex aus zwölf Pdx1-Molekülen besteht, die in Form einer „Doppelkrone“ aus zwei hexameren Ringen angeordnet sind. An jedes Pdx1-Molekül ist ein Pdx2-Enzym gebunden (Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006).

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Mutationsanalysen und Coaufreinigungsexperimente lassen darauf schließen, dass die wichtigste Voraussetzung für die Aktivität des gesamten Enzymkomplexes die stabile Formation des dodecameren Pdx1-Grundgerüsts ist. Im Folgenden wurde daher der oligomere Status des plasmodialen Pdx1WT-Enzyms sowie der Mutanten des aktiven Zentrums und der Pdx1-Pdx1-Bindungsstelle untersucht.

Dafür wurden die Proteine mittels FPLC (siehe Kapitel 2.3.11) analysiert. Aufgrund der schlechten Expressionsleistung der *Pf* Pdx1RHE-Mutante wurden die FPLC-

Analysen nur für das *PfPdx1*WT-Enzym, sowie für die Dreifachmutante des aktiven Zentrums, *PfPdx1*DKK, durchgeführt. Die Elutionsprofile sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Die erhaltenen Kurven zeigten für das *PfPdx1*WT-Enzym die maximale Proteinmenge im Bereich der Fraktionen 39-42, diese entsprachen einer molekularen Masse des Proteins von ca. 400 kDa und somit der erwarteten Masse eines Dodecamers (Abb. 3.8, Raute).

Der Vergleich der Kurve mit derjenigen, die man für das Protein *PfPdx1*DKK erhält, zeigte eine eindeutige Verschiebung des Elutionsmaximums zu den Fraktionen 43-46 (Abb. 3.8, Quadrat). Das Protein eluierte somit später von der Säule, was bedeutet, dass es kleiner als das WT-Enzym war. Die molekulare Masse des Enzyms betrug ca. 250 kDa und entsprach der von sechs *Pdx1*-Molekülen. Die Mutation der Aminosäuren D26, K83 und K151 schien also zu einer Destabilisierung des Enzymkomplexes zu führen, der daraufhin in zwei hexamere Ringe zerfiel.

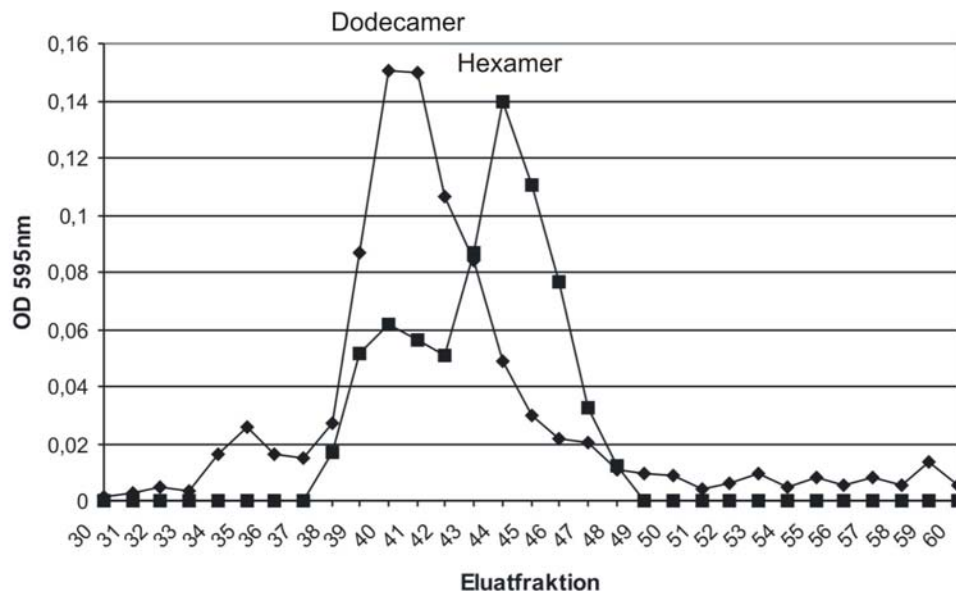


Abb. 3.8: Elutionsprofil von *PfPdx1*WT und *PfPdx1*DKK nach FPLC. Das Elutionsmaximum des Proteins *PfPdx1*WT (Raute) liegt in den Fraktionen 39-42 und entspricht damit der Größe eines Dodecamers, das der Mutante *PfPdx1*DKK (Quadrat) liegt bei Fraktion 43-46, das somit als Hexamer vorliegt.

3.1.8 Analyse des oligomeren Status von *Pf* Pdx1 mittels statischer Lichtstreuung (SLS)

Zur Bestätigung der Ergebnisse der FPLC und zur genauen Bestimmung der molekularen Masse des *Pf* Pdx1-Enzymkomplexes wurden das Wildtyp-Protein sowie die Mutanten *Pf*Pdx1DKK und *Pf*Pdx1RHE mittels statischer Lichtstreuung analysiert (siehe Abschnitt 2.3.12).

Abbildung 3.9 zeigt die UV-Spektren sowie die mittels SLS berechneten molekularen Massen der untersuchten Enzyme. Das Wildtyp-Protein eluierte bei einem Volumen von 10,5-11,25 ml. Die aus den SLS-Daten berechnete molekulare Masse betrug 424 ± 12 kDa und entsprach damit wie erwartet der Größe eines Dodecamers (Abb. 3.9, durchgezogene Linie).

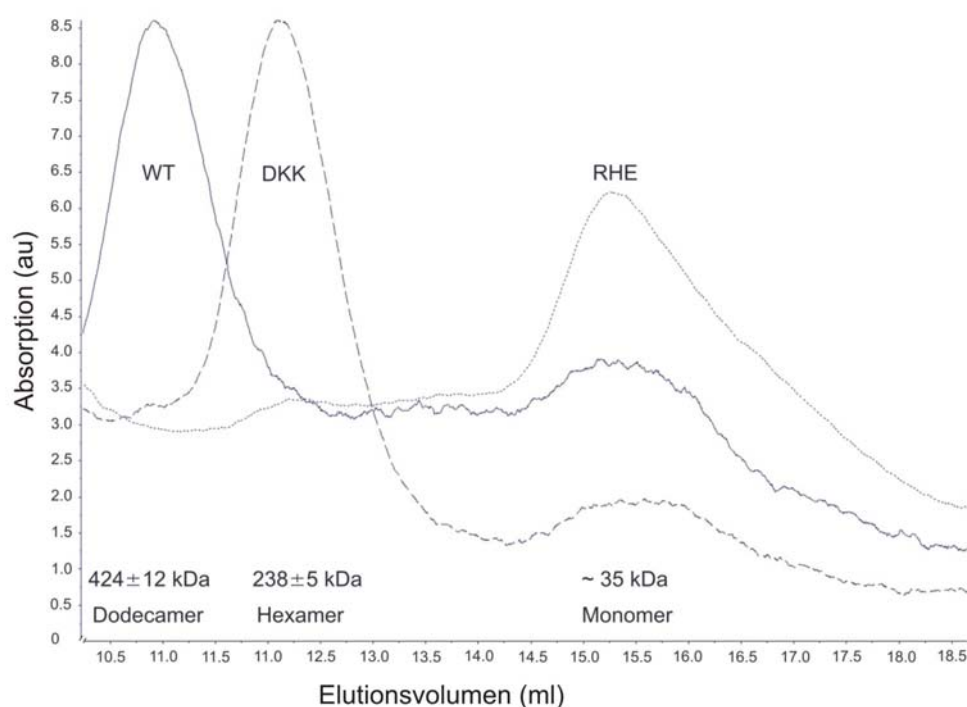


Abb. 3.9: Elutionsprofile und mittels SLS berechnete molekulare Massen der Mutanten *Pf*Pdx1DKK und *Pf* Pdx1RHE im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt sind die UV-Absorptionsspektren von *Pf* Pdx1WT, *Pf*Pdx1DKK und *Pf*Pdx1RHE. Die aus den SLS-Daten berechneten molekularen Massen sowie die Konformation der Proteine sind unter den zugehörigen Elutionsmaxima dargestellt.

Die Mutante der *Pf*Pdx1-*Pf*Pdx1-Bindungsstelle, *Pf*Pdx1RHE, eluierte bei einem Volumen von 15-15,75 ml und hatte mit 35 kDa (Abb.3.9, gepunktet) die Größe eines *Pf* Pdx1-Monomers. Der Austausch der drei Aminosäuren führte hier zum vollständigen Zerfall des Enzymkomplexes in Einzelmoleküle und bestätigte die Beteiligung der mutierten Aminosäuren an der Bindung benachbarter Pdx1-Proteine zur Bildung des Komplexes.

Die Analyse des Proteins *Pf* Pdx1DKK zeigte ein Elutionsmaximum bei einem Volumen von 11-12,5 ml. Die berechnete Größe des Enzyms liegt bei 238 ± 5 kDa (Abb. 3.9, gestrichelt). Diese Größe entsprach der von sechs *Pf* Pdx1-Molekülen. Der dodecamere Enzymkomplex zerfiel durch die eingefügten Mutationen offensichtlich in zwei hexamere Ringe.

Für den Pdx1-Pdx2-Enzymkomplex von *B. subtilis* ist beschrieben, dass dieser in Gegenwart von Glutamin stabilisiert wird (Strohmeier et al., 2006). Um einen möglichen stabilisierenden Einfluss von verschiedenen Aminosäuren auf die Formation der Enzymkomplexe von *Pf* Pdx1DKK und -RHE zu untersuchen, wurden die SLS-Analysen mit Puffer W durchgeführt, dem zusätzlich entweder Glutamin, Glutamat, Asparagin oder Alanin in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt wurden.

Keine der zugesetzten Aminosäuren hatte einen stabilisierenden Effekt auf die *Pf* Pdx1-*Pf* Pdx1-Bindungsstellenmutante *Pf* Pdx1RHE, die unter allen Bedingungen als Monomer vorlag. Es konnte allerdings ein Einfluss auf die Konformation des Proteinkomplexes von *Pf*Pdx1DKK beobachtet werden.

Abb. 3.10 zeigt das Elutionsprofil des Proteins sowie die SLS-Daten in Gegenwart von Glutamin. Neben dem schon zuvor beobachteten Maximum bei einem Elutionsvolumen von 12-12,5 ml mit der korrespondierenden hexameren Konformation des Proteins tritt ein weiteres Maximum im Bereich von 10,75-11,25 ml auf. Die molekulare Masse des Proteins entspricht hier einem Dodecamer. Die Berechnung der Mengenverhältnisse von Dodecamer und Hexamer in Lösung

ergaben ein Verhältnis von 50:50. Die Zugabe von Glutamin führt somit zu einer Stabilisierung von 50% des vorhandenen Enzyms zum dodecameren Komplex.

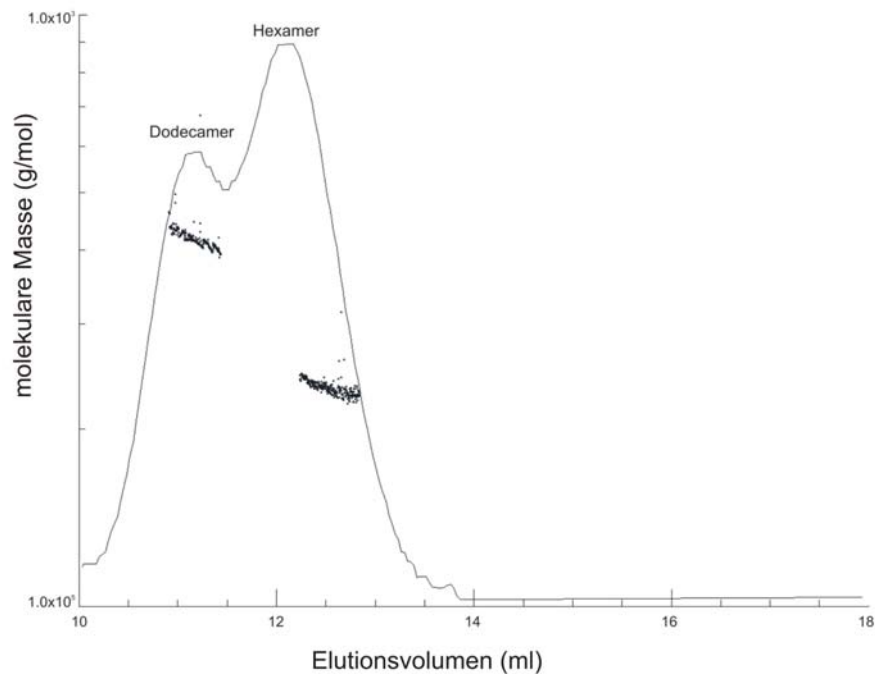


Abb. 3.10: Einfluss von Glutamin auf die Konformation der Mutante *PfPdx1DKK*. Dargestellt ist das UV-Absorptionsspektrum (durchgezogene Linie) sowie SLS-Daten (Punktwolken) von *PfPdx1DKK* in Gegenwart von 10 mM Glutamin. Die zugehörigen Konformationen sind über den Peak-Fractionen angegeben.

Derselbe stabilisierende Effekt konnte bei Zugabe von Glutamat und Asparagin beobachtet werden, allerdings in geringerem Ausmaß. Die Addition von Alanin zum Elutionspuffer hatte keinen Effekt auf den Enzymkomplex.

Um zu eruieren, welche der drei mutierten Aminosäuren für die Destabilisierung und somit den Zerfall des *PfPdx1*-Enzymkomplexes verantwortlich ist, wurden auch die Einzelmutanten *PfPdx1D26A*, *PfPdx1K83A* und *PfPdx1K151A* mittels SLS analysiert. Dabei konnte die Aminosäure K151 als diejenige identifiziert werden, die die Destabilisierung des *Pdx1*-Dodecamers und den Zerfall in zwei hexamere Ringe verursacht. Sie ist damit nicht nur essentiell für die Aktivität des Enzyms, sondern scheint zusätzlich auch in die Bildung des *PfPdx1*-

Enzymkomplexes involviert zu sein und zwei hexamere Pdx1-Ringe zu einer dodecameren „Doppelkrone“ zu verbinden, die die Basis des Pdx2-dekorierten PLP-Synthase-Komplexes bildet.

3.1.9 Identifikation möglicher Interaktionspartner von K151

Um die Position der Aminosäure K151 im *Pf*Pdx1-Enzymkomplex darzustellen und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurde ein Strukturmodell des Pdx1-Enzymkomplexes erstellt. Abbildung 3.11 A stellt den aus zwölf Einzelenzymen bestehenden Pdx1-Komplex dar. Die Aminosäure K151 ist in hellgrau hervorgehoben. Es ist deutlich zu erkennen, dass sie zentral im *Pf* Pdx1-Enzym positioniert ist und keine direkte Verbindung zu anderen Pdx1-Molekülen besteht.

Abbildung 3.11 B zeigt die Struktur eines einzelnen Pdx1-Proteins im Detail. Hervorgehoben sind die Aminosäuren D26, K83 und K151, die das aktive Zentrum des Enzyms bilden, die für die Bindung zwischen benachbarten Pdx1-Molekülen verantwortlichen Aminosäuren R85, H88 und E91 sowie zwei mögliche Interaktionspartner von K151, die im gleichen Pdx1-Molekül lokalisierten Seitenketten E107 und E136. Diese liegen im passenden Abstand zu K151 um mit der Seitenkette interagieren zu können und könnten somit ebenfalls einen Einfluss auf die Konformation des Pdx1-Komplexes haben. Eine weitere Aminosäure, mit der K151 interagieren könnte, ist K189 des benachbarten Pdx1-Moleküls.

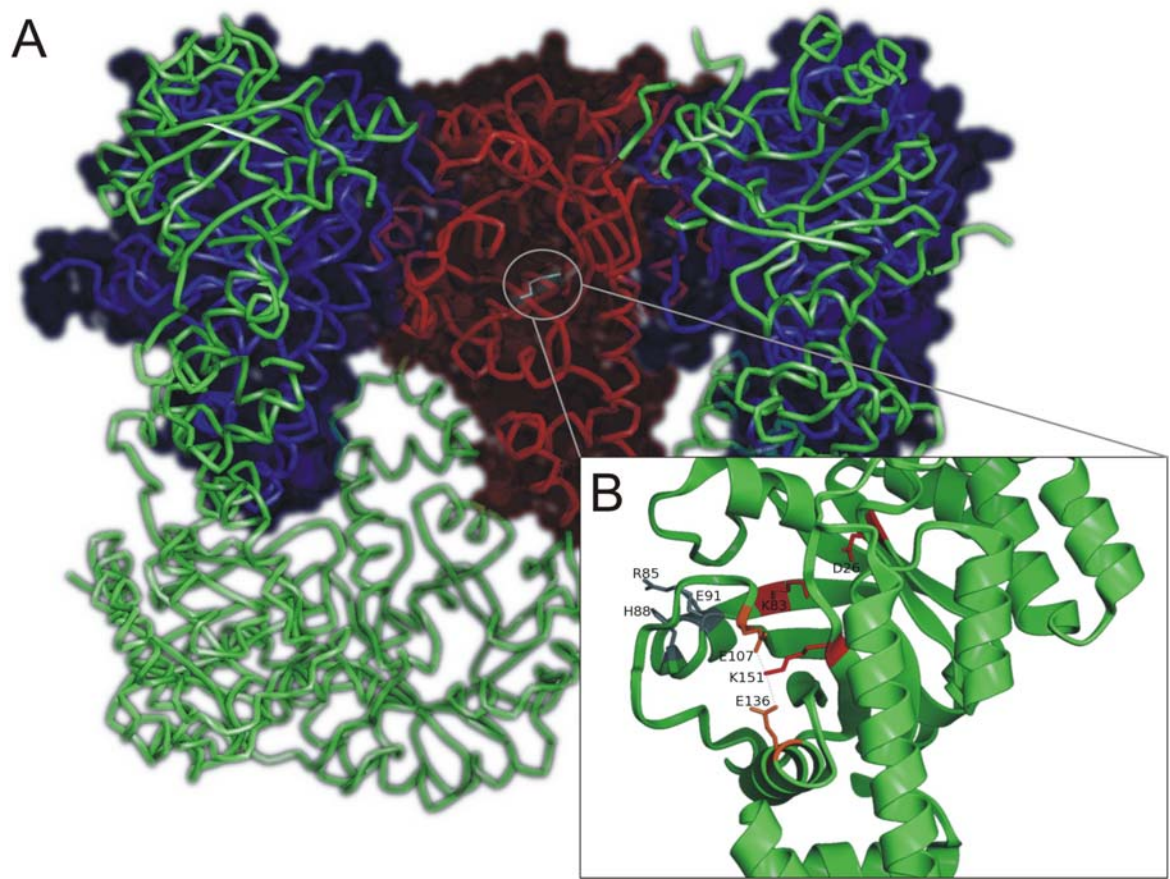


Abb. 3.11: Strukturmodell des plasmodialen Pdx1-Enzymkomplexes. (A) Querschnitt durch den dodecameren Gesamtkomplex, (B) Ausschnitt aus einem *Pf* Pdx1-Molekül zur Darstellung der Umgebung der Aminosäure K151 (Müller et al., 2008).

Die Aminosäuren E107 und K189 wurden zur Untersuchung ihres Einflusses auf den Enzymkomplex mittels Site-directed-Mutagenesis-PCR zu Alanin mutiert. Die Aminosäure E136 wurde bereits aufgrund ihrer möglichen Beteiligung an einer Substratbindungsstelle in Form des Proteins *Pf* Pdx1ERR zu Alanin mutiert und analysiert (siehe Kapitel 3.1.4 u. 3.1.5). Um festzustellen, ob beide Aminosäuren, E107 und E136 ausgetauscht werden müssen, um einen Einfluss auf den oligomeren Status des Enzymkomplexes zu zeigen wurde außerdem eine aus *Pf*Pdx1ERR und *Pf* Pdx1E107 kombinierte Mutante hergestellt und untersucht.

Die Expressionsleistung lag für das Enzym *Pf* Pdx1E107A bei 1,5 mg, für *Pf* Pdx1K189 bei 4,5 mg und für *Pf* Pdx1E107ERR bei 3 mg Protein pro Liter Expressionskultur.

Die spezifische Aktivität der Proteine wurde zunächst im Aktivitätstest mit Ammoniumchlorid ermittelt. Die Mutanten *Pf* Pdx1E107A und *Pf* Pdx1E107ERR waren hier inaktiv, wohingegen *Pf* Pdx1K189A mit $601 \pm 60 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=11) im Rahmen der Aktivität des Wildtyp-Proteins lag. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 3.12 A.

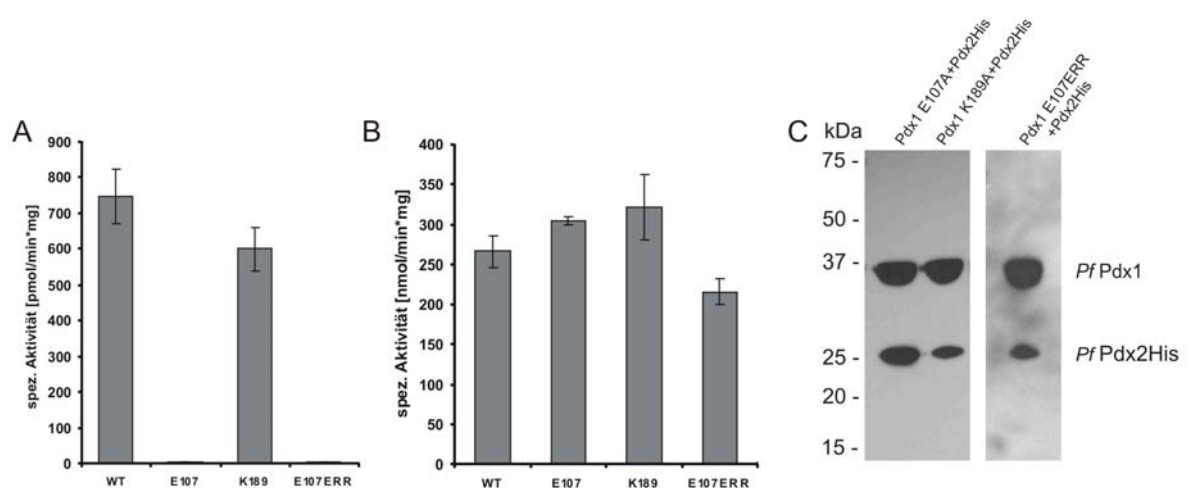


Abb. 3.12: Analyse der Mutanten *Pf* Pdx1E107A, *Pf* Pdx1K189A und *Pf* Pdx1E107ERR. (A) Spezifische Aktivität von *Pf* Pdx1 im Aktivitätstest mit Ammoniumchlorid, (B) Aktivität von *Pf* Pdx2 im Glutaminase-Aktivitätstest im Vergleich zum WT, (C) Western-Blot der Coaufreinigung von *Pf* Pdx1 und *Pf* Pdx2His, beprobt mit Strep-Antikörper (1:50.000) kombiniert mit HRP-markiertem Maus-Antikörper (1:20.000) und His-Probe Reagent (1:5.000).

Der Glutaminase-Aktivitätstest diente zur Ermittlung der spezifischen Aktivität von *Pf* Pdx2 bei Kombination mit den genannten *Pf* Pdx1-Mutanten. Diese lag mit $305 \pm 5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=4) für *Pf* Pdx2 in Verbindung mit *Pf* Pdx1E107A, $321 \pm 41 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (n=6) mit *Pf* Pdx1K189A und $216 \pm 16 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein (n=6) in Kombination mit der Pdx1-Mutante *Pf* Pdx1E107ERR jeweils im Rahmen der Aktivität des Wildtyp-Komplexes. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 3.12 B.

Coaufreinigungs-Experimente von *Pf* Pdx2His mit den beschriebenen *Pf* Pdx1-Mutanten ergaben eine gemeinsame Elution von Pdx1 und Pdx2His. Der zugehörige Western-Blot ist in Abbildung 3.12 C dargestellt.

Die Analyse des oligomeren Status der Enzyme mittels SLS zeigte, dass alle Mutanten weiterhin als Dodecamer vorlagen. Keiner der Aminosäureaustausche führte zur Destabilisierung des Enzymkomplexes.

3.1.10 Einfluss der Flexibilität von K151 auf die Formation des *Pf*Pdx1-Komplexes

Eine weitere Analyse der Aminosäuresequenz von *Pf* Pdx1 zeigte, dass in direkter Umgebung der Aminosäure K151 an den Positionen 144, 152 und 155 mehrere Glycin-Reste lokalisiert sind (siehe Abb. 3.1, ¥). Glycin ist eine kleine Aminosäure, die einer Struktur Flexibilität verleiht. Diese Glycinreste ermöglichen unter Umständen eine flexible und dynamische Positionierung der Aminosäure K151.

Um die Struktur des Proteins an diesen Stellen zu fixieren und den Einfluss auf die Komplexbildung zu untersuchen, wurden die Aminosäuren G144, G152 und G155 mittels Site-directed-Mutagenesis-PCR (siehe Abschnitt 2.2.3) zunächst zu Prolin mutiert.

Die Proteine wurden exprimiert und aufgereinigt, es zeigte sich jedoch, dass die Mutante G144P nicht exprimierbar war und die Proteine *Pf* Pdx1G152P und *Pf* Pdx1G155P präzipitierten. Da die Mutation der Glycin-Reste zu Prolin offensichtlich einen zu schweren Eingriff in die Struktur des Proteins darstellte, wurden neue Mutanten hergestellt, bei denen die Glycin-Reste gegen Alanin ausgetauscht wurden. Auch hier war die Mutante G144A nicht exprimierbar. Die Expressionsleistung von *Pf*Pdx1G152A lag bei 1 mg und die von *Pf*Pdx1G155A bei 8 mg pro Liter Expressionskultur.

Nach einer ersten Aufreinigung der Proteine und Lagerung der Eluate über Nacht bei 4°C waren keine Präzipitate zu erkennen und eine Konzentration der Proteine über Spin-Säulchen (Ambion Microcon Ultracel YM-3) war ebenfalls möglich. Dies

ließ vermuten, dass die mutierten Proteine stabil waren und sich für weitere Analysen eigneten.

Der oligomere Status der Enzyme wurde mittels SLS bestimmt. Die Berechnung der molekularen Masse ergab für *PfPdx1G152A* einen Wert von > 3 MDa, was auf eine Aggregation des Proteins hindeutete. Die molekulare Masse der Mutante *PfPdx1G155A* betrug 220 ± 8 kDa und korrespondierte damit mit der Masse eines Hexamers. Das Elutionsprofil des Proteins, sowie die zugehörigen SLS-Daten zeigt Abbildung 3.13.

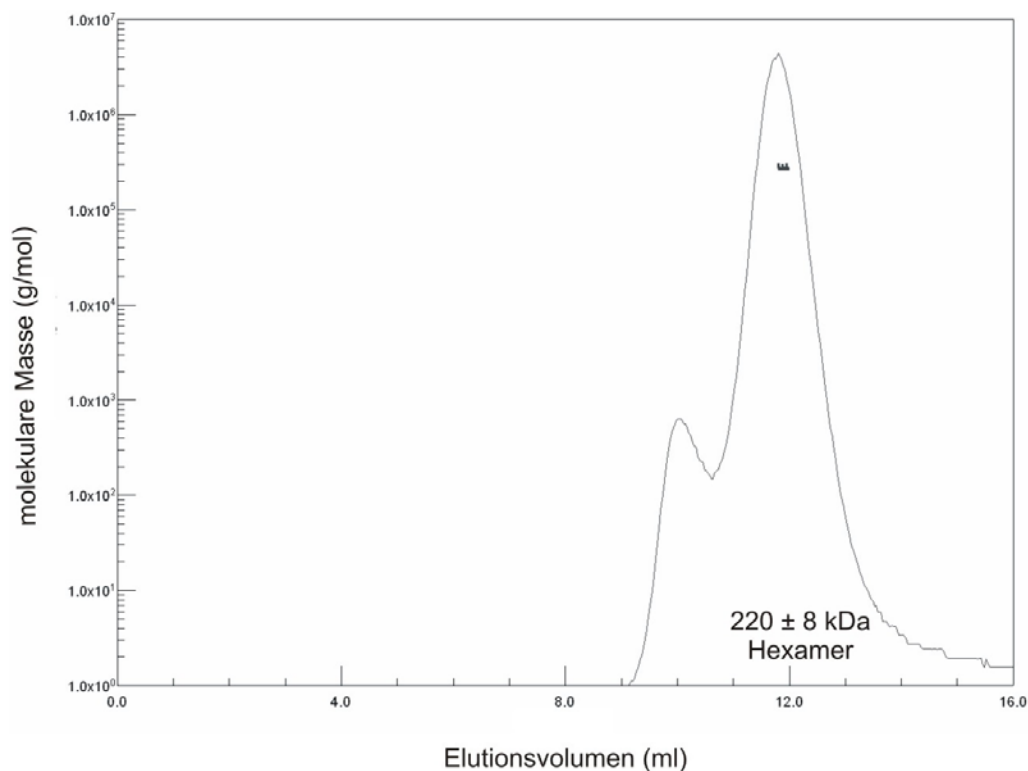


Abb. 3.13: Analyse des Proteins *PfPdx1G155A* mittels SLS. Dargestellt sind das UV-Spektrum der Elution (durchgezogene Linie) sowie die mittels SLS erhaltenen Daten zur Berechnung der molekularen Masse des Proteins (Punktwolke innerhalb des Elutionspeaks). Die aus den SLS-Daten berechnete molekulare Masse sowie die Konformation des Enzyms sind an der Basis des Elutionsmaximums angegeben.

Aufgrund der Aggregation von *Pf*Pdx1G152A wurden alle folgenden Analysen nur für das Protein *Pf*Pdx1G155A durchgeführt.

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur der Mutante *Pf* Pdx1G155A wurde das Protein mittels Circularem Dichroismus (CD) vermessen. Die Daten sind in Abbildung 3.14 graphisch dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse ergab einen Anteil von 32-33% α -Helices und 17-18% β -Faltblättern. Diese Werte unterschieden sich signifikant von denen, die man für das *Pf* Pdx1WT-Enzym erhielt. Hier lag der Anteil von α -Helices bei 51-55% und der der β -Faltblätter bei 9-10%, was in guter Übereinstimmung zu den aus dem Pdx1-Strukturmodell berechenbaren Anteilen von 48% α -Helices und 12% β -Faltblättern liegt.

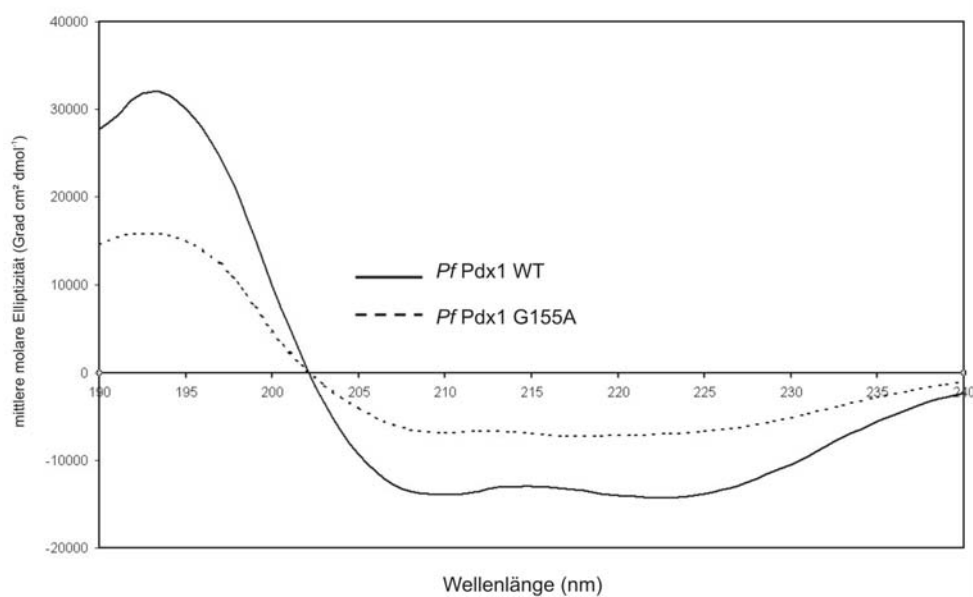


Abb. 3.14: Analyse von *Pf*Pdx1 WT (durchgezogene Linie) und *Pf*Pdx1 G155A (gestrichelt) mittels CD. Die Unterschiede in den gemessenen Spektren weisen auf eine signifikante Änderung des Gehaltes an Sekundärstrukturelementen hin.

3.1.11 Bestimmung der Aktivität von *Pf*Pdx1G155A

Die Bestimmung der Aktivität von *Pf* Pdx1G155A im Aktivitätstest mit Ammoniumchlorid zeigte, dass das Protein inaktiv war und keine PLP-Synthase-Aktivität mehr besaß (siehe Abb. 3.15 A). Das *Pf* Pdx2-Enzym hingegen wies im Glutaminase-Aktivitätstest in Kombination mit *Pf* Pdx1G155A eine Aktivität von $285 \pm 21 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein ($n=6$) auf und lag damit im Rahmen der Aktivität der Wildtyp-Enzyme (vergl. Abb. 3.15 B). Der in Abbildung 3.15 C dargestellte Western-Blot der Coaufreinigung von *Pf* Pdx2His mit *Pf* Pdx1G155A zeigte eine deutliche Coaufreinigung beider Proteine und bestätigte, dass die eingefügte Mutation keinen Einfluss auf die Bindefähigkeit von *Pf*Pdx2 an *Pf*Pdx1G155A hat.

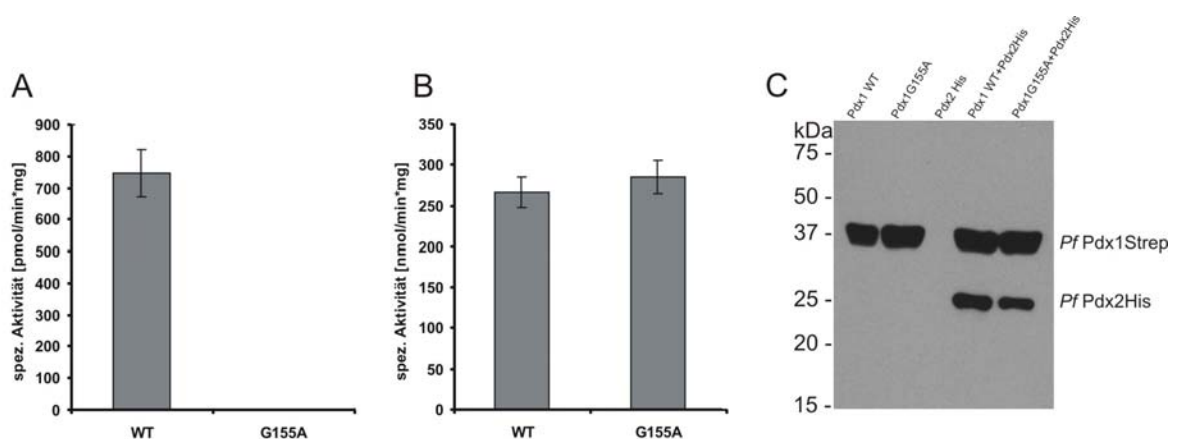


Abb. 3.15: Analyse der *Pf*Pdx1-Mutante G155A. (A) Aktivität von *Pf* Pdx1 im Aktivitätstest mit Ammoniumchlorid, (B) Aktivität von *Pf* Pdx2 im Glutaminase-Aktivitätstest, (C) Western-Blot der Aufreinigung von *Pf* Pdx1 WT, *Pf* Pdx1G155A und *Pf* Pdx2His, sowie Coaufreinigung von *Pf* Pdx1WT und *Pf* Pdx1G155A mit *Pf* Pdx2His mittels Strep-Tactin-Sepharose, beprobt mit Strep-Antikörper (1:20.000) und His-Probe-Reagent (1:5.000).

3.1.12 Analyse des Substratkanals zwischen *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2

Für die PLP-Synthese-Reaktion, die vom Enzym Pdx1 katalysiert wird, werden Ammoniumionen benötigt. Diese werden vom Pdx2-Enzym zur Verfügung gestellt, das Glutaminaseaktivität hat und Glutamin zu Glutamat umsetzt. Es wird vermutet, dass die dabei entstehenden Ammoniumionen durch einen Substratkanal im Pdx2-

Enzym in das aktive Zentrum des Pdx1-Enzyms geleitet werden (Zhu et al., 2005; Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006).

Eine Analyse der Struktur von Pdx2 (YaaE) von *T. maritima* (Zein et al., 2006) ergab eine mögliche Beteiligung der Aminosäuren E47 und R135 an der Formation des Substratkanals. Diese Aminosäuren sind an den Positionen E53 und R154 auch in der Sequenz von *Pf* Pdx2 konserviert. Beide Aminosäuren liegen außerdem innerhalb der in der SNO-/Pdx2-Enzymfamilie hoch konservierten Motive GGEST bzw. F/CIRAP, was ihre Bedeutung für die Struktur oder die Funktion des Proteins nahe legt. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen von *Pf* Pdx2 und *Tm* YaaE ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

```

PfPdx2   MSEITIGVLSLQGDFFEPHINHFIKLQIPSLNIIQVRNVHDLGLCDGLVIPGGESTIVRRC 60
TmYaaE   ---MKIGVLGVQGDVREHVEALHKLGVETL-IVKLP--EQLDMVDGLILPGGESTMIR- 53
          :.****.:***.  *:: : ** : : * *:::  .:*. : ****:*****: *

PfPdx2   CAYENDTLYNALVHFIVLKKPIWGTGACGICLLSKNVENIKLYSNFGNKFSFGGLDITIC 120
TmYaaE   -ILKEMDMDEKLVERINN-GLPVFATCAGVILLAK---RIKNYS----QEKLGVLDITVE 104
          :: : : ** . * : *::.**** **:* .** ** : .:* ****:

PfPdx2   RNFYGSQNSDFICSLNIISSSAFKKDLTAACIRAPYIREILSDEVKVLATFSHESYGPN 180
TmYaaE   RNAYGRQVESFETFVEIPAVG---KDPFRAIFIRAPRIVETG-KNVEILATY---DYDP- 156
          ** * * * :** :*: . * : * * * * * * .:*****: .*.

PfPdx2   IIAAVEQNNCLGTVFHPPELLPHTAFQQYFYEKVKNYKYS 219
TmYaaE   --VLVKEGNILACTFHPELTDLLRLHRYFLEMVK----- 188
          . *::.* * . ***** . :::* * **

```

Abb. 3.16: Sequenzalignment von *Pf* Pdx2 und *Tm* YaaE. Die an der Bildung des Substratkanals beteiligten Aminosäuren E53 und R154 (E47 und R135 in *Tm* YaaE) sind dunkelgrau, die sie umgebenden hoch konservierten Aminosäuremotive hellgrau unterlegt.

Um die Rolle der beiden genannten Aminosäuren bei der Bildung des Substratkanals zu untersuchen, wurden sie mittels Site-directed-Mutagenesis-PCR gegen Tyrosin (E53) bzw. gegen Tryptophan (R154) ausgetauscht. Diese Aminosäuren haben lange Seitenketten mit aromatischen Ringen und sollten so den Substratkanal blockieren. Die Proteine wurden exprimiert und aufgereinigt. Pro Liter Bakterienkultur konnten hier 1,5 mg *Pf*Pdx2E53Y und 1 mg *Pf*Pdx2R154W isoliert werden.

Die Aktivität der Pdx2-Mutanten wurde im Glutaminase-Aktivitätstest bestimmt. Es zeigte sich, dass beide Proteine hier inaktiv waren. Abbildung 3.17 A zeigt die Ergebnisse.

Die Aktivität von Pdx1 wurde bestimmt, indem *PfPdx1*WT im Verhältnis 1:1 mit *PfPdx2E53Y* bzw. *PfPdx2R154W* gemischt wurde. 300 µg des Proteingemisches wurde daraufhin im Pdx1-Aktivitätstest eingesetzt und Ammoniumchlorid als Substrat angeboten. Wie erwartet zeigte das Protein keine Einschränkung in seiner Aktivität.

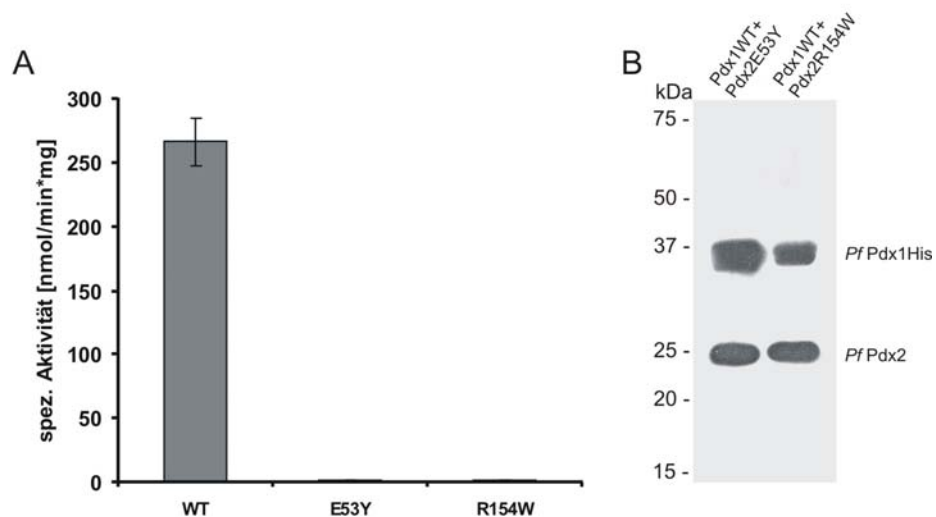


Abb. 3.17: Analyse der Mutanten *PfPdx2E53Y* und *PfPdx2R154W*. (A) Aktivität von *PfPdx2* im Glutaminase-Aktivitätstest, (B) Western-Blot nach Coaufreinigung der Mutanten mit *PfPdx1*His, beprobt mit Strep-Antikörper (1:20.000), Sekundäntikörper Anti-Maus-HRP (1:20.000) und His-Probe Reagent (1:5.000).

Um zu verifizieren, ob die mutierten *PfPdx2*-Enzyme weiterhin in der Lage sind an *PfPdx1* zu binden, wurden Coaufreinigungsexperimente durchgeführt. Dafür wurde der Strep-Tag des Pdx1WT-Enzyms mittels PCR gegen einen His-Tag ausgetauscht und der offene Leserahmen in den Vektor pASK-IBA3 kloniert. Das Protein wurde exprimiert und die Coaufreinigung wie für die Mutanten von *PfPdx1* beschrieben durchgeführt. In diesem Fall wird das *PfPdx2*-Enzym an die Strep-Matrix gebunden

und das *Pf*Pdx1WT-Enzym, welches den His-Tag trägt, muss an *Pf*Pdx2 binden, um aufgereinigt zu werden. Der im Anschluss an die Coaufreinigung durchgeführte Western-Blot zeigte deutlich zwei Banden der Größen 35 kDa und 25 kDa, korrespondierend zu den Proteinen *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2. Den Western-Blot zeigt Abbildung 3.17 B.

3.2 Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 *in vivo*

Vorangegangene Analysen der Vitamin B6-Biosynthese-Enzyme Pdx1 und Pdx2 anderer Organismen, sowie die hier für die plasmodialen Enzyme durchgeführten Mutationsanalysen zeigen deutlich eine Interaktion der beiden Proteine zur Bildung des funktionsfähigen PLP-Synthase-Komplexes. Die Erkenntnisse beruhen jedoch lediglich auf Versuchen, die mit rekombinant exprimiertem Protein durchgeführt wurden. Um eine Interaktion der beiden Enzyme *in vivo* zu zeigen, sollten die beiden Proteine aus transgenen Parasiten coaufgereinigt werden.

3.2.1 Coaufreinigung von *Pf*Pdx1Strep und *Pf*Pdx2Myc aus Plasmodienextrakt

Für die Coaufreinigung von *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 aus Plasmodienextrakt wurde die in Abbildung 3.18 A schematisch dargestellte cotransgene Zelllinie *Pf*Pdx1Strep/*Pf*Pdx2Myc verwendet. Bei dieser Zelllinie werden die Proteine *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 als Strep- bzw. Myc-Tag-Fusionsproteine überexprimiert. Die Coaufreinigung erfolgte mit Hilfe des Strep-Tags am Pdx1-Protein und einer Strep-Tactin-Matrix. Das erhaltene Eluat wurde in der SpeedVac eingeeengt und mittels Western-Blot analysiert. Dieser ist in Abbildung 3.18 B dargestellt. Bei Beprobung des Blots mit einem gegen den Strep-Tag gerichteten Antikörper konnte eine Bande mit der Größe 35 kDa nachgewiesen werden, die das mittels Strep-Tag aufgereinigte *Pf*Pdx1-Enzym darstellt (Abb. 3.18 B, links). Bei Einsatz des Myc-Antikörpers, der den

Myc-Tag des episomal überexprimierten *Pf*Pdx2-Enzyms detektiert, zeigt der Blot eine Bande der Größe 25 kDa (Abb. 3.18 B, rechts). Diese entspricht der molekularen Masse von *Pf*Pdx2, das durch seine Bindung an *Pf*Pdx1 mit diesem coaufgereinigt werden konnte.

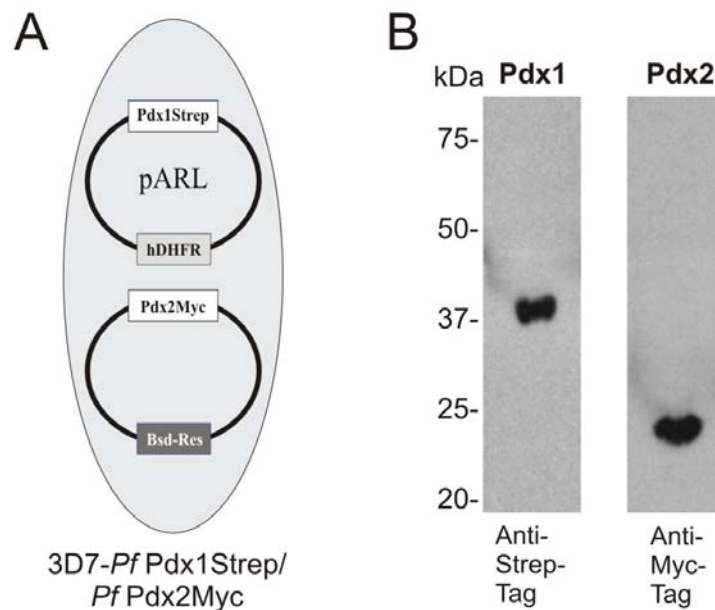


Abb. 3.18: Western-Blot der Coaufreinigung von *Pf*Pdx1Strep und *Pf*Pdx2Myc aus *P. falciparum*.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Zelllinie, (B) Western-Blot der über Strep-Tactin-Sepharose coaufgereinigten Proteine, beprobt mit Strep- (1:10.000, Pdx1, links) und Myc-Antikörper (1:2.500, Pdx2, rechts). Die erwarteten Proteingrößen von 35 kDa für *Pf*Pdx1 und 25 kDa für *Pf*Pdx2 stimmen mit der Größe der detektierten Banden überein.

3.3 Überexpression von *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 in *P. falciparum*

3.3.1 Die Überexpressionskonstrukte pARL-*Pf*Pdx1Strep-WR, pARL-*Pf*Pdx2Strep-WR, pARL-*Pf*Pdx2Myc-Bsd und pARL-*Pf*Pdx2E53YMyc-Bsd

Um die Proteine *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2, sowie die inaktive Pdx2-Mutante *Pf*Pdx2E53Y in *P. falciparum* zu überexprimieren, wurden die Konstrukte pARL-*Pf*Pdx1Strep-WR, pARL-*Pf*Pdx2Strep-WR, pARL-*Pf*Pdx2Myc-Bsd und pARL-*Pf*Pdx2E53YMyc-Bsd hergestellt und in *P. falciparum* transfiziert. Um die Über-

expression der jeweiligen Proteine in den Zelllinien nachzuweisen, wurden diese mittels Western-Blot analysiert. Abbildung 3.19 zeigt eine schematische Darstellung der Zelllinie 3D7-*Pf* Pdx1Strep (Abb. 3.19 A), sowie zwei Western-Blots mit Zellhomogenat der Parasiten. Die linke Membran (Abb. 3.19 B) wurde mit einem polyklonalen *Pf* Pdx1-Antiserum beprobt. Sowohl bei 3D7-WT als auch bei transgenen 3D7-*Pf*Pdx1Strep-Zellen war jeweils eine Bande der Größe 35 kDa zu detektieren, die dem *Pf*Pdx1-Protein entspricht.

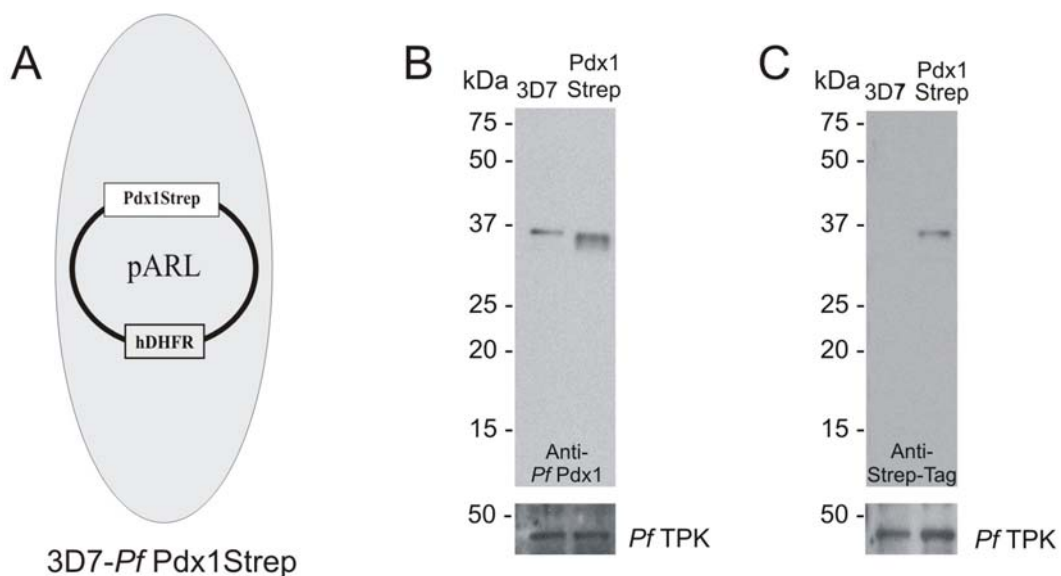


Abb. 3.19: Western-Blot zur Analyse der transgenen Zelllinie *Pf* Pdx1Strep. (A) Schematische Darstellung der Zelllinie, (B) Western-Blot von 3D7-WT und 3D7-*Pf* Pdx1Strep mit *Pf* Pdx1-Antikörper (Ratte-anti-Pdx1, 1:10.000, Anti-Ratte-HRP 1:10.000), (C) Western-Blot von 3D7-WT und 3D7-*Pf* Pdx1Strep mit Strep-Antikörper (Maus-anti-Strep, 1:5.000, Anti-Maus-HRP, 1:5.000). Als Ladekontrolle diente ein polyklonales Antiserum gegen die *Pf*TPK (Anti-*Pf*TPK-Ratte, 1:10.000, Anti-Ratte-HRP 1:10.000 (Eschbach et al., 2006)).

Im Fall der 3D7-*Pf* Pdx1Strep-Zellen erschienen zwei Banden. Die eine entsprach dem nativen in der Zelle vorliegenden Pdx1-Enzym, das keinen Strep-Tag trägt, die zweite Bande repräsentierte das episomal überexprimierte Protein, das durch seinen Strep-Tag etwa 1,2 kDa größer als das native Protein ist. Der in Abbildung 3.19 C dargestellte Blot wurde mit einem gegen den Strep-Tag gerichteten monoklonalen

Antikörper inkubiert. Hier war lediglich in der rechten Spur, in welcher der Proteinextrakt der transgenen *Pf*Pdx1-überexprimierenden Zellen aufgetragen ist, eine Bande zu erkennen. Die Bande zeigte hier ausschließlich das episomal überexprimierte Enzym, das einen Strep-Tag trägt und somit mit dem entsprechenden Antikörper nachweisbar war. Da die zum Vergleich aufgetragenen Wildtyp-Parasiten nur natives Pdx1 ohne Tag besitzen, war hier keine Bande zu erkennen. Als Ladekontrolle diente ein polyklonales Antiserum gegen die plasmodiale Thiaminpyrophosphokinase (*Pf*TPK).

Zum Nachweis der Überexpression von *Pf*Pdx2 in Plasmodien wurden Western-Blot-Analysen mit Zellextrakt der transgenen Linien 3D7-*Pf*Pdx2Strep und 3D7-*Pf*Pdx2Myc durchgeführt und die episomal überexprimierten Proteine über den fusionierten Strep- bzw. Myc-Tag mittels spezifischer Antikörper detektiert.

In Abbildung 3.20 sind schematische Darstellungen der Zelllinien und ihrer Episome mit den entsprechenden Western-Blots zusammengestellt. Beide Blots zeigten jeweils nur in der Spur der transgenen Zelllinien eine Bande in der dem *Pf*Pdx2 entsprechenden Größe von 25 kDa. Da die Antikörper jeweils ausschließlich das Tag-tragende episomal überexprimierte Protein detektieren, war in der 3D7-WT Kontrollspur keine Bande zu sehen.

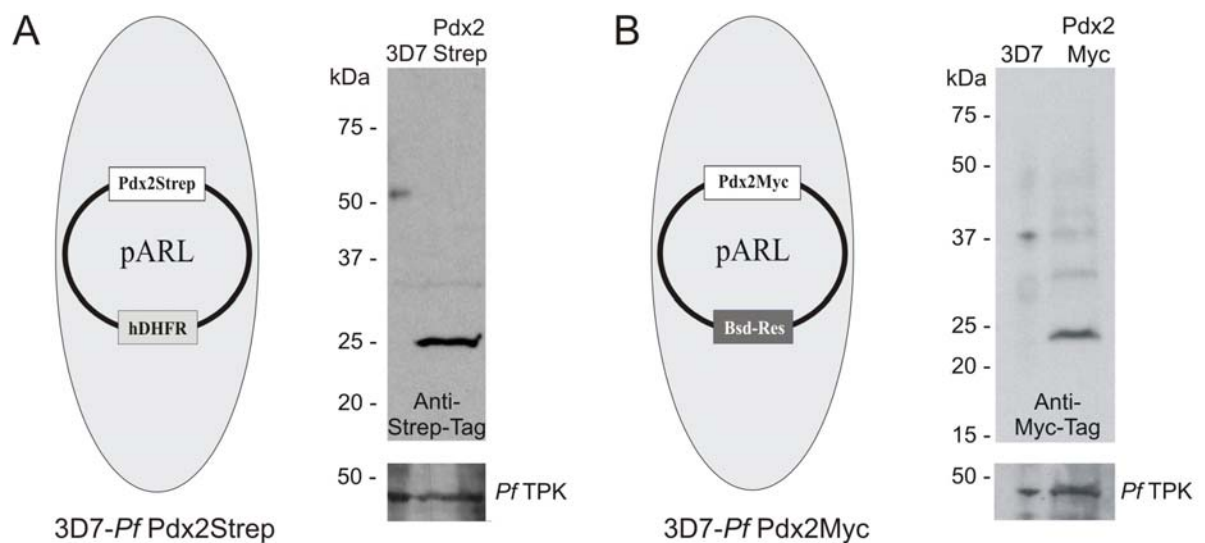


Abb. 3.20: Western-Blot zur Analyse der transgenen Zelllinien 3D7-*Pf* Pdx2Strep und 3D7-*Pf* Pdx2Myc. (A) Schematische Darstellung der Zelllinie 3D7-*Pf* Pdx2Strep und Western-Blot mit Plasmodienextrakt der transgenen Zelllinie im Vergleich zu 3D7-WT-Zellen (verwendete Antikörper: Maus-anti-Strep, 1:5.000, Anti-Maus-HRP, 1:5.000), (B) Schematische Darstellung und Western-Blot von 3D7-*Pf*Pdx2Myc im Vergleich zu 3D7-WT-Zellen (Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern Maus-anti-Myc, 1:5.000 und Anti-Maus-HRP, 1:5.000). Als Ladekontrolle diente jeweils die *Pf*TPK (Eschbach et al. 2007, Anti-*Pf*TPK-Ratte, 1:10.000, Anti-Ratte-HRP 1:10.000)

Zur Analyse der Co-Überexpression von *Pf*Pdx1Strep und *Pf*Pdx2Myc bzw. von *Pf* Pdx1Strep und der inaktiven Pdx2-Mutante *Pf*Pdx2E53YMyC in den beiden doppelt transgenen Zelllinien *Pf*Pdx1Strep/*Pf*Pdx2Myc und *Pf*Pdx1Strep/*Pf*Pdx2E53YMyC wurden auch hier Western-Blots mit Plasmodien-Zellextrakt durchgeführt. Die jeweiligen Proteine wurden ebenfalls mittels spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die fusionierten Strep- und Myc-Tags detektiert. Beide Blots zeigten eindeutig zwei Banden der Größen 35 kDa und 25 kDa, entsprechend der erwarteten molekularen Massen von *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 bzw. *Pf*Pdx2E53Y. Abbildung 3.21 zeigt die Schemata der Zelllinien und ihrer Episome, sowie die zugehörigen Western-Blots.

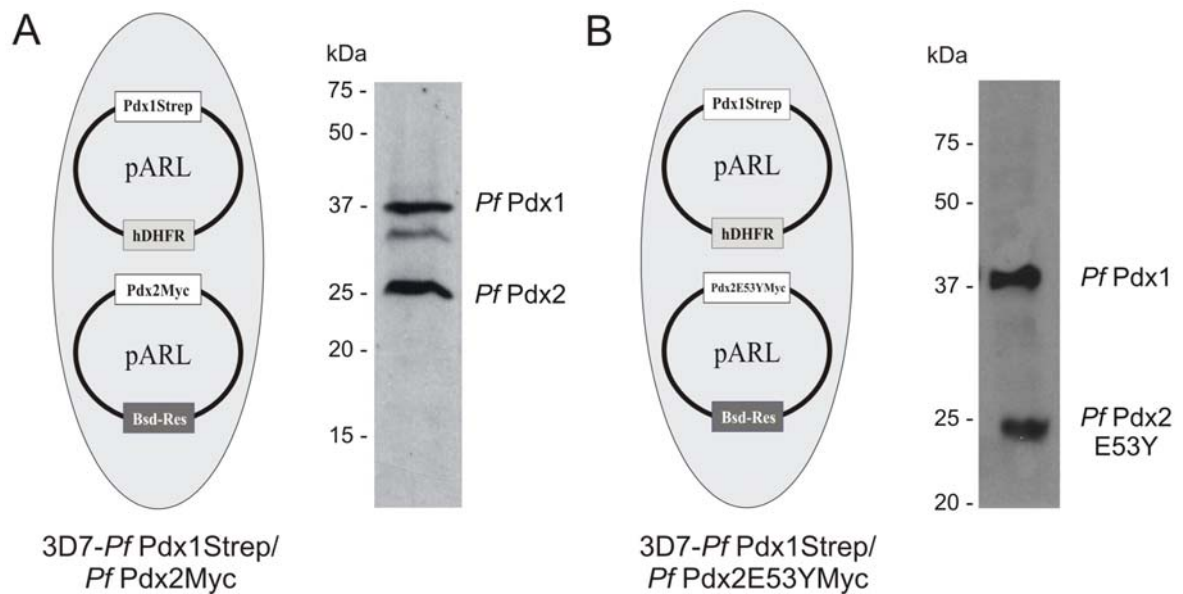


Abb. 3.21: Western-Blot zur Analyse der cotransgenen Zelllinien 3D7-*PfPdx1Strep/PfPdx2Myc* und 3D7-*Pf Pdx1Strep/Pf Pdx2E53YMyC* (A) Schematische Darstellung und Western-Blot mit Plasmodienextrakt der Zelllinie 3D7-*PfPdx1Strep/PfPdx2Myc*, (B) Schematische Darstellung sowie Western-Blot der Zelllinie 3D7-*Pf Pdx1Strep/Pf Pdx2E53YMyC*. Die Western-Blots wurden mit Strep- und Myc-Antikörpern (je 1:5.000) sowie dem Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP (1:5.000) beprobt.

3.3.2 Einfluss der Überexpression von *PfPdx1* und *PfPdx2* auf das Wachstum von *P. falciparum*

Das Wachstumsverhalten der *PfPdx1*- und *PfPdx2*-überexprimierenden transgenen Parasiten wurde durch die Analyse der Vermehrungsrate der Parasiten untersucht. Diese wurde dafür zum einen mit derjenigen von 3D7-WT-Zellen verglichen, zum anderen wurde das Wachstum demjenigen von WR99210- bzw. Blasticidin S-resistenten transgenen Zelllinien gegenübergestellt, die mit dem *pARL*-Leervektor (MOCK-Plasmid) mit entsprechender Resistenz transfiziert worden waren. Dabei sollte der Einfluss der Überexpression der Proteine *Pf Pdx1* und *Pf Pdx2* auf das Wachstum der Parasiten im Vergleich zu dem der Selektionsdrogen WR99210 und Blasticidin S untersucht werden. Die Parasitämie der transgenen Zelllinien 3D7-*Pf Pdx1Strep*, 3D7-*Pf Pdx2Strep*, 3D7-*Pf Pdx2Myc*, 3D7-*Pf Pdx1Strep/Pf Pdx2Myc*,

3D7-*Pf* Pdx1Strep/*Pf* Pdx2E53YMyC, sowie der mit den MOCK-Plasmiden 3D7-WR, 3D7-Bsd und 3D7-WR/Bsd transfizierten Zellen wurde dafür über einen Zeitraum von 168 h verfolgt und unter Berücksichtigung der angewendeten Verdünnungsfaktoren ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden als Funktion der Zeit halblogarithmisch aufgetragen und die Verdoppelungszeit der Parasiten mit Hilfe der Steigung der zur jeweiligen Wachstumskurve gehörigen Kurvengleichung berechnet.

Das Wachstum der 3D7-WT-Zellen, dargestellt in Abbildung 3.22, wird durch die Gleichung $y=1,2816e^{0,0388x}$ beschrieben, wobei das Bestimmtheitsmaß R^2 bei 0,9978 liegt. Die Verdoppelungszeit der 3D7-WT-Parasiten beträgt 17,7 h.

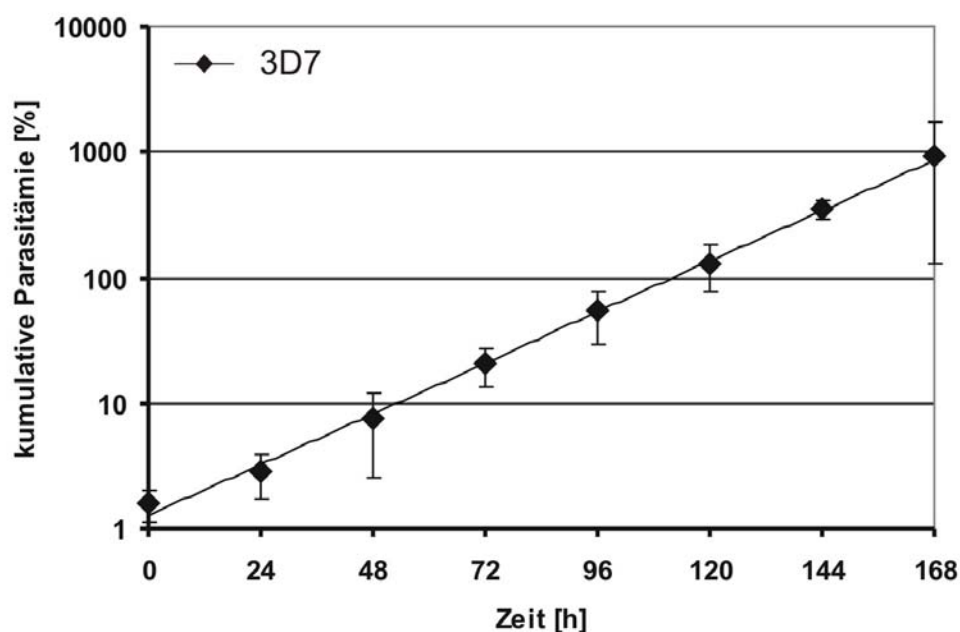


Abb. 3.22: Wachstum von *P. falciparum* 3D7-WT. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 168 h verfolgt und die Parasitämie berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Bestimmungen mit Trendlinie, sowie die zugehörige Standardabweichung.

Für die mit 5 nM WR99210 behandelten Zelllinien 3D7-*Pf* Pdx1Strep (offene Quadrate in Abb. 3.23) und 3D7-*Pf* Pdx2Strep (Dreiecke in Abb. 3.23) lag die Verdoppelungszeit der Parasiten bei 18,4 h bzw. 23,4 h. Die Gleichungen der

Wachstumskurven sind $y=0,9466e^{0,0375x}$ ($R^2=0,9869$) und $y=1,1956e^{0,0295x}$ ($R^2=0,9768$). Das Wachstum dieser Zelllinien wurde unter Einbezug des Einflusses von WR99210 mit der transgenen Zelllinie 3D7-WR verglichen. Aus der Gleichung der Wachstumskurve, $y=2,1647e^{0,0339x}$ ($R^2=0,9806$), ergibt sich eine Verdoppelungszeit dieser Zellen von 20,3 h (geschlossene Quadrate in Abb. 3.23).

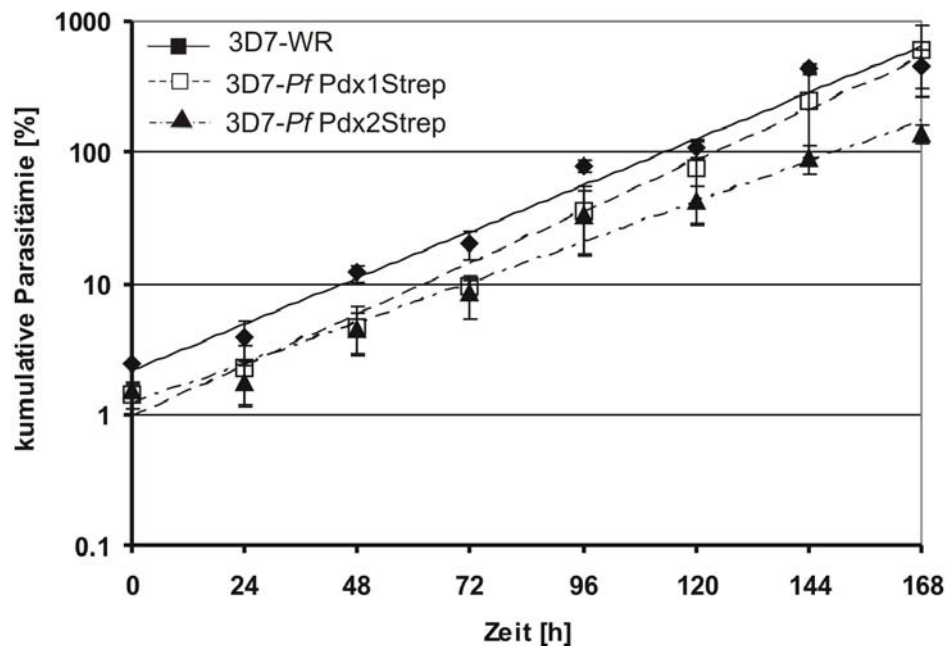


Abb. 3.23: Wachstum der transgenen Zelllinien mit Resistenz gegen WR99210. Das Wachstum der transgenen Zelllinien 3D7-*Pf Pdx1Strep* (offenes Quadrat) und 3D7-*Pf Pdx2Strep* (Dreieck) im Vergleich zur MOCK-Plasmid-Zelllinie 3D7-WR (gefülltes Quadrat) wurde über einen Zeitraum von 168 h verfolgt und die Parasitämie unter Berücksichtigung der angewendeten Verdünnungsfaktoren ermittelt. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen berechnet und sind als Trendlinien mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

Die Analyse der Blasticidin S-resistenten Zelllinien 3D7-Bsd und 3D7-*Pf Pdx2Myc* ergab die Kurvengleichungen $y=1,5339e^{0,0305x}$ ($R^2=0,9329$) sowie $y=2,2887e^{0,0281x}$ ($R^2=0,9650$), und damit Verdoppelungszeiten der Parasiten von 22 h bzw. 24 h. Die zugehörigen Wachstumskurven zeigt Abbildung 3.24.

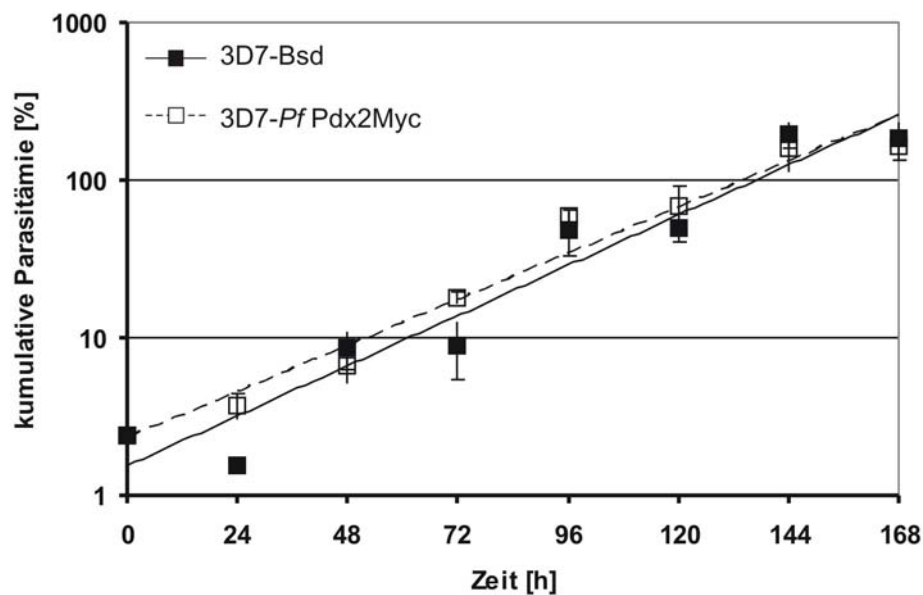


Abb. 3.24: Wachstum Blasticidin S-resistenter, transgener *P. falciparum*-Zelllinien. Das Wachstumsverhalten der *PfPdx2*-überexprimierenden Zelllinie 3D7-*PfPdx2Myc* (offenes Quadrat) wurde über einen Zeitraum von 168 h verfolgt und mit der Zelllinie 3D7-Bsd (gefülltes Quadrat) verglichen. Die kumulative Parasitämie wurde berechnet und als Trendlinie mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt. Die Daten stammen aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Für das Wachstum der co-transgene Zelllinie 3D7-WR/Bsd (Abb. 3.25, gefülltes Quadrat), wurde die Gleichung $y=1,75e^{0,0404x}$ und das Bestimmtheitsmaß $R^2=0,9401$ ermittelt. Die Verdoppelungszeit der Parasiten beträgt 17,0 h. Die Wachstumskurve der Zelllinie 3D7-*PfPdx1Strep/PfPdx2Myc* (Abb. 3.25, offenes Quadrat), wird durch die Funktion $y=1,3538e^{0,0337x}$ bei $R^2=0,9802$ beschrieben. Es ergibt sich daraus eine Verdoppelungszeit der Zellen von 20,5 h. Die Kurvengleichung für das Wachstum der Zelllinie 3D7-*PfPdx1Strep/PfPdx2E53YMyC* (Abb. 3.25, Dreieck) ist $y=2,1742e^{0,0324x}$, das Bestimmtheitsmaß liegt hier bei $R^2=0,9809$. Die Parasiten benötigen für eine Verdoppelung 21,3 h. Die erstellten Wachstumskurven sind in Abbildung 3.25 dargestellt.

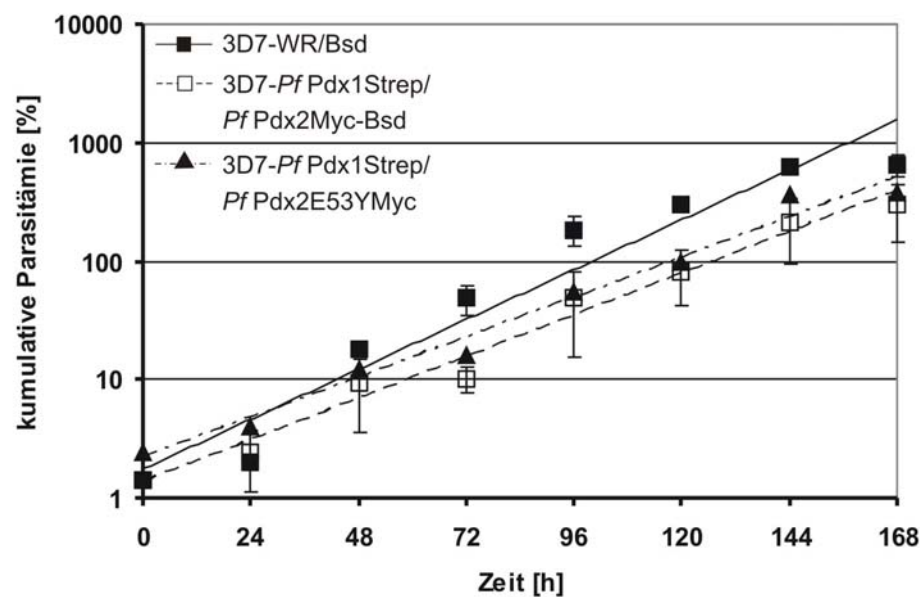


Abb. 3.25: Wachstum von WR99210- und Blasticidin S-resistenten co-transgenen Zelllinien. Das Wachstum der *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2-überexprimierenden Zelllinien 3D7-*Pf*Pdx1Strep/*Pf*Pdx2Myc (offenes Quadrat) und 3D7-*Pf*Pdx1Strep/*Pf*Pdx2E53YMyc (Dreieck) wurde über einen Zeitraum von 168 h mit dem Wachstum der co-transgenen MOCK-Zelllinie 3D7-WR/Bsd (gefülltes Quadrat) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen als Trendlinie mit dazugehöriger Standardabweichung.

3.4 Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf das Vitamin B6-Biosynthese-Enzym *Pf*Pdx1

Zur Untersuchung der Frage, welche Funktion die Vitamin B6-Biosynthese für *P. falciparum* hat, wurde der Einfluss von oxidativem Stress auf das Enzym *Pf*Pdx1 untersucht. Für andere Organismen, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* und *Cercospora nicotinae* ist beschrieben, dass die Transkription von Pdx1 (SOR1) als Reaktion auf oxidativen Stress hochreguliert wird (Ehrenshaft et al., 1999b; Denslow et al., 2007). Erste Versuche mit Methyleneblau zeigten auch bei *P. falciparum* eine Stressregulierbarkeit der Vitamin B6-Biosyntheseenzyme *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 (Wrenger et al., 2005). Im Vergleich zu Methyleneblau (MB) wurde eine Plasmodienkultur mit Roseoflavin (RF), einem Strukturverwandten von

Methylenblau, sowie Cercosporin (CS) behandelt und die Transkriptmenge von *Pf* Pdx1 mittels Northern-Blot untersucht. Die Strukturen der verwendeten Substanzen sind in Abbildung 3.26 dargestellt..



Abb. 3.26: Strukturen der als Stressoren eingesetzten Substanzen Methylenblau, Roseoflavin und Cercosporin.

Zur Erzeugung einer weiteren Art von oxidativem Stress wurde ein Teil der Zellkultur mit Glucoseoxidase inkubiert. Dieses Enzym setzt Glucose um, wobei H_2O_2 entsteht (Meierjohann et al., 2002).

Um die für die Tests geeigneten Konzentrationen von Methylenblau, Cercosporin und Roseoflavin zu ermitteln, wurden zunächst die IC_{50} -Werte der Substanzen in der Plasmodienkultur bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des Hypoxanthin-Einbautests (siehe Kapitel 2.4.9). Dieser ergab für Methylenblau einen IC_{50} von $4,1 \pm 0,6$ nM ($n=3$), für Roseoflavin $7,4 \pm 3$ μ M ($n=3$) und für Cercosporin $0,5 \pm 0,1$ μ M ($n=3$).

3.4.1 Northern-Blot-Analyse von *Pf*Pdx1

Für die Analyse der Transkriptmenge von *Pf* Pdx1 unter Stresseinfluss wurden je 100 ml einer Zellkultur, die überwiegend junge Trophozoiten enthielt, mit 4 nM Methylenblau, 5 μ M Roseoflavin, 150 nM Cercosporin bzw. 50 mU/ml Glucoseoxidase behandelt. Die Zellen wurden nach Zugabe der Stressoren für 4 h bei 37°C inkubiert, im Anschluss mittels Saponin-Lyse lysiert und die RNA isoliert. Pro 100

ml Ausgangskultur konnten aus den Parasiten 60-100 µg RNA gewonnen werden. Der Northern-Blot, der in Abbildung 3.27 dargestellt ist, zeigte bei Beprobung der Membran mit einer radioaktiv markierten, spezifischen *PfPdx1*-Sonde jeweils eine Bande mit einer Größe von ca. 2.400 bp. Die RNA-Bande war bei den Zellen, die mit Metylenblau, Roseoflavin und Cercosporin behandelten worden waren, deutlich intensiver, als bei unbehandelten bzw. mit Glucoseoxidase behandelten Zellen.

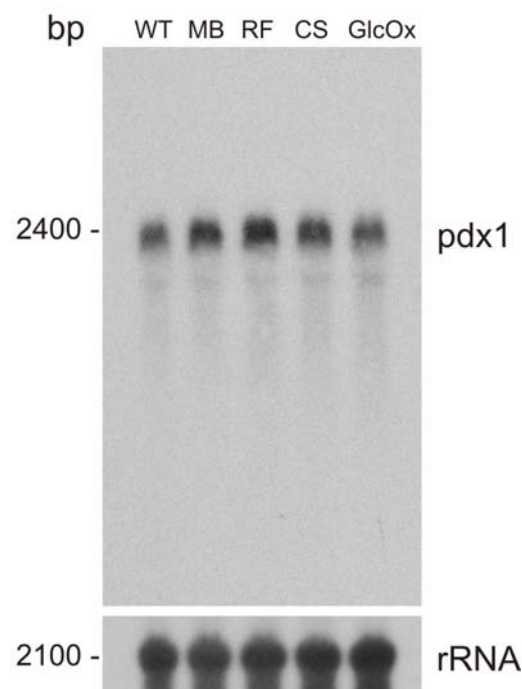


Abb. 3.27: Northern-Blot mit spezifischer *PfPdx1*-Sonde. WT: 3D7 unbehandelt; MB: 3D7 + 4 nM Metylenblau; RF: 3D7 + 5 µM Roseoflavin, CS: 3D7 + 150 nM Cercosporin; GlcOx: 3D7 + 50 mU/ml Glucoseoxidase. Als Ladekontrolle diente eine spezifisch gegen die 18S rRNA gerichtete Sonde, die ein Transkript mit einer ungefähren Größe von 2.100 bp detektiert.

3.4.2 Microarray-Analysen zum genomweiten Screening der Genregulation von *P. falciparum* unter Einfluss von Singulett-Sauerstoff-Stress

Die Durchführung der Microarray-Analysen diente in erster Linie der Untersuchung des Einflusses von Methylenblau-Stress auf die Transkription des Gens *Pfpdx1*. Die Auswertung des erhaltenen Toptables ergab für *Pfpdx1*, das auf dem Array unter dem Namen Pfa3D7 chr6_00096.glm_7 geführt ist, die DeRisi-Oligo-ID-Nummer oPFF72430 sowie die PlasmoDB-Identifikationsnummer PFF1025c. In der erstellten Genliste ist das Gen auf Position 54 zu finden. Der Wert logFC beträgt $0,574 \pm 0,00019$, was einer Erhöhung der Transkriptmenge unter Methylenblau-Stress um den Faktor 1,49 entspricht. Das am stärksten hochregulierte Gen war das hypothetische Protein PFI0895c mit einem logFC von $0,89 \pm 4,1 \cdot 10^{-5}$. Die Transkriptmenge ist hier um Faktor 1,85 erhöht.

3.5 Charakterisierung der plasmodialen Paranitrophenylphosphat-Phosphatase (*PfPNPase*)

PLP wird von Plasmodien über die *de novo*-Biosyntheseenzyme *PfPdx1* und *PfPdx2* synthetisiert, kann aber auch durch die Phosphorylierung von Pyridoxal durch die plasmodiale Pyridoxalkinase (*PfPdxK*) hergestellt werden. Um das Gleichgewicht zwischen dem aktiven Cofaktor PLP und inaktiven Vorläufer-Molekülen zu regulieren, benötigt der Parasit ein Enzym, das in der Lage ist, PLP zu dephosphorylieren. Da von Erythrozyten bekannt ist, dass sie sowohl über eine PdxK als auch über eine Pyridoxalphosphat-Phosphatase verfügen, wurde in der Plasmodien-Genomdatenbank (<http://www.plasmodb.org>) nach einem Enzym mit Homologie zur erythrozytären PLP-Phosphatase (Fonda, 1992) gesucht. Trotz intensiver „BLAST“-Suchen konnte jedoch kein Gen mit Homologie zu PLP-Phosphatasen anderer Organismen identifiziert werden.

Von einer anderen Gruppe von Phosphatasen, den Paranitrophenylphosphat-Phosphatasen ist bekannt, dass diese ein weites Substratspektrum besitzen und somit in der Lage sind, eine Vielzahl von phosphorylierten Molekülen zu dephosphorylieren. Aufgrund dieses großen Substratpektrums ist zu erwarten, dass auch PLP von einer unspezifischen Phosphatase als Substrat akzeptiert wird.

Mit Hilfe der Sequenz des Paranitrophenylphosphat-Phosphatase-Gens *PHO13* von *S. cerevisiae* konnte durch BLAST-Suche im Plasmodien-Genom (Gardner et al., 2002) ein offener Leserahmen identifiziert werden, der Homologien zur verwendeten *S. cerevisiae*-Sequenz aufwies und daher eine Paranitrophenylphosphat-Phosphatase (*Pf* PNPase) darstellen könnte. Die korrespondierende PlasmoDB-Identifikationsnummer ist PF07_0059.

3.5.1 Genomische Struktur

Der offene Leserahmen der putativen Paranitrophenylphosphat-Phosphatase (*Pf* PNPase) befindet sich auf Chromosom 7 und umfasst 969 Basenpaare. Das resultierende Protein besteht aus 322 Aminosäuren und hat eine berechnete molekulare Masse von 36,8 kDa.

Ein Alignment der Aminosäuresequenz mit homologen Proteinen anderer Organismen ergab eine Homologie von 26% zu *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*, AC: X51611), 34% zu *Dictyostelium discoideum* (*Dd*, AC: XM_633284), 29% zu *Candida albicans* (*Ca*, AC: XM_708997), 28% zu *Aspergillus clavatus* (*Ac*, AC: XM_001270851), 38% zu *Arabidopsis thaliana* (*At*, AC: AK118640) und 29% zu *Pichia stipitis* (*Ps*, AC: XM_001382517). Abbildung 3.28 zeigt das Alignment der genannten Sequenzen.

<i>Pf</i>	MALIYSSDKDDDIINVEKKYESFLKEWNLNKMINSKDLCEFDVFFDCDGLVWHGNE	60
<i>Sc</i>	-----MTAQQGVPIKITN-KEIAQEFLDK-----YDTFLFDCDGLVWLGSA	41
<i>Dd</i>	-----MNLVTYSTKIDEENKKSFIDS-----IDTFIFDCDGLVWIADTI	39
<i>Ca</i>	-----MSIKITS-KDQVNQLLQDK-----YDYFLFDCDGLVWLGSDHL	35
<i>Ac</i>	-----MTPAPRYLTGDKKEGIKEFLDR-----FDVFLFDCDGLVWLGSDLV	39
<i>At</i>	-----MAPQLLSSSNFKSLFDS-----VDTFLFDCDGLVWIKGETL	35
<i>Ps</i>	-----MSVKITN-KEQVQSLGQ-----YDYFLFDCDGLVWLGSDHL	35
	. :. :. : * :*****:* ..	
<i>Pf</i>	IEGSIEVINYLRLR-EGKKVYFITNNSTKSRASFLEKFKHKLGFNTVKREHI ICTAYAVTKY	119
<i>Sc</i>	LPYTLEILDLLKQ-LGKQLIFVTNNSTKSRLAYTKKFASFGI-DVKEEQIFTSGYAPAVY	99
<i>Dd</i>	VPGALETNLYLRQTLGKKILFVTNNSTKTRQQFLEKIKSFNIEAFI-DEVYSSYGAAY	98
<i>Ca</i>	LPSIPEAISLLRS-KNKQVIFVTNNSTKSRNDYLKFKELGIPDISKQEIFGSSYASAI	94
<i>Ac</i>	YPGTVETLEMLRS-NGKQVVFVTNNSTKSRADYRKKLEKLGIPSSST-EEIFSSYSASI	97
<i>At</i>	IDGVSQTLDLIRS-KGKNVVFVTNNSVKSRQYAEKFRSLGVTSTITQDEIFSSSFAAMY	94
<i>Ps</i>	LPHVPTLNLKKE-HRKTVIFVTNNSTKSRDDYLKFKELGIPDISKQEIFGSSYASAVY	94
	: :. : * :*****:* : :. :. : : : : : : : : : : : : : : : : :	
<i>Pf</i>	LYDKEEYRLRKKKIYVIGEGKICDELNASLNDWLGGSND-----NDKKIILKDDL	169
<i>Sc</i>	IRDFLKLQPGKDKVWVFGESGIGEELKLMGYESLGGADSRDLTP---FDAKSPFLVNG-	155
<i>Dd</i>	LN-QINFPKETKQVFIIGEHGLEKELNDQNFKTIKEIN-----KDKDGLDSVQ	145
<i>Ca</i>	IDKILKLPKDK-KVWVLGEGKIEQELHELGYTTVGGSDPDLISSGVDFDSND-PRLNK--	150
<i>Ac</i>	ISRIKLLENKRKQVFIIGETGIEQEELKMGYENVPFVIGGTDPAAYRRD---VTTEYKLTISGD	154
<i>At</i>	L--KVNFPKDKKVYVIGEGVLEELQIAGFTGLGGPED-----GEKKAQWKSNS	142
<i>Ps</i>	IDKILKLPKDK-KVWVLGEGKIEKELKELGYTTVGGSDPVLVQDGVAFDPEH-PHLVE--	150
	: : * : : * * : . * . :	
<i>Pf</i>	EIIIVDKNIGAVVVGIDFNINYYKIQYAQLCINELN--AEFIATNKDATGNFTSKQKWAGT	227
<i>Sc</i>	---LDKDVSCVIAGLDTKVNHRLAVALTLQYLQKD--SVHFVGTNVDSTFPQKG-YTFPGA	209
<i>Dd</i>	NTAIDKDVGAIVGMDTQLTFQKATYAHMCIKEIEG-CLFIATNPDTSYVPKNEKTLPGA	204
<i>Ca</i>	---LDNDVGCVLGCLVFNLYLKLSTLQYLLKDKKTIPIFIATNIDSTFPANG-KLLIGA	206
<i>Ac</i>	SSLIDPEVGVVVLGDRHINYLKLALAYHYVVKRG--AVFLATNIDSTYPNEG-ALFPGA	210
<i>At</i>	LFEHDKSVGAVVVGDPNINYYKLYGTLCVRENPG-CLFIATNRDAVGHMTDLQEWPGA	201
<i>Ps</i>	---LDEDVGAVLAGLTLNLYLKLSTLQYLLKDKKSLPFIATNIDSTFPKSG-KLLIGA	206
	* :. : * : * : :. : : : : : : : : * : * * * : : * :	
<i>Pf</i>	GAIVSSIEAVSLKPP-IVVGKPNVMIENVLKDNLN---IHHSKVVMIIGDRLETDIHFAN	283
<i>Sc</i>	GSMIESLAFSSNRPP-SYCGKPNQNLNSIISAFN-LDRS--KCCMVGDRLNTDMKFGVE	265
<i>Dd</i>	GSIVAMIQTSTGVKP-ITIGKPETLLLDVILKKN---LNPRTLFGDRLDTDIAFAVN	260
<i>Ca</i>	GSIIETVAFASGRQPEAICGKPNQSMMSIKADFPDLGKTPKRGLMIGDRLNTDMKFGRD	266
<i>Ac</i>	GSMSAPLIMMLGQEP-VSLGKPNQAMMDAIEGKFK-FDRS--RTCMVGDRVNTDIRFGVE	266
<i>At</i>	GCMVAAMCGSTEREP-IVVGKPNQSMMSIKADFPDLGKTPKRGLMIGDRLNTDMKFGQN	257
<i>Ps</i>	GSIIETVAFASGRQPDVAVCGKPNQSMMSIKADNPGLRETPKRGLMIGDRLNTDMKFGRD	266
	* :. : : * * * . : : : : : : : : : : : * : * * * : * : :	
<i>Pf</i>	CNIK-SILVSTGVTNANIYLNHNSLNIHPDYFMKSISELL----- 322	
<i>Sc</i>	GGLGGTLLVLSGIETEERTLKISHDYPRPKFYIDKLGDIYALTNNEL 312	
<i>Dd</i>	GGIR-SLLVLTGISKLEINNIDSK-INPNYYTNTIADLLPSNNN-- 303	
<i>Ca</i>	GGLD-TLLVLTGIEETEENVKSLNENE-TPTYINKLGDHFELNN-- 308	
<i>Ac</i>	GKLGTTGLVLTGVSTKEDFLAG---PTRPAIYLDKLSDLLDAK---- 306	
<i>At</i>	AGCK-TLLVLTGVTSESNLLDKGNK-IEPDYTTSTVSDI IKLMESP- 301	
<i>Ps</i>	GGLD-TLLVLTGIEETEENVLKQPKDV-APTYYASKLGDLYDFCN-- 308	
	: : * : * : . . * : : : : : :	

Abb. 3.28: Sequenzalignment von Phosphatasen verschiedener Organismen. Identische Aminosäuren sind durch Sternchen, Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften durch Punkte oder Doppelpunkte gekennzeichnet. Die verwendeten Abkürzungen sind im Text erklärt. Für *S. cerevisiae* als hoch konserviert beschriebene Motive sind grau unterlegt.

Für die homologen Proteine PHO13 und PHO2 der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sind außerdem zwei Sequenzmotive als hoch konserviert beschrieben (Yang et al., 1991). Die beiden Motive, GKQXIFVXNNSTKSR und VGDRLENTD sind in leicht abgewandelter Form als GKKXYFIXNSTKSR und IGDRLETD an den Positionen 75-89 und 270-277 (Abb. 3.28, grau unterlegte Bereiche) auch in der Sequenz der plasmodialen PNPase zu finden.

3.5.2 Funktionsanalyse der PNPase

Um die Funktionalität des Enzyms zu untersuchen, wurde der vollständige offene Leserahmen zunächst von plasmodialer Gesamt-RNA mittels reverser Transkription amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde dann in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und das Konstrukt mittels automatischer Sequenzierung auf eventuelle Basenaustausche überprüft.

Nach Transformation der DNA in *E. coli* BLR DE3-Expressionszellen wurde das Protein rekombinant exprimiert und unter Verwendung einer Strep-Tactin-Sepharose-Matrix aufgereinigt. Abbildung 3.30 A zeigt die verschiedenen Aufreinigungsstufen sowie das eluierte Protein, das eine Größe von 38 kDa aufweist. Diese stimmt sehr gut mit der berechneten molekularen Masse des Proteins von 36,8 kDa überein. Die Differenz der Massen lässt sich durch den an das rekombinant hergestellte Protein fusionierten Strep-Tag erklären, der eine Größe von 1,2 kDa hat. Pro Liter Expressionskultur konnten im Durchschnitt 0,13 mg Protein isoliert werden.

Zur Ermittlung der Substratspezifität der potentiellen Paranitrophenylphosphat-Phosphatase wurden im Standard-Aktivitätstest verschiedene phosphorylierte Moleküle als Substrate eingesetzt. Wie erwartet stellte sich Paranitrophenylphosphat als das beste Substrat heraus. Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug hier $9 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (n=5). Da dieses Substrat aber nicht natürlich in der Zelle vorkommt, wurden verschiedene in der Zelle verfügbare Moleküle als Substrate

angeboten. Die Substrate mit der höchsten Aktivität waren hier ATP, ADP und Thiaminpyrophosphat (TPP, siehe Abb. 3.29), diese waren mit $262 \pm 21 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $259 \pm 13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und $263 \pm 22 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein allerdings um Faktor 40 geringer als beim Einsatz von Paranitrophenylphosphat. Die Aktivitäten der Substrate CTP, Pyridoxalphosphat (PLP), Fructose-6-Phosphat (F-6-P), Glucose-6-Phosphat (G-6-P), Thiaminmonophosphat (TMP) und AMP lagen im Vergleich zu ATP bei 95%, 93%, 91%, 83%, 79% und 64%. PLP wird somit eindeutig von der *Pf* PNPase als Substrat akzeptiert und kann auf diese Weise dephosphoryliert werden.

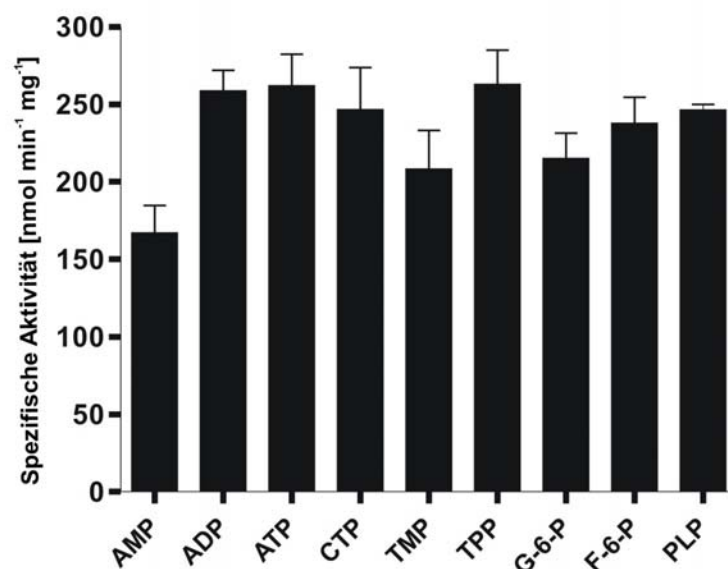


Abb. 3.29: Substratspezifität der *Pf*PNPase. Dargestellt ist die spezifische Aktivität des Enzyms bei Angebot verschiedener phosphorylierter Moleküle als Substrate.

Da Phosphatasen in verschiedenen oligomeren Formen vorkommen, wurde die plasmodiale PNPase zur Ermittlung des oligomeren Status mittels Gelfiltration (FPLC) analysiert. Anschließend wurde die Proteinaktivität der Eluatfraktionen bestimmt. Die maximale Aktivität war in den Fraktionen 53-55 zu detektieren. Diese entsprachen einer molekularen Masse des Proteins von 80 kDa und damit einem PNPase-Dimer (Abb. 3.30 B). Das stadienspezifische Expressionsmuster des Proteins im Verlauf der erythrozytären Schizogonie der Parasiten wurde durch

Northern-Blot-Analysen untersucht. Dafür wurde eine Parasitenkultur synchronisiert und die Zellen in verschiedenen Stadien, Ringe, Trophozoiten und Schizonten, mittels Saponinlyse isoliert. 25 µg der gewonnenen RNA wurden mittels Northern-Blot analysiert. Der Blot, dargestellt in Abbildung 3.30 C, zeigte nach Beprobieren mit einer radioaktiv markierten, spezifischen *Pf* PNPase-Sonde eine Bande mit einer ungefähren Größe von 2,6 kb, die in allen Parasitenstadien etwa gleich stark auftrat. Dies lässt darauf schließen, dass die RNA in allen Parasitenstadien in gleicher Menge vorhanden ist und das Protein während des gesamten Lebenszyklus des Parasiten durchgängig translatiert wird. Als Ladekontrolle diente eine gegen die 18S rRNA gerichtete Sonde.

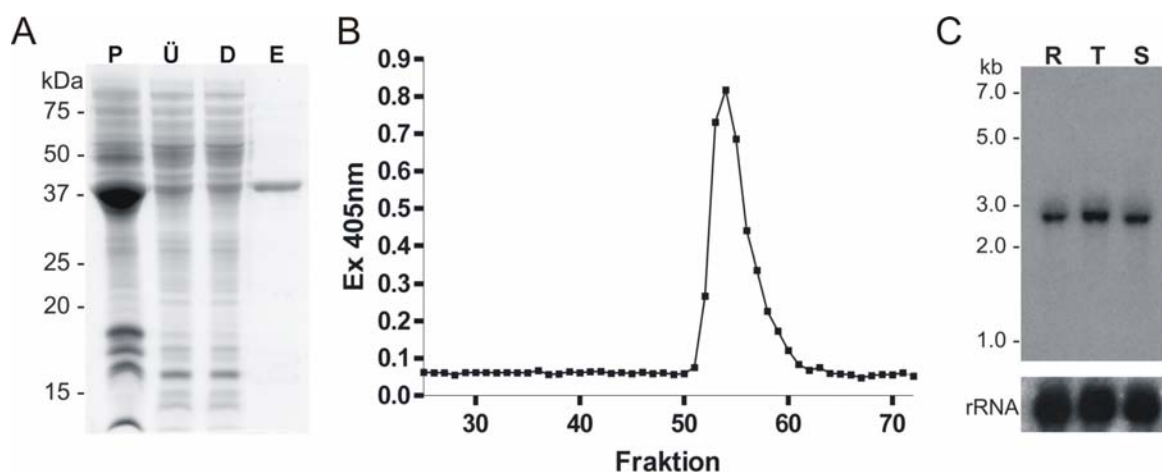


Abb. 3.30: Analyse der *Pf* PNPase. (A) SDS-PAGE der *Pf* PNPase nach Coomassie-Färbung. P: Bakterienpellet, Ü: Überstand vor Beladen der Strep-Tactin-Säule, D: Durchfluss nach Bindung des Proteins an die Strep-Tactin-Matrix, E: *Pf* PNPase im Eluat, (B) Aktivitätsprofil der *Pf* PNPase nach FPLC. Je 85 µl der Eluatfraktionen wurden nach der FPLC-Analyse im Aktivitätstest mit Paranitrophenylphosphat als Substrat eingesetzt und nach 30 min die Absorption der Probe bei 405 nm bestimmt. Die detektierte Enzymaktivität lag in den Fraktionen 53-55. Die *Pf* PNPase eluierte somit bei einer Größe von 80 kDa und war als Dimer aktiv. (C) Stadienspezifischer Northern-Blot der *Pf* PNPase. R: Ringstadium (12 ± 4 h), T: Trophozoitenstadium (26 ± 4 h), S: Schizontenstadium (40 ± 4 h), rRNA: Ladekontrolle (18SrRNA). Das Transkript der *Pf* PNPase hat eine Größe von ca. 2,6 kbp und ist in allen Stadien in gleicher Menge vorhanden.

3.5.3 Lokalisierung der *Pf*PNPase

Zur Lokalisierung der *Pf*PNPase in den Parasiten wurde der vollständige offene Leserahmen des Gens in den Vektor pARL1a- kloniert und das Konstrukt in Parasiten transfiziert. Das Konstrukt führt in den transgenen Parasiten zur Überexpression eines *Pf*PNPase-GFP-Fusionsproteins. Dieses kann durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 580 nm im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde Hoechst-Farbstoff im Verhältnis 1:1.000.000 zu den Zellen gegeben und diese für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Abbildung 3.31 zeigt verschiedene Blutstadien von *P. falciparum* im Live-Bild, mit Hoechst-Farbstoff zur Anfärbung des Zellkerns, die GFP-Fluoreszenz, sowie eine Überlagerung aller drei Bilder. Die GFP-Fluoreszenz zeigt eine eindeutige cytosolische Lokalisierung des Proteins (Knöckel et al., 2008).

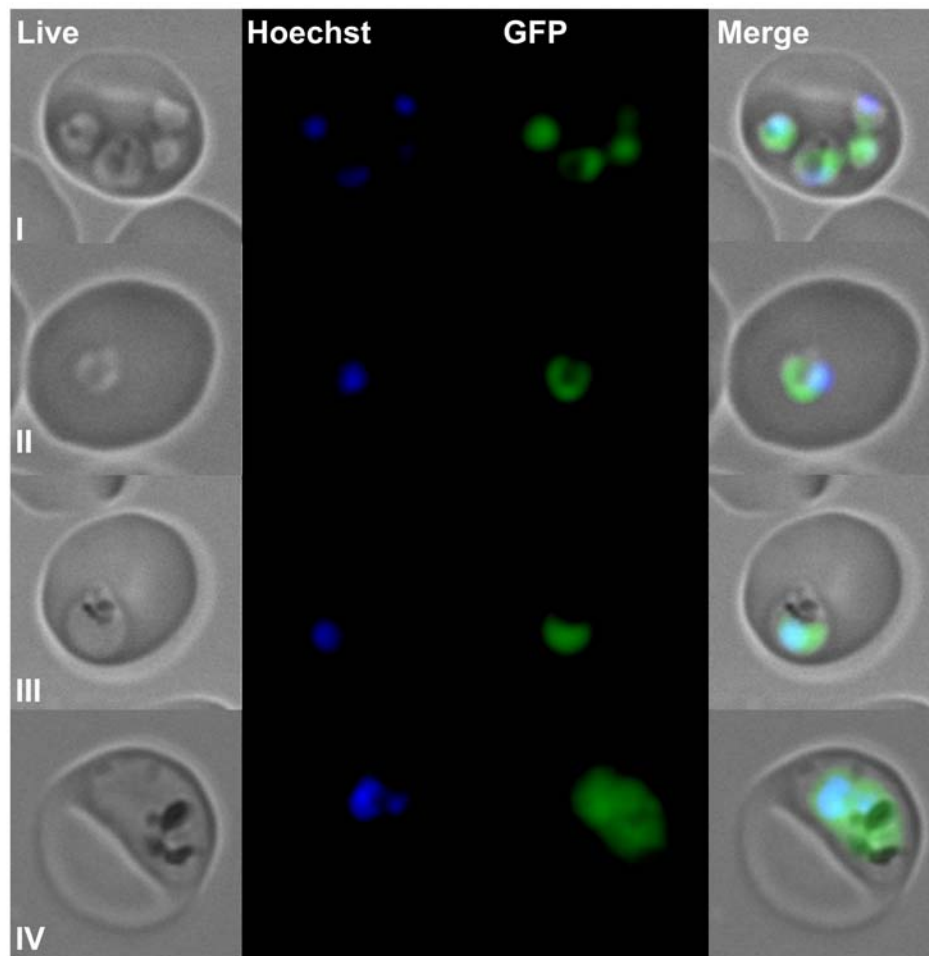


Abb. 3.31: Lokalisierung der *PfPNPase*. Unterschiedliche Blutstadien des Parasiten wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie mit einem Axioskop 2 plus Mikroskop analysiert. (I) Ringstadium (multiple Infektion), (II) Ringstadium, (III) junger Trophozoit, (IV) alter Trophozoit. Live: Live-Bild des Parasiten, Hoechst: Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst-Farbstoff, GFP: GFP-Fluoreszenz, aufgenommen mit dem GFP-Kanal des Mikroskops, Merge: Überlagerung aller Bilder.

4. Diskussion

4.1 Die Vitamin B6-Biosynthese von *P. falciparum*

Pyridoxalphosphat (PLP), die aktive Form von Vitamin B6, stellt einen wichtigen Cofaktor für über 100 Enzyme dar. Während der Mensch auf die Aufnahme von Vitamin B6 über die Nahrung angewiesen ist, verfügen Pilze, Pflanzen, einige Bakterien sowie der apikomplexe Parasit *Plasmodium falciparum* über einen Vitamin B6-*de novo*-Syntheseweg (Ehrenshaft et al., 1999a; Osmani et al., 1999; Dong et al., 2004; Tambasco-Studart et al., 2005; Wrenger et al., 2005). Erst kürzlich konnte auch bei dem Parasiten *Toxoplasma gondii*, der wie *P. falciparum* zum Stamm der Apikomplexa gehört, eine Vitamin B6-Biosynthese nachgewiesen werden (Knöckel et al., 2007).

Für die Vitamin B6-Biosynthese sind zwei verschiedene Wege beschrieben worden. Der DOXP (Deoxyxylulose-5-Phosphat)-abhängige Weg kommt vorwiegend bei Bakterien vor und ist bereits gut charakterisiert (Roa et al., 1989; Lam et al., 1992; Lam und Winkler, 1992; Hill et al., 1996). In diesem Syntheseweg wird aus den Substraten Deoxyxylulose-5-Phosphat und 4-Phosphohydroxy-L-Threonin Pyridoxinphosphat gebildet, welches anschließend durch eine Pyridoxinphosphat-Oxidase (PdxH) in den aktiven Cofaktor Pyridoxalphosphat umgewandelt werden muss (Hill et al., 1996; Di Salvo et al., 1998; Drewke und Leistner, 2001).

Bei der DOXP-unabhängigen Biosynthese hingegen wird von den Enzymen Pdx1 (SNO1, YaaD) und Pdx2 (SNZ1, YaaE) der aktive Cofaktor Pyridoxalphosphat (PLP) gebildet. Zur Synthese von PLP dienen hier die Substrate Ribose-5-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Glutamin (Burns et al., 2005; Raschle et al., 2005). Die Synthese von PLP durch die Enzyme Pdx1 und Pdx2 konnte auch für die apikomplexen Parasiten *P. falciparum* und *T. gondii* gezeigt werden. Das Produkt der jeweiligen Pdx1-Reaktionen wurde dafür anstelle von PLP im Aktivitätstest der

plasmodialen Ornithin-Decarboxylase (*Pf* ODC), einem PLP-abhängigen Enzym, eingesetzt (Knöckel et al., 2007). Da die Zugabe der Testansätze der PLP-Synthesereaktionen von *Pf*Pdx1 und *Tg* Pdx1 zur Aktivität der *Pf*ODC führte, ist dies ein Beweis, dass PLP synthetisiert wurde. Bei Vergleich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmten spezifischen Aktivität des plasmodialen Pdx1-Pdx2-Enzymkomplexes mit der von Gengenbacher et al. (2006) publizierten Aktivität der plasmodialen Enzyme Pdx1 und Pdx2 sowie der PLP-Syntheseenzyme YaaD und YaaE von *B. subtilis* von $92,1 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bzw. $140 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, fällt auf, dass die hier bestimmte spezifische Aktivität des *Pf* Pdx1-*Pf* Pdx2-Komplexes mit $746 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein etwa acht mal höher ist. Dieser Unterschied lässt sich sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche Expressions- und Aufreinigungssysteme zur Herstellung der rekombinanten Proteine zurückführen. Von Gengenbacher et al. (2006) wurden His-Tag-Fusionsproteine verwendet und in einem Puffer eluiert, der β -Mercaptoethanol sowie Imidazol enthielt. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden die Proteine über einen fusionierten Strep-Tag aufgereinigt und anschließend in Puffer W (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0) eluiert. Die verschiedenen Zusätze der eingesetzten Puffer könnten die Aktivität des Proteins beeinflussen und somit die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der Enzyme erklären.

4.1.1 Strukturelle Analyse des PLP-Synthase-Komplexes von *P. falciparum*

Die Analysen der Kristallstrukturen des PLP-Synthase-Komplexes von *Thermotoga maritima* und *Bacillus subtilis* zeigten, dass der Enzymkomplex aus je zwölf Pdx1- und zwölf Pdx2-Molekülen besteht. Die Pdx1-Proteine bilden zwei hexamere Ringe, welche sich zu einer „Doppelkrone“ zusammenlagern (Zhu et al., 2005). An jedes der Pdx1-Moleküle ist ein Pdx2-Molekül gebunden, wobei die Pdx2-Moleküle als Monomere vorliegen und keine Verbindung untereinander haben (Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006). Die an der Bindung zwischen Pdx1 und Pdx2 beteiligten Aminosäuren wurden bereits beschrieben (Strohmeier et al., 2006), wohingegen die

Bindung zwischen Pdx1-Molekülen, die für die Ausbildung des dodecameren Pdx1-Komplexes essentiell ist, bislang nicht analysiert wurde.

4.1.2 Die Bindung zwischen Pdx1-Molekülen

Um die Bindung zwischen den Pdx1-Molekülen zu untersuchen, wurden anhand der bekannten Kristallstrukturen Aminosäuren identifiziert, die hoch konserviert und an der Grenzfläche zwischen zwei Pdx1-Molekülen lokalisiert sind (Zhu et al., 2005; Zein et al., 2006). Diese Aminosäuren, im plasmodialen Pdx1-Enzym R85, H88 und E91, wurden gegen Alanin ausgetauscht, wobei die Einzelmutanten *Pf* Pdx1R85A, *Pf* Pdx1H88A, *Pf* Pdx1E91A sowie die Dreifachmutante *Pf* Pdx1RHE entstanden. Die Mutante *Pf* Pdx1R85A war nicht exprimierbar und konnte daher nicht analysiert werden. Hingegen führten die Austausch von H88 oder E91 zu Alanin sowie die Dreifachmutation von R85, H88 und E91 sowohl zum Aktivitätsverlust der rekombinanten Enzyme, als auch zum Verlust der Bindungsfähigkeit der *Pf*Pdx1-Proteine untereinander. Die Bindung von *Pf*Pdx2 an *Pf*Pdx1 war bei den Einzelmutanten *Pf*Pdx1H88A und *Pf*Pdx1E91A reduziert und bei der Dreifachmutante *Pf*Pdx1RHE nicht mehr möglich. Die Aminosäuren R85, H88 und E91 spielen demnach für die Formierung des plasmodialen PLP-Synthase-Komplexes eine entscheidende Rolle.

4.1.3 Das aktive Zentrum von Pdx1

Für die PLP-Synthese werden vom Pdx1-Enzym die Substrate Ribose-5-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat sowie Ammoniumionen benötigt. Diese werden vom Pdx2-Enzym durch Umsatz von Glutamin zu Glutamat hergestellt und an Pdx1 geleitet. Anhand der Kristallstruktur des PLP-Synthase-Komplexes von *T. maritima* wurde eine Beteiligung der Aminosäuren E135, R138 und R139 an der Bindung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat identifiziert (Zein et al., 2006), die den Aminosäuren E136, R139 und R140 im plasmodialen Pdx1-Enzym entsprechen. Diese Aminosäuren wurden im *Pf*Pdx1-Protein in Form der Dreifachmutante *Pf*Pdx1ERR gegen

Alanin ausgetauscht, um ihre Beteiligung an der Substratbindung zu untersuchen. Die Mutation der Aminosäuren führte zu inaktivem Protein, die Zusammenlagerung des Pdx1-Pdx2-Komplexes war jedoch nicht beeinträchtigt. Dies zeigt die Bedeutung der Aminosäuren für die Enzymaktivität von *Pf*Pdx1, die Konformation des PLP-Synthase-Komplexes wird hingegen von ihnen nicht beeinflusst.

Mit der Bindung des zweiten Substrates, Ribose-5-Phosphat, werden bei *T. maritima* die Aminosäuren D24, K81 und K149 im YaaD-Protein (Pdx1) in Verbindung gebracht (Zein et al., 2006). Die homologen Aminosäuren im plasmodialen Pdx1-Enzym sind D26, K83 und K151. Um ihre Beteiligung am aktiven Zentrum von *Pf* Pdx1 zu untersuchen, wurden diese Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht, wobei die Einzelmutanten *Pf* Pdx1D26A, *Pf* Pdx1K83A und *Pf* Pdx1K151A, sowie die Dreifachmutante *Pf* Pdx1DKK (D26A, K83A, K151A) generiert wurden. Alle genannten Mutationen im plasmodialen Pdx1-Protein führten zu einem Verlust der Aktivität von *Pf* Pdx1, gleichzeitig zeigten Coaufreinigungsexperimente, dass die Fähigkeit zur Bindung von *Pf* Pdx2 an die mutierten Pdx1-Proteine nicht beeinträchtigt ist.

Die Analyse der Dreifachmutante *Pf*Pdx1DKK mittels SLS ergab, dass der Austausch dieser drei Aminosäuren gegen Alanin zum Zerfall des dodecameren *Pf* Pdx1-Komplexes in zwei hexamere Ringe führt. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Glutamin zu 50% aufgehoben werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass Glutamin nicht nur als Substrat für das *Pf*Pdx2-Enzym fungiert, sondern auch eine stabilisierende Wirkung auf den *Pf*Pdx1-Enzymkomplex hat.

Die Untersuchung der Einzelmutanten *Pf* Pdx1D26A und *Pf* Pdx1K83A erbrachte keinen Einfluss auf den oligomeren Status des Enzymkomplexes, der weiterhin als Dodecamer vorlag. Der Austausch der Aminosäure K151 gegen Alanin führte hingegen zur Destabilisierung des *Pf*Pdx1-Komplexes und zum Zerfall in hexamere Ringe. Im Strukturmodell des Pdx1-Enzymkomplexes von *P. falciparum* (siehe Abb. 3.11) ist K151 zentral im Pdx1-Protein lokalisiert und liegt nicht an der Grenzfläche zweier Pdx1-Moleküle. Ein Einfluss auf die Formation des dodecameren

Enzymkomplexes war somit nicht zu erwarten. Jedoch zeigte bereits die Analyse der *T. maritima*-Kristallstruktur für die homologe Aminosäure K149, dass diese nicht zum aktiven Zentrum, sondern zum Zentrum des Pdx1-Komplexes gerichtet ist. Die Untersuchung des PLP-Synthasekomplexes von *B. subtilis* ergab zudem eine Änderung der Proteinstruktur von YaaD während der Komplexbildung (Raschle et al., 2005). Von Burns et al. (2005) konnte allerdings für *B. subtilis* eindeutig die Bindung von Ribose-5-Phosphat an die Aminosäure K149 und somit die Funktion im aktiven Zentrum des Enzyms gezeigt werden. Der Aminosäure kommt damit eine duale Funktion zu, zum einen bei der Substratbindung, zum anderen bei der Bildung des dodecameren Pdx1 (YaaD)-Komplexes.

4.1.4 Interaktionspartner der Aminosäure K151

Um mögliche Interaktionspartner der Aminosäure K151 zu identifizieren, deren Austausch ebenfalls zur Destabilisierung des dodecameren Pdx1-Komplexes führt, wurden mit Hilfe des *Pf* Pdx1-Strukturmodells (vergl. Abb. 3.11) Aminosäuren identifiziert, die mit K151 interagieren könnten. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um E107, E136 und K189. Die Mutation von K189 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität, wohingegen der Austausch von E107 gegen Alanin zur Inaktivierung von *Pf* Pdx1 führte. Die Aminosäure E136 wurde bereits in Form der *Pf* Pdx1ERR-Mutante untersucht und ihre Beteiligung an der Substratbindung gezeigt. Coaufreinigungsexperimente zeigten hier, dass die Bindung von *Pf* Pdx2 an die *Pf* Pdx1-Mutanten nicht beeinträchtigt ist. SLS-Analysen, die zur Aufklärung des oligomeren Status der Proteine durchgeführt wurden, ergaben zudem, dass alle Proteine weiterhin als Dodecamere vorlagen und keine destabilisierende Wirkung auf den Enzymkomplex hatten. Eine Interaktion dieser Aminosäuren mit K151 ist somit unwahrscheinlich.

4.1.5 Flexibilität von K151 ist entscheidend für die Formation des *Pf* Pdx1-Komplexes

Eine weitere Analyse der Aminosäuresequenz von *Pf* Pdx1 zeigte, dass in unmittelbarer Umgebung der Aminosäure K151 drei Glycine liegen, die in allen bekannten Pdx1-Sequenzen hoch konserviert sind. Glycinreste verleihen einer Proteinstruktur Flexibilität und könnten eine dynamische Positionierung von K151 ermöglichen. Im Folgenden sollte der Effekt des Austausches der betreffenden Glycine, G144, G152 und G155, gegen Prolin untersucht werden. Dieser führte zur Präzipitation der rekombinanten Enzyme. Der Austausch der Aminosäure G155 gegen Alanin führte hingegen zu löslichem Protein, welches in SLS-Analysen die Größe eines hexameren Komplexes zeigte. Wie schon die Mutation der Aminosäure K151 verhinderte somit auch der Austausch von G155 gegen Alanin die Zusammenlagerung von zwölf Pdx1-Proteinen zu einem Dodecamer. Da weiterhin hexamere Ringe gebildet werden konnten, war die korrekte Formierung der *Pf* Pdx1:*Pf* Pdx1-Grenzflächen wahrscheinlich nicht beeinflusst. Coaufreinigungsexperimente ergaben außerdem eine uneingeschränkte Bindung von *Pf*Pdx2 an das mutierte Protein, was zeigt, dass auch die Interaktionsflächen von Pdx1 zu Pdx2 nicht verändert wurden. Die Analyse des Proteins *Pf*Pdx1G155A mittels CD ergab allerdings eine signifikante Veränderung der Sekundärstrukturanteile im Vergleich zum *Pf*Pdx1WT-Protein. Der Gehalt an α -Helices war reduziert, wohingegen sich der Gehalt an β -Faltblättern erhöhte. Die Konformationsänderung des Proteins konnte über Vermessung des Proteins mittels DLS bestätigt werden, die eine Zunahme des hydrodynamischen Radius von *Pf*Pdx1G155A gegenüber dem WT-Protein ergab (Knöckel et al., 2009). Da lediglich die Bildung des dodecameren Enzymkomplexes beeinträchtigt war, liegen die Strukturänderungen vermutlich an den Grenzflächen der beiden hexameren Ringe, die sich daraufhin nicht mehr zum dodecameren Enzymkomplex verbinden können. Die Tatsache, dass die Mutante *Pf* Pdx1G155A wie die Mutante *Pf*Pdx1K151A inaktiv war, weist gleichzeitig darauf

hin, dass die Formierung des dodecameren Enzymkomplexes essentiell für eine aktive PLP-Synthese ist.

Die Ausbildung des *Pf* Pdx1-Enzymkomplexes geht demnach mit einer Strukturänderung im Bereich der Aminosäure K151 einher, welche vermutlich durch die Aminosäure G155 vermittelt wird. Diese dynamische Positionierung der Aminosäuren ist für die Bindung von zwei hexameren Pdx1-Ringen und zur Ausbildung des aktiven Pdx1-Dodecamers von Bedeutung (Knöckel et al., 2009).

4.1.6 Die Formierung des PLP-Synthase-Komplexes folgt einer definierten Sequenz

Die Beobachtung, dass *Pf* Pdx1 in Form von Monomeren, Hexameren und Dodecameren vorliegen kann und ausschließlich Hexamere und Dodecamere mit *Pf* Pdx2 interagieren, führt zu der Annahme, dass sich der PLP-Synthase-Komplex in einer bestimmten Reihenfolge zusammenlagert.

Dabei formieren sich sehr wahrscheinlich zuerst die *Pf* Pdx1-Moleküle zu hexameren Ringen, an die dann die *Pf* Pdx2-Enzyme binden. Anschließend lagern sich zwei der *Pf* Pdx2-dekorierten hexameren *Pf* Pdx1-Ringe zum endgültigen und aktiven PLP-Synthase-Komplex zusammen, wobei die Flexibilität der Aminosäure K151 eine entscheidende Rolle spielt. Eine schematische Darstellung des Ablaufs der Komplexbildung findet sich in Abbildung 4.2, 1-4a. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich zuerst der dodecamere Pdx1-Komplex bildet, an den im Folgenden zwölf Pdx2-Moleküle binden. Diese ist in Abbildung 4.2, 1-4b dargestellt. Die genaue Verifizierung beider Möglichkeiten der Zusammenlagerung erfordert weitere strukturelle Analysen.

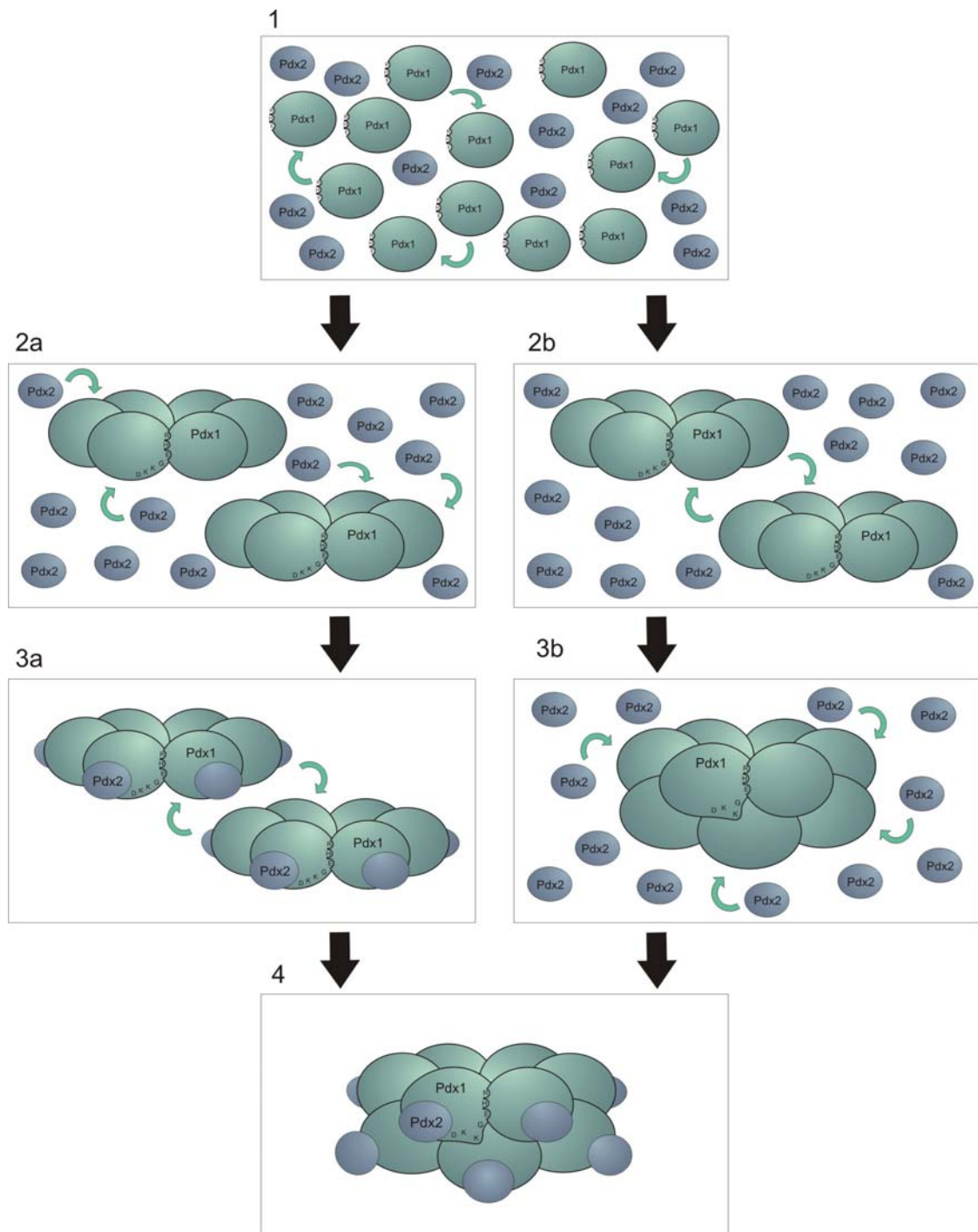


Abb. 4.2: Alternativen der Bildung des PLP-Synthase-Komplexes: *PfPdx1*-Moleküle lagern sich zu hexameren Ringen zusammen, an die sich anschließend die *PfPdx2*-Moleküle binden. Zwei *PfPdx2*-dekorierte Ringe können sich dann über die dynamische Positionierung der Aminosäure K151 zum endgültigen Komplex verbinden (1-4a). Eine zweite Möglichkeit ist, dass sich zuerst der dodecamere *PfPdx1*-Komplex bildet, an den sich anschließend die *PfPdx2*-Moleküle anlagern (1-4b).

4.1.7 Zwischen *PfPdx2* und *PfPdx1* wird ein Substratkanal ausgebildet

Für die Synthese des aktiven Cofaktors PLP durch Pdx1 werden Ammoniumionen benötigt. Diese werden über einen Substratkanal von Pdx2 an Pdx1 weitergeleitet (Strohmeier et al., 2006). Anhand von Strukturanalysen der bakteriellen Enzyme YaaD (Pdx1) und YaaE (Pdx2) wurde ein potentieller Ammoniumkanal identifiziert, an dessen Bildung unter anderem die Aminosäuren E47 und R138 von YaaE beteiligt sind (Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006). Der Austausch der entsprechenden Aminosäuren im plasmodialen Pdx2-Protein, E53 und R154, zu Tyrosin bzw. Tryptophan, führte zum Verlust der Enzymaktivität, was auf eine Behinderung des Ammoniumtransports durch die Seitenketten der eingefügten Aminosäuren hindeutet. Interessanterweise führt die Blockierung des Substratkanals nicht zur Beeinträchtigung der Bindung von *PfPdx1* und *PfPdx2*, obwohl die durchgeführten Mutationen aufgrund ihrer Funktion nahe an der Grenzfläche beider Proteine liegen (Müller et al., 2008).

4.1.8 Überexpression der Vitamin B6-Biosyntheseenzyme in *P. falciparum*

Um die biologische Bedeutung der Vitamin B6-Biosynthese für *P. falciparum* zu eruieren, wurden die beiden Synthese-Proteine *PfPdx1* und *PfPdx2* in Parasiten überexprimiert. Aufgrund der episomalen Überexpression waren im Plasmodienextrakt der Zelllinien 3D7-*PfPdx1*Strep, 3D7-*PfPdx2*Strep, 3D7-*PfPdx2*Myc, 3D7-*PfPdx1*Strep/*PfPdx2*Myc und 3D7-*PfPdx1*Strep/*PfPdx2*E53YMyC deutlich die jeweiligen tag-tragenden Proteine nachweisbar.

Da ein spezifisches polyklonales *PfPdx1*-Antiserum zur Verfügung stand, konnte für die Zelllinie 3D7-*PfPdx1*Strep ein Vergleich der Proteinmengen in 3D7-WT-Zellen und *PfPdx1*-überexprimierenden Zellen durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich, dass beide Proteine (*PfPdx1*WT und *PfPdx1*Strep) in etwa gleicher Menge vorlagen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei Tabakpflanzen gemacht, bei denen die episomale Überexpression der Pdx1- und Pdx2-Proteine von *C. nicotinae* lediglich zu einer Erhöhung der Gesamt-Proteinmenge um 15% führte,

da gleichzeitig die Expression der nativen, pflanzeigenen Proteine reduziert wurde (Herrero und Daub, 2007). Dieser Effekt kann auch für *P. falciparum* nicht ausgeschlossen werden, da die Analyse mittels Western-Blot keine eindeutige Quantifizierung der Mengen von nativem und episomal überexprimiertem Protein zulässt.

Zur Analyse des Einflusses der Überexpression von *PfPdx1* und/oder *PfPdx2* auf das Wachstum der Parasiten wurde dieses über einen längeren Zeitraum verfolgt und die Verdoppelungszeit ermittelt. Da bereits die verwendeten Selektionsdrogen WR99210 und Blasticidin S das Wachstum der Zellen beeinträchtigen könnten, wurden als Kontrollen Parasiten mit den entsprechenden Leervektoren (MOCK-Plasmiden) transfiziert. Der Einfluss der Selektionsdrogen auf das Wachstum der Parasiten wurde beim Vergleich der Verdoppelungszeiten der MOCK-Plasmid-Zelllinien mit 3D7-WT-Parasiten deutlich. Die 3D7-WT-Zelllinie benötigt für eine Verdoppelung 17 h, die WR99210-resistente Zelllinie 3D7-WR 20 h und die Blasticidin S-resistente Zelllinie 3D7-Bsd 22 h. Hingegen entspricht das Wachstum der co-transgenen Zelllinie 3D7-WR/Bsd mit einer Verdoppelungszeit von 17 h dem des WT.

Die Überexpression von *PfPdx1* in der Zelllinie 3D7-*PfPdx1*Strep führt zu einer Verdoppelungszeit der Parasiten von 18 h, was im Rahmen der Verdoppelungszeit sowohl der MOCK- als auch der WT-Zelllinie liegt. Dieses trifft auch auf die *Pdx2*-überexprimierenden Zellen 3D7-*PfPdx2*Strep und 3D7-*PfPdx2*Myc zu, deren Verdoppelungszeiten sich mit 23 h bzw. 24 h ebenfalls im Bereich der zugehörigen MOCK-Zelllinien 3D7-WR (20 h) und 3D7-Bsd (22 h) bewegen.

Wie bereits mit Hilfe von rekombinant hergestellten *Pdx1*- und *Pdx2*-Enzymen verschiedener Organismen gezeigt wurde, interagieren beide Proteine miteinander und bilden einen Enzymkomplex, der aus je zwölf *Pdx1*- und zwölf *Pdx2*-Proteinen besteht (Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006). Mit Hilfe der co-transgenen Zelllinie 3D7-*PfPdx1*Strep/*PfPdx2*Myc konnte diese Interaktion zum ersten Mal in Protozoen *in vivo* nachgewiesen werden, da beide Proteine über den Strep-tag des

episomal überexprimierten *Pf* Pdx1-Proteins mit Hilfe einer Strep-Tactin-Sepharose-Matrix aus Plasmodienextrakt coaufgereinigt werden konnten.

Die gleichzeitige Überexpression von *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 in den Parasiten führte zu einer Verlangsamung des Wachstums um 20% im Vergleich mit 3D7-WT sowie 3D7-WR/Bsd. Da die eingesetzten Selektionsdrogen die Zellen nicht beeinträchtigen, ist dieser Effekt alleine auf die Überexpression der Proteine zurückzuführen.

Bei der Überexpression von *Pf*Pdx1 gemeinsam mit der inaktiven Pdx2-Mutante *Pf* Pdx2E53Y verlangsamte sich das Wachstum der Zellen allerdings um weitere 5% gegenüber der Zelllinie 3D7-*Pf*Pdx1Strep/*Pf*Pdx2Myc, in der sowohl *Pf*Pdx1, als auch *Pf* Pdx2 in aktiver Form überexprimiert werden. Da das episomal überexprimierte, inaktive Protein mit dem nativ vorhandenen aktiven *Pf*Pdx2 bei der Bindung an *Pf*Pdx1 konkurriert, und dadurch die PLP-Biosynthese in den Zellen beeinträchtigt ist, könnte dieses in einem reduzierten Wachstum der Parasiten resultieren. Der beobachtete Effekt könnte durch die alleinige Überexpression von *Pf*Pdx2E53Y verstärkt werden, da hier aktives (natives) und inaktives *Pf*Pdx2 um das native *Pf* Pdx1 konkurrieren und somit weniger aktive PLP-Synthase zur Verfügung steht.

Das Wachstum aller Zelllinien wurde bislang nur unter Standardbedingungen analysiert. Da jedoch unter anderem für Pilze ein Zusammenhang der Vitamin B6-Biosynthese mit oxidativem Stress beschrieben wurde (Ehrenshaft et al., 1998), sollen die plasmodialen Zelllinien in weiteren Analysen unter Bedingungen mit erhöhtem oxidativen Stress untersucht werden.

4.1.9 Regulation der Vitamin B6-Biosynthese als Reaktion auf oxidativen Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachen in der Zelle Schäden an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, wenn sie nicht entgiftet werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Organismen verfügt *P. falciparum* weder über eine Katalase, noch über eine Glutathion-Peroxidase zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (Sztajer

et al., 2001). Jedoch besitzt der Parasit verschiedene enzymatische Stressabwehr-Systeme, wie das Glutathion- und Thioredoxin-System, einschließlich dem plasmodien-spezifischen Enzym Plasmoredoxin, sowie zwei Superoxid-Dismutasen (Müller et al., 2001; Becker et al., 2003a; Dive et al., 2003; Sienkiewicz et al., 2004; Nickel et al., 2006), um sich vor ROS zu schützen. Auch niedermolekulare Antioxidantien wie Glutathion und die Vitamine C und E stehen zur Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies und zur Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts der Zelle zur Verfügung.

Auch für Vitamin B6 wurde ein hohes antioxidatives Potential gezeigt und vor kurzem wurde ein Reaktionsmechanismus für die Entgiftung von Singulett-Sauerstoff durch Pyridoxin beschrieben (Ehrenshaft et al., 1999a; Stocker et al., 2003; Denslow et al., 2007; Matxain et al., 2007). Bereits bei der Erstbeschreibung des Pdx1-Proteins wurde es mit der Resistenzvermittlung gegen oxidativen Stress in Verbindung gebracht, woraufhin es zunächst als SOR1 (Singlet oxygen resistance 1) bezeichnet wurde (Ehrenshaft et al., 1998). Erst später konnte die Beteiligung von SOR1 an der Vitamin B6-Biosynthese nachgewiesen werden (Ehrenshaft et al., 1999a; Osmani et al., 1999), was zur Umbenennung des Enzyms zu Pdx1 führte. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Vitamin B6 und der Entgiftung des in der Atmungskette entstehenden $^1\text{O}_2$ ergab sich zudem aus Versuchen mit isolierten Rattenmitochondrien, die eine schnelle Aufnahme von ^{14}C -Pyridoxalphosphat in den Intermembranraum der Mitochondrien zeigten (Friedrich, 1988).

Der Vitamin B6 *de novo*-Biosynthese könnte demnach bei *P. falciparum* eine duale Funktion bei der Synthese des Cofaktors und der Entgiftung von Singulett-Sauerstoff zukommen. Für den Parasiten stellt die Regulation seiner Vitamin B6-Biosynthese eine Möglichkeit dar, seinen PLP-Bedarf wechselnden äußeren Bedingungen anzupassen. Um zu untersuchen, ob PfPdx1 bei Erhöhung des oxidativen Stresses hochreguliert wird, wurden 3D7-WT-Zellen mit Methylenblau (Wrenger et al., 2005), Cercosporin und Roseoflavin sowie Glucoseoxidase behandelt. Die Inkubation der Zellkultur mit Glucoseoxidase hatte keinen Effekt auf die

Transkriptmenge von *Pf*Pdx1. Northern-Blot-Analysen zeigten jedoch eine erhöhte Menge an *Pf* Pdx1-RNA nach Behandlung der Zellen mit Methylenblau, Cercosporin und Roseoflavin. Methylenblau und Cercosporin sind photoaktive Moleküle, die unter Einwirkung von Licht oder Sauerstoff Singulett-Sauerstoff produzieren (Daub und Hangarter, 1983; van Lier und Spikes, 1989; Daub et al., 2005). Die Hochregulation von *Pf* Pdx1 durch Methylenblau-Stress konnte auch durch Microarray-Analysen bestätigt werden, die eine Erhöhung der Transkriptmenge um den Faktor 1,49 ergab. Dieser Wert scheint zunächst gering, jedoch wurde für Plasmodien in Microarray-Analysen allgemein nur eine geringe Regulation des Transkriptoms als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen gefunden (Fang et al., 2004; Gunasekera et al., 2007; van Brummelen et al., 2009). So führt z. B. die Inhibition des bifunktionellen Polyamin-Biosynthesenzym *Pf* AdoMetDC/ODC lediglich zu einer maximalen Erhöhung der Transkriptmenge der regulierten Proteine um Faktor 3,2 (van Brummelen et al., 2009). Bei einer alleinigen Inhibition der *Pf* ODC durch Behandlung der Parasiten mit DFMO nahmen die Transkriptmengen der hochregulierten Proteine um das 1,5 bis 15-fache zu (Clark et al., 2008), wobei die 15-fache Erhöhung eines Transkripts die Ausnahme ist. Auch bei Behandlung von *Mycobacterium tuberculosis* mit dem Bakterizid Isoniazid zeigt sich nur eine relativ geringe Regulation des Transkriptoms, bei der sich die Erhöhung der Transkriptmenge der meisten regulierten Proteine ebenfalls lediglich maximal um Faktor 3 bewegt. Allerdings kommt es auch hier zur Erhöhung der Transkriptmenge einzelner Gene um das 10-fache (Fu, 2006). Eine weitaus stärkere Reaktion auf die Einwirkung von Stress zeigt *E. coli*. Die Zugabe von Tricarbonyldichlororuthenium(II)-Dimer (CORM 2), einer Kohlenstoffmonoxid-produzierenden Substanz, führt hier zu Faktor 5 bis 80 erhöhten Transkriptmengen einiger Gene. Wie diese Beispiele zeigen, ist die Regulation der Transkription von verschiedenen Faktoren abhängig. Im Falle der Reaktion von *P. falciparum* auf eine erhöhte Menge an Singulett-Sauerstoff ist

demnach eine geringe Regulation des Vitamin B6- Biosyntheseenzym *Pf Pdx1* effizient genug, damit der Parasit auf erhöhte Mengen an $^1\text{O}_2$ reagieren kann.

4.2 Charakterisierung der plasmodialen Paranitrophenylphosphat-Phosphatase

Die Regulation des Gleichgewichts zwischen phosphorylierten und dephosphorylierten Formen von Vitamin B6 spielt im Stoffwechsel aller Organismen eine wichtige Rolle. Dephosphorylierte Vitamin B6-Formen können über die Zellmembran aufgenommen werden und werden anschließend phosphoryliert, um in der Zelle gehalten und gleichzeitig aktiviert zu werden (Friedrich, 1988; Müller et al., 2009). *P. falciparum* kann seinen Bedarf an aktivem Vitamin B6 zum einen über eine PLP-*de novo*-Biosynthese, zum anderen mit Hilfe einer Pyridoxalkinase (*PfPdxK*) decken, die Pyridoxal (PL) zu PLP phosphoryliert (Wrenger et al., 2005; Müller et al., 2009). Zur Identifikation einer Phosphatase, die zur Regulation des Gleichgewichts zwischen aktivem und inaktivem Cofaktor benötigt wird, wurden mit Hilfe der Sequenz der erythrozytären Pyridoxal-phosphat-Phosphatase (Fonda, 1992; Gao und Fonda, 1994) Sequenzanalysen in der *P. falciparum*-Genomdatenbank durchgeführt. Hierbei konnten keine zu einer Pyridoxalphosphat-Phosphatase homologen Enzyme gefunden werden. Jedoch wurde eine Phosphatase mit Homologie zu Paranitrophenylphosphat-Phosphatasen (*PfPNPase*) von *Schizosaccharomyces pombe* (*pho2*) und *Saccaromyces cerevisiae* (*PHO13*) (Attias und Bonnet, 1972; Yang et al., 1991) identifiziert. Das Enzym weist, wie bereits für *S. pombe* beschrieben (Yang et al., 1991), ein pH-Optimum im Bereich von pH 8,0 auf und ist nur in Präsenz von Mg^{2+} aktiv. Außerdem liegt es, wie die Paranitrophenylphosphat-Phosphatase von *S. pombe* (*Sp PNPase*), im nativen Zustand als Dimer vor. Die höchste Aktivität des rekombinanten Enzyms wurde mit dem synthetischen Substrat Paranitrophenylphosphat bestimmt, die mit $9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein etwa 40x höher ist, als die spezifische Aktivität mit

natürlich vorkommenden Substraten wie phosphorylierten Zuckern, Nukleotiden und Cofaktoren. Verglichen mit der spezifischen Aktivität der *Sp* PNPase, die bei $423 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ liegt, ist die Aktivität des plasmodialen Enzyms aber selbst mit Paranitrophenylphosphat noch verhältnismäßig gering, dafür weist die *Pf* PNPase aber ein breiteres Substratspektrum auf, was unter anderem auch PLP einschließt. Die Aktivität des Enzyms liegt mit PLP bei $260 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein und ist damit um Faktor 30 niedriger als die spezifische Aktivität der erythrozytären PLP-Phosphatase (Gao und Fonda, 1994). Diese hat die Aufgabe, die Homöostase zwischen PL und PLP im Erythrozyten aufrecht zu erhalten und erfüllt eine wichtige Funktion beim Transport und der Versorgung des Organismus mit Vitamin B6 (Friedrich, 1988). Diese Aspekte spielen bei *P. falciparum* lediglich eine untergeordnete Rolle, womit für den Parasiten eine unspezifische Phosphatase wie die *Pf*PNPase ausreichend ist, um seinen PLP-Bedarf zu regulieren.

5. Zusammenfassung

Vitamin B6 in seiner aktiven Form, Pyridoxalphosphat (PLP), stellt einen essentiellen Cofaktor für viele Enzyme dar. Der Mensch ist auf die Aufnahme des Vitamins aus der Nahrung angewiesen, wohingegen Pilze, Pflanzen und Bakterien sowie der Malariaparasit *P. falciparum* über eine Vitamin B6 *de novo*-Synthese verfügen. Diese erfolgt bei *P. falciparum* über den DOXP-unabhängigen Biosyntheseweg, bei dem die beiden Enzyme *Pf Pdx1* und *Pf Pdx2* einen Enzymkomplex bilden und den aktiven Cofaktor PLP bilden. Dieser Komplex besteht aus zwölf *Pdx1*-Molekülen, die zwei hexamere Ringe formen, welche zu einer „Doppelkrone“ zusammengefügt sind. An diese binden zwölf *Pdx2*-Moleküle. Zur Analyse der Bildung des *Pf Pdx1-Pf Pdx2*-Komplexes wurden durch Site-directed-mutagenesis-PCR verschiedene Aminosäuren im *Pf Pdx1*-Enzym gegen Alanin ausgetauscht und die Mutanten bezüglich ihrer Aktivität und der Bindungsfähigkeit von *Pf Pdx2* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren R85, H88 und E91 bei der Bindung verschiedener *Pf Pdx1*-Moleküle untereinander von Bedeutung sind, da die Mutanten als Monomere vorlagen und kein *Pf Pdx2* mehr binden konnten. Für die Aminosäuren D26, K83 und K151 konnte eine Beteiligung am aktiven Zentrum gezeigt werden. Ihr Austausch führte zur Inaktivität von *Pf Pdx1*, die Bindung von *Pf Pdx2* wurde jedoch nicht beeinflusst. Der Aminosäure K151 kommt neben der Beteiligung am aktiven Zentrum eine Schlüsselrolle bei der Formation des *Pf Pdx1*-Komplexes zu, da ihr Austausch gegen Alanin zur Destabilisierung des Dodecamers in zwei hexamere Ringe führt. Derselbe Effekt konnte durch Austausch der Aminosäure G155 gegen Alanin erzielt werden. Dies zeigt, dass die Flexibilität dieser Region für die Bildung des *Pf Pdx1*-Dodecamers von entscheidender Bedeutung ist.

Durch diese Mutationsanalysen konnte die Reihenfolge der Zusammenlagerung des Vitamin B6-Biosynthesekomplexes bestimmt werden, bei dem das *Pf Pdx1*-Enzym zunächst hexamere Ringe bildet, an die dann die *Pf Pdx2*-Enzyme binden.

Anschließend lagern sich zwei der *PfPdx2*-dekorierten hexameren *PfPdx1*-Ringe zum endgültigen und aktiven PLP-Synthase-Komplex zusammen.

Zur Untersuchung der Überexpression von *PfPdx1* oder *PfPdx2*, bzw. *PfPdx1* und *PfPdx2 in vivo* wurden Plasmodien mit Überexpressionskonstrukten für beide Proteine transfiziert. Western-Blot-Analysen zeigten im Plasmodienextrakt der transgenen Zelllinien tag-tragende Proteine, die von den Parasiten episomal überexprimiert wurden. Die Überexpression hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten.

Bei Pilzen und Pflanzen wurde gezeigt, dass die Vitamin B6-Biosynthese mit oxidativem Stress in Form von $^1\text{O}_2$ korreliert. Die Transkriptmenge von *PfPdx1* wurde nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Singulett-Sauerstoff-produzierenden Molekülen mittels Northern-Blot und Microarray-Analyse untersucht. Es zeigte sich eine Hochregulation der Vitamin B6-Biosynthese unter erhöhtem Singulett-Sauerstoff-Stress, was eine duale Rolle der Vitamin B6-Biosynthese als Lieferant eines für viele Enzyme essentiellen Cofaktors sowie als Reaktionsmechanismus auf erhöhten oxidativen Stress zeigt.

Um das Gleichgewicht zwischen dem aktiven Cofaktor PLP und inaktiven Vorläufer-Molekülen zu regulieren, benötigt der Parasit ein Enzym, das in der Lage ist, PLP zu dephosphorylieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei *P. falciparum* eine Paranitrophenylphosphat-Phosphatase (*PfPNPase*) identifiziert und mittels GFP-Fusionsproteinen im Cytosol lokalisiert werden. Die *PfPNPase* besitzt ein breites Substratspektrum, das neben diversen anderen phosphorylierten Molekülen auch PLP einschließt. Dem Enzym könnte somit eine wichtige Funktion bei der Regulation des „Pools“ von aktivem und inaktivem Vitamin B6 und anderen Metaboliten des Zellstoffwechsels zukommen.

6. Literatur

Alberts, B., Jaenicke, L., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim: Wiley-VCH.

Attias, J. und Bonnet, J. L. (1972). A specific alkaline p-nitrophenylphosphatase activity from baker's yeast. *Biochim Biophys Acta* 268, 422-430.

Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H. und Rudich, A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 89, 27-71.

Bauer, J. A., Bennett, E. M., Begley, T. P. und Ealick, S. E. (2004). Three-dimensional structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5'-phosphate biosynthesis. *J Biol Chem* 279, 2704-2711.

Becker, K., Kanzok, S. M., Iozef, R., Fischer, M., Schirmer, R. H. und Rahlfs, S. (2003a). Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites. *Eur J Biochem* 270, 1057-1064.

Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C. und Schirmer, R. H. (2003b). Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem* 384, 551-566.

Begley, T. P., Downs, D. M., Ealick, S. E., McLafferty, F. W., Van Loon, A. P., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H. J., Kinsland, C., Reddick, J. J. und Xi, J. (1999). Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* 171, 293-300.

Belli, S. I., Walker, R. A. und Flowers, S. A. (2005). Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status. *Proteomics* 5, 918-924.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. und Stryer, L. (2003). *Biochemie*. Heidelberg ; Berlin [u.a.]: Spektrum Akademischer Verl.

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.

Burns, K. E., Xiang, Y., Kinsland, C. L., McLafferty, F. W. und Begley, T. P. (2005). Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc* 127, 3682-3683.

- Campanale, N., Nickel, C., Daubenberger, C. A., Wehlan, D. A., Gorman, J. J., Klonis, N., Becker, K. und Tilley, L. (2003). Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 278, 27354-27361.
- Chaparian, M. G. und Evans, D. R. (1991). The catalytic mechanism of the amidotransferase domain of the Syrian hamster multifunctional protein CAD. Evidence for a CAD-glutamyl covalent intermediate in the formation of carbamyl phosphate. *J Biol Chem* 266, 3387-3395.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. und Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31, 3497-3500.
- Clark, K., Dhoogra, M., Louw, A. I. und Birkholtz, L. M. (2008). Transcriptional responses of *Plasmodium falciparum* to alpha-difluoromethylornithine-induced polyamine depletion. *Biol Chem* 389, 111-125.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J. und Singh, B. (2008). *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 46, 165-171.
- Crabb, B. S., Rug, M., Gilberger, T. W., Thompson, J. K., Triglia, T., Maier, A. G. und Cowman, A. F. (2004). Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol* 270, 263-276.
- Daub, M. E. und Hangarter, R. P. (1983). Light-Induced Production of Singlet Oxygen and Superoxide by the Fungal Toxin, Cercosporin. *Plant Physiol* 73, 855-857.
- Daub, M. E., Herrero, S. und Chung, K. R. (2005). Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiol Lett* 252, 197-206.
- Deharo, E., Barkan, D., Krugliak, M., Golenser, J. und Ginsburg, H. (2003). Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochem Pharmacol* 66, 809-817.
- Deutsch, K., Driskill, C. und Wellems, T. (2001). Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res* 29, 850-853.

- Denslow, S. A., Rueschhoff, E. E. und Daub, M. E. (2007). Regulation of the *Arabidopsis thaliana* vitamin B6 biosynthesis genes by abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 45, 152-161.
- Di Salvo, M., Yang, E., Zhao, G., Winkler, M. E. und Schirch, V. (1998). Expression, purification, and characterization of recombinant *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Protein Expr Purif* 13, 349-356.
- Dive, D., Gratepanche, S., Yera, H., Becuwe, P., Daher, W., Delplace, P., Odberg-Ferragut, C., Capron, M. und Khalife, J. (2003). Superoxide dismutase in *Plasmodium*: a current survey. *Redox Rep* 8, 265-267.
- Dong, Y. X., Sueda, S., Nikawa, J. und Kondo, H. (2004). Characterization of the products of the genes SNO1 and SNZ1 involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 271, 745-752.
- Drewke, C. und Leistner, E. (2001). Biosynthesis of vitamin B6 and structurally related derivatives. *Vitam Horm* 61, 121-155.
- Egan, T. J. (2002). Discovering antimalarials: a new strategy. *Chem Biol* 9, 852-853.
- Ehrenshaft, M., Jenns, A. E., Chung, K. R. und Daub, M. E. (1998). SOR1, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms. *Mol Cell* 1, 603-609.
- Ehrenshaft, M., Bilski, P., Li, M. Y., Chignell, C. F. und Daub, M. E. (1999a). A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9374-9378.
- Ehrenshaft, M., Chung, K. R., Jenns, A. E. und Daub, M. E. (1999b). Functional characterization of SOR1, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotianae*. *Curr Genet* 34, 478-485.
- Ehrenshaft, M. und Daub, M. E. (2001). Isolation of PDX2, a second novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaeobacteria, and a subset of eubacteria. *J Bacteriol* 183, 3383-3390.
- Eschbach, M. L., Müller, I. B., Gilberger, T. W., Walter, R. D. und Wrenger, C. (2006). The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* expresses an atypical N-terminally extended pyrophosphokinase with specificity for thiamine. *Biol Chem* 387, 1583-1591.

- Fang, J., Sullivan, M. und McCutchan, T. F. (2004). The effects of glucose concentration on the reciprocal regulation of rRNA promoters in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 279, 720-725.
- Fonda, M. L. (1992). Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *J Biol Chem* 267, 15978-15983.
- Friedrich, W. (1988). *Vitamins*, 1. Aufl. edn. Berlin [u.a.]: de Gruyter.
- Fu, L. M. (2006). Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis (Edinb)* 86, 134-143.
- Gao, G. J. und Fonda, M. L. (1994). Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B6 phosphatase from human erythrocytes. *J Biol Chem* 269, 7163-7168.
- 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. und Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.
- Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J. und Krugliak, M. (1998). Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem Pharmacol* 56, 1305-1313.
- Gunasekera, A. M., Myrick, A., Le Roch, K., Winzeler, E. und Wirth, D. F. (2007). *Plasmodium falciparum*: genome wide perturbations in transcript profiles among mixed stage cultures after chloroquine treatment. *Exp Parasitol* 117, 87-92.
- Guzik, T. J., Korbit, R. und Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54, 469-487.
- Harwaldt, P., Rahlfs, S. und Becker, K. (2002). Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. *Biol Chem* 383, 821-830.

- Herrero, S. und Daub, M. E. (2007). Genetic manipulation of Vitamin B-6 biosynthesis in tobacco and fungi uncovers limitations to up-regulation of the pathway. *Plant Science* 172, 609-620.
- Hill, R. E., Himmeldirk, K., Kennedy, I. A., Pauloski, R. M., Sayer, B. G., Wolf, E. und Spenser, I. D. (1996). The biogenetic anatomy of vitamin B6. A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 30426-30435.
- Hohmann, S. und Meacock, P. A. (1998). Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta* 1385, 201-219.
- Jensen, J. B. und Trager, W. (1977). *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol* 63, 883-886.
- Kishida, K. T. und Klann, E. (2007). Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 9, 233-244.
- Knöckel, J., Müller, I. B., Bergmann, B., Walter, R. D. und Wrenger, C. (2007). The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate de novo. *Mol Biochem Parasitol* 152, 108-111.
- Knöckel, J., Bergmann, B., Müller, I. B., Rathaur, S., Walter, R. D. und Wrenger, C. (2008). Filling the gap of intracellular dephosphorylation in the *Plasmodium falciparum* vitamin B1 biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol* 157, 241-243.
- Knöckel, J., Jordanova, R., Müller, I. B., Wrenger, C. und Groves, M. R. (2009). Mobility of the conserved glycine 155 is required for formation of the active plasmodial Pdx1 dodecamer. *Biochim Biophys Acta*.
- Kondo, H., Nakamura, Y., Dong, Y. X., Nikawa, J. und Sueda, S. (2004). Pyridoxine biosynthesis in yeast: participation of ribose 5-phosphate ketol-isomerase. *Biochem J* 379, 65-70.
- Kyes, S., Pinches, R. und Newbold, C. (2000). A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 105, 311-315.
- Lam, H. M., Tancula, E., Dempsey, W. B. und Winkler, M. E. (1992). Suppression of insertions in the complex pdxJ operon of *Escherichia coli* K-12 by lon and other mutations. *J Bacteriol* 174, 1554-1567.

- Lam, H. M. und Winkler, M. E. (1992). Characterization of the complex pdxH-tyrS operon of Escherichia coli K-12 and pleiotropic phenotypes caused by pdxH insertion mutations. *J Bacteriol* 174, 6033-6045.
- Lambros, C. und Vanderberg, J. P. (1979). Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65, 418-420.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lucius, R. (1997). *Parasitologie : Grundlagen für Biologen, Mediziner, Veterinärmediziner*. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.
- Matxain, J. M., Ristila, M., Strid, A. und Eriksson, L. A. (2007). Theoretical study of the reaction of vitamin B6 with 1O2. *Chemistry* 13, 4636-4642.
- Mehlhorn, H. und Piekarski, G. (2002). *Grundriss der Parasitenkunde Parasiten des Menschen und der Nutztiere*. Heidelberg ; Berlin: Spektrum, Akad. Verl.
- Meierjohann, S., Walter, R. D. und Müller, S. (2002). Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant Plasmodium falciparum. *Biochem J* 368, 761-768.
- Müller, I. B., Knöckel, J., Groves, M. R., Jordanova, R., Ealick, S. E., Walter, R. D. und Wrenger, C. (2008). The assembly of the plasmodial PLP synthase complex follows a defined course. *PLoS ONE* 3, e1815.
- Müller, I. B., Wu, F., Bergmann, B., Knöckel, J., Walter, R. D., Gehring, H. und Wrenger, C. (2009). Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite Plasmodium falciparum. *PLoS ONE* 4, e4406.
- Müller, S., Gilberger, T. W., Krnajski, Z., Luersen, K., Meierjohann, S. und Walter, R. D. (2001). Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite Plasmodium falciparum. *Protoplasma* 217, 43-49.
- Nickel, C., Rahlfs, S., Deponate, M., Koncarevic, S. und Becker, K. (2006). Thioredoxin networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Antioxid Redox Signal* 8, 1227-1239.

- Osmani, A. H., May, G. S. und Osmani, S. A. (1999). The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* 274, 23565-23569.
- Pain, A., Bohme, U., Berry, A. E., Mungall, K., Finn, R. D., Jackson, A. P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E. M., Aslett, M. A., Balasubrammaniam, S., Borgwardt, K., Brooks, K., Carret, C., Carver, T. J., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clark, T. G., Galinski, M. R., Hall, N., Harper, D., Harris, D., Hauser, H., Ivens, A., Janssen, C. S., Keane, T., Larke, N., Lapp, S., Marti, M., Moule, S., Meyer, I. M., Ormond, D., Peters, N., Sanders, M., Sanders, S., Sargeant, T. J., Simmonds, M., Smith, F., Squares, R., Thurston, S., Tivey, A. R., Walker, D., White, B., Zuiderwijk, E., Churcher, C., Quail, M. A., Cowman, A. F., Turner, C. M., Rajandream, M. A., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Newbold, C. I., Barrell, B. G. und Berriman, M. (2008). The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 455, 799-803.
- Panton, L. J., McPhie, P., Maloy, W. L., Wellems, T. E., Taylor, D. W. und Howard, R. J. (1989). Purification and partial characterization of an unusual protein of *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II. *Mol Biochem Parasitol* 35, 149-160.
- Papalexis, V., Siomos, M. A., Campanale, N., Guo, X., Kocak, G., Foley, M. und Tilley, L. (2001). Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol* 115, 77-86.
- Percudani, R. und Peracchi, A. (2003). A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep* 4, 850-854.
- Pratico, D. (2008). Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 70-78.
- Provencher, S. W. und Glockner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37.
- Rahlfs, S., Nickel, C., Deponte, M., Schirmer, R. H. und Becker, K. (2003). *Plasmodium falciparum* thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Rep* 8, 246-250.
- Raschle, T., Amrhein, N. und Fitzpatrick, T. B. (2005). On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 280, 32291-32300.

- Rattan, S. I. (2008).** Increased molecular damage and heterogeneity as the basis of aging. *Biol Chem* 389, 267-272.
- Roa, B. B., Connolly, D. M. und Winkler, M. E. (1989).** Overlap between *pdxA* and *ksgA* in the complex *pdxA-ksgA-apaG-apaH* operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 171, 4767-4777.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1989).** *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sibmooh, N., Pipitaporn, B., Wilairatana, P., Dangdounjai, J., Udomsangpetch, R., Looareesuiwan, S. und Chantharaksri, U. (2000).** Effect of artemisinin on lipid peroxidation and fluidity of the erythrocyte membrane in malaria. *Biol Pharm Bull* 23, 1275-1280.
- Sienkiewicz, N., Daher, W., Dive, D., Wrenger, C., Viscogliosi, E., Wintjens, R., Jouin, H., Capron, M., Muller, S. und Khalife, J. (2004).** Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 137, 121-132.
- Slater, A. F. und Cerami, A. (1992).** Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355, 167-169.
- Squier, T. C. (2001).** Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* 36, 1539-1550.
- Sreerama, N. und Woody, R. W. (1993).** A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* 209, 32-44.
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y. und Woody, R. W. (2000).** Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal Biochem* 287, 243-251.
- Stocker, P., Lesgards, J. F., Vidal, N., Chalier, F. und Prost, M. (2003).** ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochim Biophys Acta* 1621, 1-8.
- Strohmeier, M., Raschle, T., Mazurkiewicz, J., Rippe, K., Sinning, I., Fitzpatrick, T. B. und Tews, I. (2006).** Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19284-19289.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. M., Menard, R. und Heussler, V. T. (2006).** Manipulation of

host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287-1290.

Sztajer, H., Gamain, B., Aumann, K. D., Slomianny, C., Becker, K., Brigelius-Flohe, R. und Flohe, L. (2001). The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J Biol Chem* 276, 7397-7403.

Tambasco-Studart, M., Titiz, O., Raschle, T., Forster, G., Amrhein, N. und Fitzpatrick, T. B. (2005). Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 13687-13692.

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

Umlas, J. und Fallon, J. N. (1971). New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stomatolytic solution for lysis. *Am J Trop Med Hyg* 20, 527-529.

van Brummelen, A. C., Olszewski, K. L., Wilinski, D., Llinas, M., Louw, A. I. und Birkholtz, L. M. (2009). Co-inhibition of *Plasmodium falciparum* S-adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase reveals perturbation-specific compensatory mechanisms by transcriptome, proteome, and metabolome analyses. *J Biol Chem* 284, 4635-4646.

van Lier, J. E. und Spikes, J. D. (1989). The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. *Ciba Found Symp* 146, 17-26; discussion 26-32.

van Stokkum, I. H., Spoelder, H. J., Bloemendal, M., van Grondelle, R. und Groen, F. C. (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* 191, 110-118.

Wellems, T. E. und Howard, R. J. (1986). Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 6065-6069.

Wettenhall, J. M. und Smyth, G. K. (2004). limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* 20, 3705-3706.

Wetzel, D. K., Ehrenshaft, M., Denslow, S. A. und Daub, M. E. (2004). Functional complementation between the PDX1 vitamin B6 biosynthetic gene of *Cercospora nicotianae* and *pdxJ* of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 564, 143-146.

- White, N. J. (2008).** Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 46, 172-173.
- Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2004).** DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32, W668-673.
- Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2008).** Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
- Wrenger, C., Eschbach, M. L., Muller, I. B., Warnecke, D. und Walter, R. D. (2005).** Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* 280, 5242-5248.
- Wrenger, C., Knöckel, J., Walter, R. D. und Müller, I. B. (2008).** Vitamin B1 and B6 in the malaria parasite: requisite or dispensable? *Braz J Med Biol Res* 41, 82-88.
- Yang, J. W., Dhamija, S. S. und Schweingruber, M. E. (1991).** Characterisation of the specific p-nitrophenylphosphatase gene and protein of Schizosaccharomyces pombe. *Eur J Biochem* 198, 493-497.
- Yang, Y., Zhao, G., Man, T. K. und Winkler, M. E. (1998).** Involvement of the gapA- and epd (gapB)-encoded dehydrogenases in pyridoxal 5'-phosphate coenzyme biosynthesis in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* 180, 4294-4299.
- Zein, F., Zhang, Y., Kang, Y. N., Burns, K., Begley, T. P. und Ealick, S. E. (2006).** Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from Thermotoga maritima. *Biochemistry* 45, 14609-14620.
- Zhou, C., Huang, Y. und Przedborski, S. (2008).** Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 93-104.
- Zhu, J., Burgner, J. W., Harms, E., Belitsky, B. R. und Smith, J. L. (2005).** A new arrangement of (beta/alpha)₈ barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J Biol Chem* 280, 27914-27923.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Kollegen aus der Abteilung Biochemie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, ganz besonders Herrn Prof. Dr. Rolf D. Walter, der mir die Möglichkeit gegeben hat, hier zu promovieren.

Meinem „Doktor-Papa“, PD Dr. Carsten Wrenger, danke ich für seine nie ausgehende Ideenflut und die vielen interessanten „nach-Feierabend“-Gespräche.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Ingrid B. Müller für viele gute Ratschläge und die Ausdauer bei der Etablierung der Transfektion von Plasmodien, ohne die viele Experimente gar nicht möglich gewesen wären.

Vielen Dank auch an Bärbel Bergmann für die Hilfe im Labor .

Bei Frau Prof. Susanne Dobler, Universität Hamburg, bedanke ich mich herzlich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates meiner Dissertation.

Danke auch an Prof. Dr. Abraham I. Louw und Dr. Lyn-Marie Birkholtz für eine wunderbare Zeit in Pretoria und die Unterstützung bei der Durchführung der Microarray-Experimente.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern Dr. Horst Knöckel und Ulrike Knöckel, danke ich für die große Unterstützung bei allen meinen Vorhaben und das große Vertrauen in mich.

Meinem Freund, Mathias Zinnecker danke ich für seine unendliche Geduld zu warten, bis ich mal wieder Zeit hatte und die Bereitschaft, den Rest der Zeit mit Telefongesprächen zu überbrücken.

Anhang

Publikationen

Short communication

The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate *de novo*[☆]

Julia Knöckel¹, Ingrid B. Müller, Bärbel Bergmann, Rolf D. Walter, Carsten Wrenger*

Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Department of Biochemistry, Bernhard-Nocht-Str. 74, D-20359 Hamburg, Germany

Received 3 November 2006; received in revised form 6 December 2006; accepted 10 December 2006

Available online 20 December 2006

Keywords: Pdx1; Pdx2; Pyridoxine; Pyridoxal phosphate; Drug target; PLP

Apicomplexan parasites cause significant human and animal diseases such as, malaria, coccidiosis and toxoplasmosis. The pathogenic agent of toxoplasmosis is *Toxoplasma gondii*. Approximately 30% of the world's population are suffering of chronic infections caused by this parasite. The disease poses a serious threat especially to immunocompromised people such as HIV-patients as well as to foeti [1]. Focusing on differences between host and parasite metabolism such as vitamin biosynthesis provides an attractive target for the development of new chemotherapeutics without harming the human host.

Vitamin B6 is an essential cofactor for more than 100 vitamin B6 dependent enzymes. The active form of the cofactor is pyridoxal 5' phosphate (PLP), which is involved in catalytic reactions such as amino acid decarboxylation, elimination and amino-transferring [2]. PLP is synthesised *de novo* by plants, almost all bacteria and fungi, whereas mammals do not synthesise vitamin B6 and depend entirely on the uptake of this indispensable nutrient (pyridoxine, pyridoxal or pyridoxamine) from their diet. The non-phosphorylated inactive cofactor is imported by specific transporters [3] and trapped within the cell by phosphorylation carried out by the pyridoxine kinase (PdxK) [4].

Two different pathways are currently known for *de novo* synthesis of PLP, the *Escherichia coli*- and the fungi-like pathway.

The *E. coli* pathway consists of the *pdxA*, *B*, *C*, *F*, *H*, *J* family [5–8]. A distinctly different vitamin B6 synthesis was identified in *Cercospora nicotianae* and in *Saccharomyces cerevisiae* as well as in the plant *Arabidopsis thaliana* and in some bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* or *Bacillus subtilis* [9,10]. In *S. cerevisiae* the highly conserved enzyme family Snz1/2/3-p participates in the biosynthesis of PLP, whereas in *B. subtilis* the YaaD protein and in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Pdx1 are responsible for this synthesis [9–12]. For the formation of the cofactor a second protein belonging to the Sno1/2/3-p family in yeast, which corresponds to YaaE in *B. subtilis* or Pdx2 in *P. falciparum*, has been reported to provide the nitrogen for the pyridoxal ring structure due to its glutamine amidotransferase activity [11,14,15]. Both proteins, Pdx1 and Pdx2, act together in the synthesis of PLP by forming a polymeric complex [13,15,16]. As substrates of the PLP synthesis ribose-5-phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate and glutamine or ammonia have been identified [17,18].

To verify whether the apicomplexan parasite *T. gondii* also possesses a functional pyridoxal phosphate synthesis pathway, TBLASTN search analyses in the genome database of *Toxoplasma* (<http://www.toxodb.org>) have been successfully performed with the protein sequences of Pdx1 and Pdx2 of the plasmodial counterpart. The *Tgpdx1* open reading frame consists of 924 bp corresponding to 307 amino acids with a predicted molecular mass of 33 kDa, which is about the same size of the plasmodial Pdx1 protein. The *Tgpdx1* protein is well conserved among other Pdx1 proteins and shows 57%, 61% and 58% sequence identity to *S. cerevisiae* (AC: Q03148), *B. subtilis* (AC: P37527) and *P. falciparum* (AC: NP_703871), respectively. In the yeast *S. cerevisiae* the Pdx1 homologue Snz1-p belongs to a gene family comprising SNZ1/2/3. Further, BLAST searches within the *T. gondii* genome database did not reveal another Pdx1

Abbreviations: PLP, pyridoxal 5' phosphate; PdxK, pyridoxine kinase; *Tgpdx1*, *T. gondii* Pdx1; *Tgpdx2*, *T. gondii* Pdx2; ODC, ornithine decarboxylase

[☆] The nucleotide sequences reported in this paper have been submitted to the EMBL Nucleotide Sequence database with the accession number: AM400225 (*Tgpdx1*) and AM400226 (*Tgpdx2*).

* Corresponding author. Tel.: +49 40 42818 344; fax: +49 40 42818 418.

E-mail address: wrenger@bni-hamburg.de (C. Wrenger).

¹ A part of this work was conducted in partial fulfilment of the requirement for a Ph.D. from the University of Hamburg.

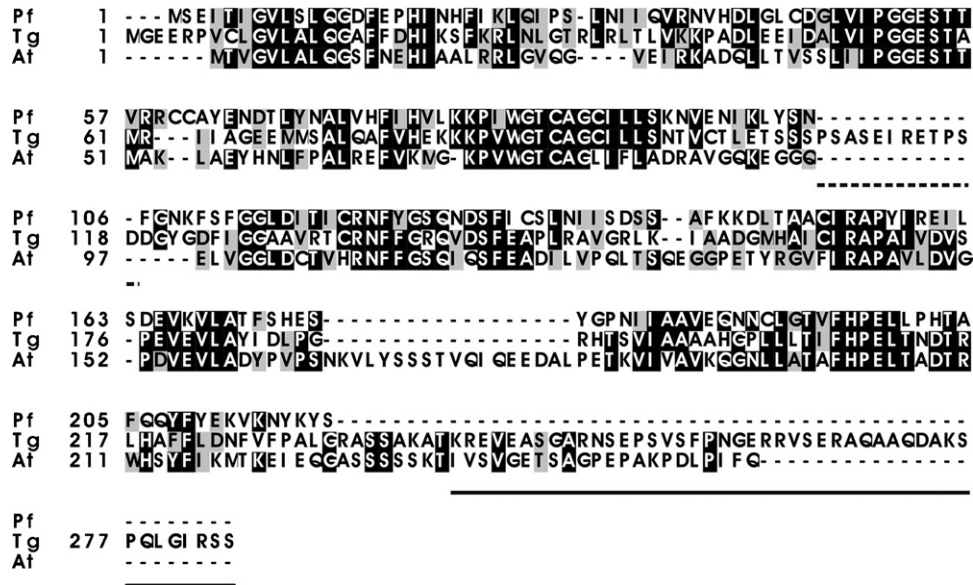


Fig. 1. Amino acid sequence alignment of Pdx2. The alignment of the amino acid sequences of the *Toxoplasma gondii* (Tg), *Arabidopsis thaliana* (At) and *Plasmodium falciparum* (Pf) Pdx2 was performed by using CLUSTAL W. Identical and similar amino acid residues of the sequences are drawn on black and shaded backgrounds, respectively. Gaps (-) were introduced into the sequence to maximize homology and to compensate for the different chain lengths. The proposed spacer of TgPdx2 (---) and the C-terminal 45 amino acids missing in TgPdx2short (—) are indicated.

orthologue suggesting that pdx1 in *T. gondii* appears as a single copy gene as in *Plasmodium* [13].

The open reading frame of *T. gondii* pdx2 consists of 855 bp resulting in a deduced amino acid sequence of 284 amino acids, which is 195 bp longer than Pdx2 of *P. falciparum* [13]. The increased size of the *T. gondii* compared to the plasmodial Pdx2 protein is due to a spacer of 12 amino acid residues inserted at position 107 (Fig. 1). Furthermore, TgPdx2 contains an extended C-terminus of 53 amino acids (Fig. 1). Accordingly, the TgPdx2 protein shares sequence identities of only 28%, 31% and 30% to the Sno1-p/Pdx2 proteins of *S. cerevisiae* (AC: NP013813), *P. falciparum* (AC: AJ871406) and *A. thaliana* (AC: NP568922), respectively. However, TgPdx2 possesses the well conserved motifs GGEST and FHPE as well as the fungal specific motifs WGTCA and GVLALQG [14]. The also well preserved FIRAP motif is substituted by CIRAP as reported from the plasmodial counterpart. Intensive comparison of the *T. gondii* Pdx2 protein with the *Toxoplasma* genome database did not display any other sequence homology, indicating the presence of Pdx2 in *T. gondii* as single copy gene. Further, analysis of the deduced open reading frames of both, *Tgpdx1* and *Tgpdx2*, by using bioinformatics tools (<http://www.expasy.org/tools/#proteome>) did neither identify a potential apicoplast nor a mitochondrial targeting sequence, suggesting a cytosolic localisation of the *Toxoplasma* proteins as has been reported for the plasmodial enzymes [13,19].

In order to analyse whether the TgPdx1 and TgPdx2 proteins are functional a complementation assay of $\Delta sno1/\Delta snz1$ double mutant yeast cells was performed. This *S. cerevisiae* cell line has been shown to be pyridoxine auxotroph and was already successfully employed for functional complementation [13,15]. The open reading frames of *Tgpdx1* and *Tgpdx2* were cloned into the yeast expression vector pYES2/NT C conferring

to His-Tag fusion proteins and subsequently transformed into the $\Delta sno1/\Delta snz1$ deficient yeast strain as shown in Fig. 2A. The empty vector did not support any growth on minimal medium without addition of vitamin B6. In contrast, the transformation of the TgPdx1 and TgPdx2 expression constructs resulted in a successful complementation of the $\Delta sno1/\Delta snz1$ double mutant on minimal medium agar plates (Fig. 2A), which suggests an involvement of TgPdx1 and TgPdx2 in the vitamin B6 *de novo* synthesis. For verification of the expression of the *T. gondii* proteins in the yeast mutant Western blot analysis was performed. The Western blot visualizes signals for the TgPdx1 and TgPdx2 His-Tag fusion proteins of about 38 and 36 kDa, which is in agreement with the expected size (Fig. 2B).

Further, the TgPdx1 and TgPdx2 proteins were recombinantly expressed with a yield of 1.4 and 0.9 mg l⁻¹ bacterial culture, respectively. The purity of the *T. gondii* proteins was assessed by SDS-PAGE analysis and their respective molecular masses including Strep- or His-Tag were 34 and 32 kDa, which matches well with the predicted protein sizes (Fig. 2C). It is known that Pdx1 and Pdx2 in *P. falciparum* act together in enzyme activity [13,19].

The synthesis of vitamin B6 carried out by Pdx1 and Pdx2 is fed by the substrates ribose-5-phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate and ammonia or glutamine [17,18]. The specific activity of the vitamin B6 biosynthesis of the *T. gondii* Pdx1 enzyme was determined to be 811 ± 60 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein when ribose-5-phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate and ammonia were used as substrates. By exchanging the nitrogen source from ammonia to glutamine, the activity obtained for Pdx1 and Pdx2 of *T. gondii* was found to be 96 ± 5 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein, which is about 8 times lower than the activity determined for TgPdx1 in the presence of ammonia as nitrogen source. However the specific activity of

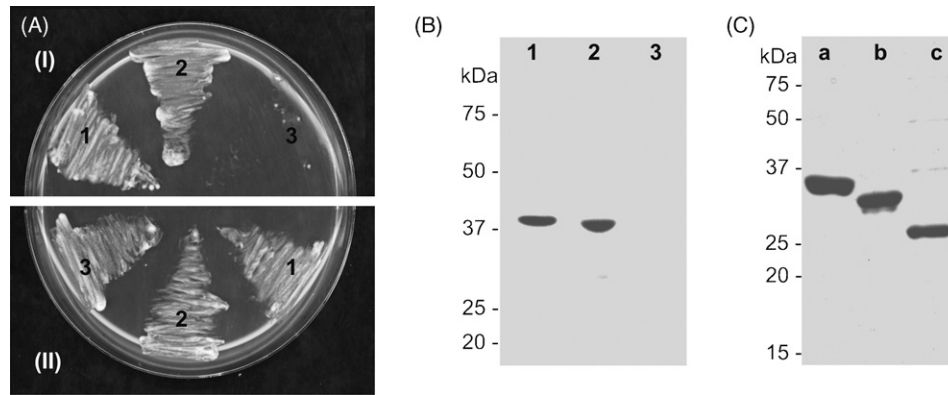


Fig. 2. Complementation of $\Delta snz1/\Delta sno1$ deficient *S. cerevisiae* by *TgPdx1* and *TgPdx2*. The double mutant of *S. cerevisiae* (genotype: BY4741; Mat a; *his3Δ1*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; YMR095c::*kanMX4*; YMR096w::*LEU2*) was generated by SRD (Scientific Research and Development, Germany), which led to a deletion of the genes *SNO1* and *SNZ1* and resulted in vitamin B6 auxotrophy [15]. (A) These yeast cells were transformed with the *TgPdx1*-pYES2 (1) and *TgPdx2*-pYES2 (2) yeast expression constructs. As a control, the empty expression vector pYES2/NT C (Invitrogen, Germany) (3), which was also transformed into the yeast $\Delta sno1/\Delta snz1$ double mutant and maintained without (I) or with pyridoxine (II) at 30 °C for 4 days. (B) Western blot analyses of the recombinant expression of *TgPdx1* (1), *TgPdx2* (2) and the empty expression vector pYES2/NT C (3) in the yeast double mutant were performed with a monoclonal anti-His-HRP antibody (Invitrogen, Germany) as described before [13]. Sizes of the molecular mass standards are shown. (C) a, *TgPdx1*; b, *TgPdx2*; c, *TgPdx2short* from *T. gondii* were recombinantly expressed and the purity analysed by SDS-PAGE according to Refs. [13,25]. Sizes of the molecular mass standards are shown.

TgPdx1 and *TgPdx2* is in the same range as those reported for the vitamin B6 biosynthesis enzymes of *P. falciparum* and *B. subtilis* [18,19].

To investigate whether the internal spacer of 12 amino acid residues influences enzyme activity of the *TgPdx1* and *TgPdx2* complex site directed mutagenesis was employed to remove this spacer by using the sense oligonucleotide (5'-GTCTGTA-CTCTCGAAACGTCTTCTCGGACGGGTACGGAGACTT-CATTGGCGG-3') and the antisense oligonucleotide (5'-CCG-CCAATGAAGTCTCCGTACCCGTCCGAGGAAGACGTTT-CGAGAGTACAGAC-3') as described earlier [20]. The deletion of the spacer region abolishes enzyme activity of the complex (data not shown), suggesting that this insert is indeed involved in the structural formation of *TgPdx2* and thereby engaged in enzyme activity. The Pdx2 protein of *A. thaliana* and *T. gondii* are characterised by their extended C-termini (Fig. 1). Therefore the C-terminal extension of *TgPdx2* was analysed for its participation in vitamin B6 synthesis by eliminating the last 45 amino acid residues (*TgPdx2short*). The specific activity of the enzyme complex *TgPdx1* and *TgPdx2short* was determined to be 67 ± 7 pmol min⁻¹ mg⁻¹, which exhibits an approx. 30% decreased activity to the wild-type proteins, indicating that the C-terminal extension might be involved in the interaction of Pdx1 and Pdx2 to generate vitamin B6 in *T. gondii*. Onward experiments by performing structural analyses are required to identify the function of the C-terminus of *TgPdx2*.

The reaction catalysed by Pdx1 and Pdx2 leads to pyridoxal phosphate (PLP) in *B. subtilis* as well as in *P. falciparum* [17–19]. In order to analyse if pyridoxal or PLP is generated by the Pdx1 protein of *T. gondii* a PLP dependent enzyme was employed. The ornithine decarboxylase (ODC), a key-enzyme of the polyamine metabolism [20], is entirely dependent on PLP for enzyme activity (Table 1). To analyse whether PLP or pyridoxal is synthesised *de novo* aliquots of the *TgPdx1* reaction, carried out with ribose-5-phosphate, glyceraldehyde-

3-phosphate and ammonia as substrates, were applied in the ODC activity assay instead of external PLP. No ODC activity was obtained without PLP addition as well as in the presence of pyridoxal and pyridoxine. In contrast the reaction products of the *T. gondii* enzymes and, as a control, external PLP supply support ODC catalysis, indicating the synthesis of pyridoxal phosphate by the *T. gondii* enzymes. The ODC activity gained by the *TgPdx1* reaction is in the same range of the activity achieved by the *PfPdx1* reaction (Table 1).

S. cerevisiae also expresses the enzymes for the synthesis of vitamin B1, a cofactor for various enzymes mainly involved in carbohydrate metabolism such as pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase and transketolases [21]. This pathway is linked to the vitamin B6 biosynthesis [22]. In addition the apicomplexan parasite *P. falciparum* is able to generate vitamin B1 *de novo*. However, the plasmodial parasite is dependent on external provision of the vitamin B1 precursor 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine [23].

Table 1
Activity assay of the PLP dependent plasmodial ornithine decarboxylase (ODC)

Parameters	Specific activity of <i>Pf</i> ODC (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Without PLP (negative control)	ND
10 μM pyridoxal	ND
10 μM pyridoxine	ND
10 μM PLP (positive control)	9 ± 1
PLP synthesis of <i>TgPdx1</i>	6 ± 1
PLP synthesis of <i>PfPdx1</i>	5 ± 1

To verify the synthesis of PLP an aliquot (150 μl) of the *TgPdx1* reaction with 5 mM ammonium sulfate, 1 mM glyceraldehyde-3-phosphate and 0.5 mM ribose-5-phosphate as substrates was used in the ornithine decarboxylase assay instead of external PLP supplementation as described before [20]. As controls the reaction was performed with and without 10 μM PLP, 10 μM pyridoxal or with the products of the plasmodial Pdx1 reaction [13]. The activity assay was carried out in at least three independent experiments. ND, not detectable.

Therefore, both vitamin biosynthesis pathways are not linked to each other as it has been reported for other organisms [22–24]. Interestingly, extensive BLAST searches within the *T. gondii* genome database (<http://www.toxodb.org>) did not identify any homologous protein to the already known vitamin B1 biosynthesis enzymes of other organisms, suggesting that *T. gondii* is incapable to produce B1 vitamers *de novo*, which is astonishing when compared to its apicomplexan relative *P. falciparum*.

In conclusion, these results clearly demonstrate the presence of a functional vitamin B6 biosynthesis in *T. gondii* consisting of the enzymes Pdx1 and Pdx2, which catalyse the formation of the active cofactor PLP. In further studies by testing specific inhibitors targeting the vitamin B6 biosynthesis pathway we will assess this cofactor synthesis as a novel target for the development of new chemotherapeutics to combat toxoplasmosis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Marie-Luise Eschbach for excellent technical assistance. Further, we would like to thank Timothy Dowse and Dominique Soldati for the provision of *T. gondii* genomic DNA as well as Jim Ajioka for the *T. gondii* cDNA library. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant WA 395/15.

References

- [1] Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect 2002;8:634–40.
- [2] Percudani R, Peracchi A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. EMBO Rep 2003;4:850–4.
- [3] Stolz J, Vielreicher M. Tpn1p, the plasma membrane vitamin B6 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 2003;278:18990–6.
- [4] Kerry JA, Rohde M, Kwok F. Brain pyridoxal kinase. Purification and characterization. Eur J Biochem 1986;158:581–5.
- [5] Roa BB, Connolly M, Winkler ME. Overlap between pdxA and ksgA in the complex pdxA-ksgA-apaG-apaH operon of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 1989;171:4767–77.
- [6] Lam HM, Tancula E, Dempsey WB, Winkler ME. Suppression of insertions in the complex pdxJ operon of *Escherichia coli* K-12 by lon and other mutations. J Bacteriol 1992;174:1554–67.
- [7] Lam HM, Winkler ME. Characterization of the complex pdxH-tyrS operon of *Escherichia coli* K-12 and pleiotropic phenotypes caused by pdxH insertion mutations. J Bacteriol 1992;174:6033–45.
- [8] Hill RE, Himmeldirk K, Kennedy IA, et al. The biogenetic anatomy of vitamin B6. A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. J Biol Chem 1996;271:30426–35.
- [9] Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME. A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:9374–8.
- [10] Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N, Fitzpatrick TB. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:13687–92.
- [11] Bauer JA, Bennett EM, Begley TP, Ealick SE. Three-dimensional structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5'-phosphate biosynthesis. J Biol Chem 2004;279:2704–11.
- [12] Belitsky BR. Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for *de novo* pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. J Bacteriol 2004;186:1191–6.
- [13] Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Warnecke D, Walter RD. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem 2005;280:5242–8.
- [14] Ehrenshaft M, Daub ME. Isolation of PDX2, a second novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaeobacteria, and a subset of eubacteria. J Bacteriol 2001;183:3383–90.
- [15] Dong YX, Sueda S, Nikawa J, Kondo H. Characterization of the products of the genes *SNO1* and *SNZ1* involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem 2004;271:745–52.
- [16] Zhu J, Burgner JW, Harms E, Belitsky BR, Smith JL. A new arrangement of (beta/alpha)₈ barrels in the synthase subunit of PLP synthase. J Biol Chem 2005;280:27914–23.
- [17] Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW, Begley TP. Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. J Am Chem Soc 2005;127:3682–3.
- [18] Raschle T, Amrhein N, Fitzpatrick TB. On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. J Biol Chem 2005;280:32291–300.
- [19] Gengenbacher M, Fitzpatrick TB, Raschle T, et al. Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. J Biol Chem 2006;281:3633–41.
- [20] Wrenger C, Lüersen K, Krause T, Müller S, Walter RD. The *Plasmodium falciparum* bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosyl-L-methionine decarboxylase, enables a well balanced polyamine synthesis without domain-domain interaction. J Biol Chem 2001;276:29651–6.
- [21] Pohl M, Sprenger GA, Müller M. A new perspective on thiamine catalysis. Curr Opin Biotechnol 2004;15:335–42.
- [22] Hohmann S, Meacock PA. Thiamin metabolism and thiamine diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. Biochim Biophys Acta 1998;1385:201–19.
- [23] Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Laun NP, Begley TP, Walter RD. Vitamin B1 *de novo* synthesis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* depends on external provision of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine. Biol Chem 2006;387:41–51.
- [24] Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms. J Biol Chem 2002;277:48949–59.
- [25] Haider N, Eschbach ML, Dias Sde S, Gilberger TW, Walter RD, Lüersen K. The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme. Mol Biochem Parasitol 2005;142:224–36.

Short communication

Filling the gap of intracellular dephosphorylation in the *Plasmodium falciparum* vitamin B1 biosynthesis[☆]

Julia Knöckel^{a,1}, Bärbel Bergmann^a, Ingrid B. Müller^a, Sushma Rathaur^b,
Rolf D. Walter^a, Carsten Wrenger^{a,*}

^a Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Department of Biochemistry, Bernhard Nocht Strasse 74, D-20359 Hamburg, Germany

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Banaras Hindu University, Varanasi 221005, UP, India

Received 26 September 2007; received in revised form 19 October 2007; accepted 25 October 2007

Available online 1 November 2007

Abstract

Thiamine pyrophosphate (TPP), the active form of vitamin B1, is an essential cofactor for several enzymes. Humans depend exclusively on the uptake of vitamin B1, whereas bacteria, plants, fungi and the malaria parasite *Plasmodium falciparum* are able to synthesise thiamine monophosphate (TMP) *de novo*. TMP has to be dephosphorylated prior to pyrophosphorylation in order to obtain TPP. In *P. falciparum* the phosphatase capable to catalyse this reaction has been identified by analysis of the substrate specificity. The recombinant enzyme accepts beside vitamin B1 also nucleotides, phosphorylated sugars and the B6 vitamers pyridoxal 5'-phosphate. Vitamin B1 biosynthesis is known to occur in the cytosol. The cytosolic localisation of this phosphatase was verified by transfection of a GFP chimera construct. Stage specific Northern blot analysis of the phosphatase clearly identified an expression profile throughout the entire erythrocytic life cycle of *P. falciparum* and thereby emphasises the importance of dephosphorylation reactions within the malaria parasite.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phosphatase; Malaria; Transfection; Nutrient; Thiamine; Vitamin B1

Malaria is a devastating and quite often a deadly parasitic disease, resulting in important public health problems in the tropics reflected by 300–500 millions infected people annually of which approx. 2 millions are killed [1]. The infectious disease is caused by the protozoan *Plasmodium*, an intracellular parasite growing in human hepatocytes and erythrocytes. The deadliest agent is *Plasmodium falciparum*. Recently it has been demonstrated that the malaria parasite exhibits the genes for the *de novo* synthesis of vitamin B1 and B6 [2–5]. Although, *P. falciparum* possesses the ability to generate these vitamins *de novo*, the parasite is still

dependent on the uptake of vitamin B1 or at least on its precursor 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethyl pyrimidine (HMP) [4–6].

Vitamin B1 is an essential cofactor for several enzymes of the carbohydrate metabolism such as transketolase, pyruvate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase and 2-oxoglutarate dehydrogenase [7]. The active B1 cofactor is thiamine pyrophosphate (TPP). Bacteria, plants and fungi as well as *P. falciparum* are capable of synthesising vitamin B1 *de novo* from the precursors 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethyl pyrimidine diphosphate (HMP-PP) and 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole phosphate (THZ-P), whereas humans and other mammals are unable to synthesise vitamin B1 and are completely dependent on the uptake of the essential nutrient from their diet [8]. The two precursors are converted by the thiamine phosphate synthase (ThiE) to thiamine monophosphate (TMP) [9,10]. Most bacteria are directly phosphorylating the *de novo* synthesised TMP to obtain the active cofactor TPP, which is catalysed by the well-conserved thiamine monophosphate kinase [8]. However, plants, fungi and *P. falciparum* are diphosphorylating thiamine to TPP. This reaction is carried out by the thiamine pyrophosphokinase (TPK) [11]. Extensive

Abbreviations: TMP, thiamine monophosphate; TPP, thiamine pyrophosphate; HMP, 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethyl pyrimidine; PLP, pyridoxal-5-phosphate; P_fPNPase, *P. falciparum* paranitrophenyl phosphate phosphatase; GFP, green fluorescent protein.

[☆] **Note:** The nucleotide sequence of the plasmodial PNPase has been submitted to the EMBL Nucleotide Sequence database with the accession number: AM500856.

* Corresponding author. Tel.: +49 40 42818 344; fax: +49 40 42818 418.

E-mail address: wrenger@bni-hamburg.de (C. Wrenger).

¹ Part of this work was conducted in partial fulfilment of the requirement for a PhD from the University of Hamburg.

BLAST searches within the plasmodial genome database [12] did not identify any homology to a thiamine monophosphate kinase implying that *P. falciparum* is only able to create TPP via the *Pf*TPK [5]. However, the *de novo* synthesised TMP has to be dephosphorylated to thiamine prior to pyrophosphorylation by the TPK, since the plasmodial TPK reveals strict substrate specificity to thiamine and does not accept TMP [5]. To fill this gap of TMP dephosphorylation within the plasmodial vitamin B1 biosynthesis we focussed on potential phosphatases in the genome database of *P. falciparum* by performing TBLASTN searches (<http://www.plasmodb.org>) [12]. Thereby a potential paranitrophenyl phosphate phosphatase (PNPase) was identified. The open reading frame of the *Pf*PNPase resides on chromosome 7 and comprises 969 bp leading to a protein of 322 amino acid residues with a calculated molecular mass of 36.8 kDa. CLUSTAL W sequence comparison reveals identities of 26%, 34%, 29%, 28%, 38% and 29% of the plasmodial protein to its homologues from *Saccharomyces cerevisiae* (AC: X51611), *Dictyostelium discoideum* (AC: XM_633284), *Candida albicans* (AC: XM_708997), *Aspergillus clavatus* (AC: XM_001270851), *Arabidopsis thaliana* (AC: AK118640) and *Pichia stipitis* (AC: XM_001382517), respectively. Furthermore the motifs GKQXIFVXNNSTKSR and VGDLNTD, well conserved in PHO13 and *pho2* from *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, are also present with slight modification as GKKXYFIXNNSTKSR and IGDRLETD in the plasmodial counterpart, *Pf*PNPase, at the respective positions 75–89 and 270–277 [13].

In order to characterise and verify the functionality of the predicted plasmodial enzyme recombinant expression was performed. The entire open reading frame of the *Pf*PNPase was amplified from total *P. falciparum* RNA using the reverse transcription technology with the sense oligonucleotide (5′-

GCGCGCGGTCTCGAATGGCTTTAATTTATTCGAGTG-3′) and the antisense oligonucleotide (5′-GCGCGCGGTCTCAGCGCTTAATAATTCCGATATGGATTTC-3′). The obtained PCR product was subsequently cloned into the expression vector pASK-IBA3 (Institut für Bioanalytik, Germany), which allows purification of the derived protein via a C-terminal Strep-tag by affinity chromatography [14]. The purity of the recombinant *Pf*PNPase was assessed by SDS-PAGE analysis which also indicated a molecular mass of about 38 kDa (Fig. 1A). The plasmodial enzyme reveals strict metal dependency for Mg^{2+} ions and displays a pH optimum between pH 7.5 and 8 whereas no activity was observed below pH 5.5 or above 10 (data not shown). Several potential substrates such as ATP, ADP, AMP, CTP, pyridoxal-5-phosphate (PLP), thiamine pyrophosphate (TPP), thiamine monophosphate (TMP), paranitrophenyl phosphate and the sugars glucose-6-phosphate (G-6-P) and fructose-6-phosphate (F-6-P) were employed in the activity test at a final substrate concentration of 1 mM. Consistent with the predicted function of the plasmodial enzyme paranitrophenyl phosphate turned out to be the best substrate revealing a specific activity of $9 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. However, as the former is not a naturally occurring substrate, attention was focused on phosphorylated nutrients like nucleotides, sugars and vitamins. The obtained specific activities for these substrates were about 40-fold reduced compared to paranitrophenyl phosphate and are approx. the same for ATP, ADP and TPP (Fig. 1B). Compared to ATP a slight reduction of activity was observed for CTP, PLP, F-6-P, G-6-P, AMP and TMP and calculated to be 95%, 93%, 91%, 83%, 64% and 79%, respectively (Fig. 1B).

Phosphatases are known to occur in variant oligomeric states, therefore the plasmodial PNPase was subjected to gel filtration using a calibrated Superdex S-200 column [15]. The protein elutes as a single peak corresponding to a molecu-

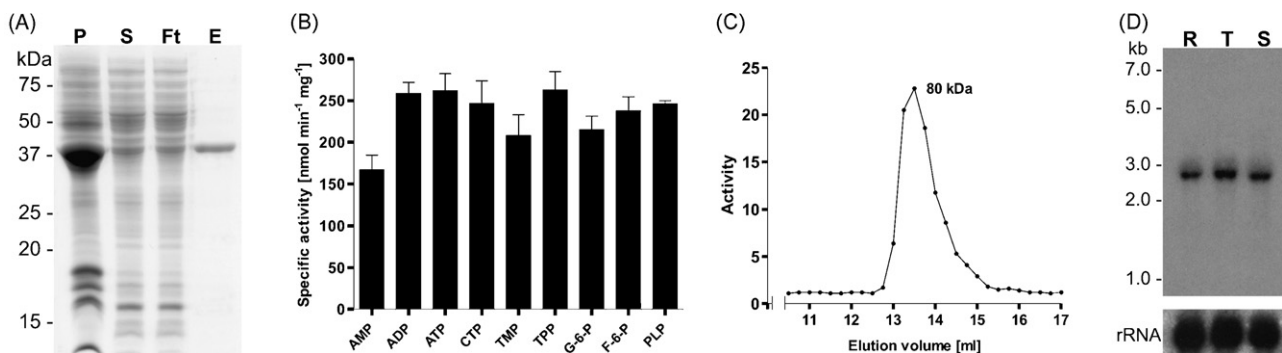


Fig. 1. (A) SDS-PAGE analysis of the *Pf*PNPase. *P. falciparum* PNPase was expressed in BLR (DE3) and subsequently purified via affinity chromatography according to [4,15]. Purity of the recombinant protein was assessed by SDS-PAGE. P, bacterial pellet; S, bacterial supernatant prior to loading to Strep-Tactin-Sepharose; Ft, flow through of the bacterial supernatant after loading to Strep-Tactin-Sepharose; E, elution fraction after purification. Sizes of the molecular mass standards are shown on the left. (B) Activity profile of the *Pf*PNPase. The substrate specificity was analysed by performing a spectrophotometric assay according to [16] with minor modification. Briefly, the reaction was carried out at 37 °C in a total volume of 100 μl using a buffer containing 150 mM MOPS, pH 7.5, 1.25 mM $MgCl_2$ and the respective substrate at a concentration of 1 mM as indicated. The reaction was stopped by 50 μl of 25 mM ammonium molybdate in 4.5 M H_2SO_4 . After 10 min incubation at room temperature 100 μl of 0.5 μM malachite green in 0.1% (w/v) poly(vinyl alcohol) (PVA) was added and subsequently the absorption was detected at a wavelength of 620 nm. The presented results are the means of at least four independent experiments. (C) Oligomeric state of *P. falciparum* PNPase. The recombinant enzyme was separated on a Superdex S-200 gel sizing column using a 100 mM Tris-HCl, pH 8 buffer containing 100 mM NaCl according to [15]. The enzyme activity of the indicated fractions (●) was determined using 1 mM paranitrophenyl phosphate as substrate. (D) Expression pattern of the *pnpase* within the developmental stages of *P. falciparum*. Stage specific Northern blot analyses were performed by hybridisation with radio-labelled *pnpase* probe according to [17]. The blot was stripped and re-probed with the loading control (18S rRNA). R, ring stage; T, trophozoite stage; S, schizont stage. Transcription sizes are shown on the left.

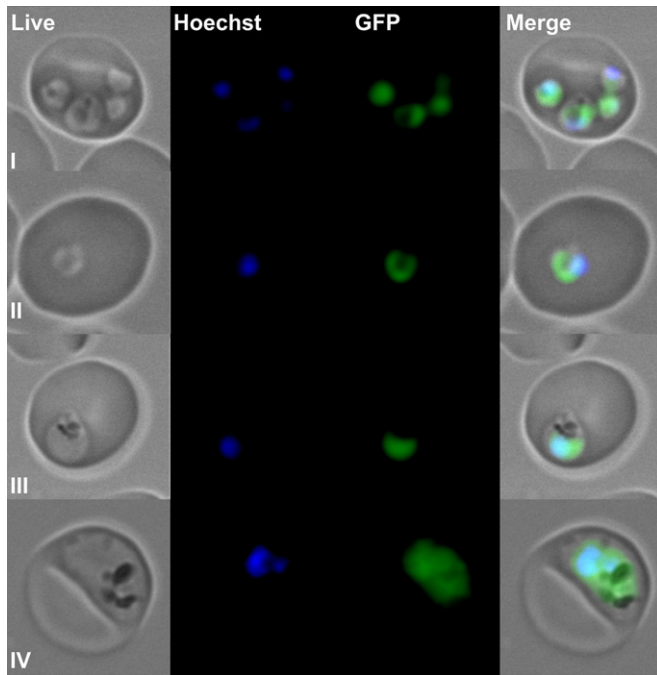


Fig. 2. Localisation of the PNPase in *P. falciparum*. The open reading frame of the plasmodial PNPase was cloned in front of the GFP gene of the expression vector pARL1a⁻ [18] and subsequently transfected into *P. falciparum* according to [19]. Developmental blood stages of the parasites were analysed by fluorescent light microscopy using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss, Germany). (I) Ring stage (multiple infection); (II) ring stage (single infection); (III) young trophozoite; (IV) old trophozoite. Live, *P. falciparum* live image; Hoechst, staining of the parasite's nucleus; GFP, image taken using the GFP channel; Merge, merge of all images.

lar mass of approx. 80 kDa suggesting a dimeric conformation of the *Pf*PNPase (Fig. 1C). Additionally, the expression pattern of the PNPase was analysed by Northern blotting. The stage specific RNA blot revealed constant signals in the ring- (12 ± 4 h), trophozoite- (26 ± 4 h) and schizont-stage (40 ± 4 h) for a *pnfase* specific probe with transcription size of approx. 2.6 kb (Fig. 1D), indicating the concurrent expression of the plasmodial PNPase throughout the erythrocytic life cycle of the parasite. Since the enzymes responsible for the vitamin B1 biosynthesis are located within the cytosol of the parasite as well as the resulting biosynthesis product TMP, the respective phosphatase is expected to be at the same locus [4,5]. In order to address the localisation of the plasmodial PNPase a green fluorescent protein (GFP) chimeric construct was generated which contains the entire open reading frame of the PNPase attached to GFP. The obtained fluorescent staining evidently proves the cytosolic appearance of the *Pf*PNPase (Fig. 2).

In summary the – so far – only characterised cytosolic phosphatase in *P. falciparum* exhibits a broad substrate acceptance at physiological pH. Besides its putative function in nucleotide and sugar metabolism the plasmodial enzyme dephosphorylates the cofactors PLP, TPP as well as the vitamin B1 precursor TMP, which could fill the gap between the vitamin B1 biosynthesis and its salvage for the creation of the “thiamine-pool” [4,5], and unveils thereby how the parasite maintains the crucial vitamin B1 homeostasis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Marie-Luise Eschbach for excellent technical assistance and Ms. Mareike Stahl for helping in cloning the transfection construct. Professor Sushma Rathaur is an Alexander von Humboldt Fellow. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant WA 395/15.

References

- [1] Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64: 1–11.
- [2] Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, et al. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2004;279:51749–59.
- [3] Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Warnecke D, Walter RD. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2005;280:5242–8.
- [4] Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Laun NP, Begley TP, Walter RD. Vitamin B1 *de novo* synthesis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* depends on external provision of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine. *Biol Chem* 2006;387:41–51.
- [5] Eschbach ML, Müller IB, Gilberger TW, Walter RD, Wrenger C. The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* expresses an atypical N-terminally extended pyrophosphokinase with specificity for thiamine. *Biol Chem* 2006;387:1583–91.
- [6] Kirk K, Saliba KJ. Targeting nutrient uptake mechanisms in Plasmodium. *Curr Drug Targets* 2007;8:75–88.
- [7] Pohl M, Sprenger GA, Müller M. A new perspective on thiamine catalysis. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:335–42.
- [8] Begley TP, Downs DM, Ealick SE, et al. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* 1998;171:293–300.
- [9] Peapus DH, Chiu HJ, Campobasso N, Reddick JJ, Begley TP, Ealick SE. Structural characterization of the enzyme-substrate, enzyme-intermediate, and enzyme-product complexes of thiamin phosphate synthase. *Biochemistry* 2001;40:10103–14.
- [10] Morett E, Korbel JO, Rajan E, et al. Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis. *Nat Biotechnol* 2003;21:790–5.
- [11] Friedrich W. Vitamins. Berlin, NY: Walter de Gruyter; 1988.
- [12] Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002;419:498–511.
- [13] Yang JW, Dhamija SS, Schweingruber ME. Characterisation of the specific *p*-nitrophenylphosphatase gene and protein of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem* 1991;198:493–7.
- [14] Knöckel J, Müller IB, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate *de novo*. *Mol Biochem Parasitol* 2007;152:108–11.
- [15] Müller IB, Walter RD, Wrenger C. Structural metal dependency of the arginase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem* 2005;386:117–26.
- [16] Motomizu S, Wakimoto T, Toei K. Spectrophotometric determination of phosphate in river waters with molybdate and malachite green. *Analyst* 1983;108:361–7.
- [17] Kyes S, Pinches R, Newbold C. A simple RNA analysis method shows *var* and *rif* multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2000;105:311–5.
- [18] Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, et al. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol* 2004;270: 263–76.
- [19] Wrenger C, Müller S. The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* has distinct organelle-specific lipoylation pathways. *Mol Microbiol* 2004;53:103–13.

Vitamin B1 and B6 in the malaria parasite: requisite or dispensable?

C. Wrenger, J. Knöckel, R.D. Walter and I.B. Müller

Department of Biochemistry, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany

Correspondence to: C. Wrenger, Department of Biochemistry, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard Nocht Strasse 74, D-20359 Hamburg, Germany
Fax: +49-40-4281-8418. E-mail: wrenger@bni-hamburg.de

Vitamins are essential compounds mainly involved in acting as enzyme co-factors or in response to oxidative stress. In the last two years it became apparent that apicomplexan parasites are able to generate B vitamins such as vitamin B1 and B6 *de novo*. The biosynthesis pathways responsible for vitamin generation are considered as drug targets, since both provide a high degree of selectivity due to their absence in the human host. This report updates the current knowledge about vitamin B1 and B6 biosynthesis in malaria and other apicomplexan parasites. Owing to the urgent need for novel antimalarials, the significance of the biosynthesis and salvage of these vitamins is critically discussed in terms of parasite survival and their exploitation for drug development.

Key words: Malaria; Apicomplexa; Pyridoxal phosphate synthase; Vitamin B6; Vitamin B1

Presented at the XXXVI Annual Meeting of the Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Salvador, BA, Brazil, May 21-25, 2007.

Research supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant WA 395/15.

Received September 18, 2007. Accepted December 6, 2007

Introduction

Apicomplexan parasites have a significant impact on human and livestock health, and chemotherapy remains a problem. The most important apicomplexan parasite is *Plasmodium*, the pathogenic agent of malaria. Malaria is a devastating and quite often a deadly parasitic disease which causes important public health problems in the tropics. However, coccidiosis caused by *Cryptosporidia* and *Toxoplasma* infections also pose a serious threat especially to immunocompromised people such as HIV patients all over the world and first infection with *Toxoplasma* during pregnancy can lead to developmental damage to the fetus.

Due to the high mutational rate of *Plasmodium falciparum* and its resulting rapid adaptation to environmental changes, drug resistance to the standard medication with chloroquine and antifolates is increasing. Therefore, continuous discovery of novel drug targets and development

of new chemotherapeutic agents are inevitable. It has been claimed that antiparasitic compounds should preferably be created to target only the parasite without harming the human host. In this respect, the biosynthesis of parasite-specific vitamin B1 and B6 represents an ideal drug target.

Alternative pathways of vitamin B6 biosynthesis

Two different pathways for the synthesis of vitamin B6 are currently known. While 4-phosphohydroxy-L-threonine and 1-deoxyxylulose 5'-phosphate (DOXP) are substrates in the *Escherichia coli* (DOXP-dependent) pathway (1,2), vitamin B6 is synthesized from ribose 5'-phosphate, glyceraldehyde 3'-phosphate and glutamine in a DOXP-independent or fungus-like pathway (3-8). The DOXP-independent pathway has been identified in fungi, plants and some bacteria and was originally considered to be in-

involved in the detoxification of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) (3,9). However, the analysis of fungal mutants deficient in singlet oxygen resistance (SOR1), and therefore sensitive to singlet oxygen, demonstrated that the product of this gene also participates in pyridoxine biosynthesis (3,4,9). The SOR1 enzyme (also named Pdx1) belongs to the highly conserved enzyme family SNZ in *Saccharomyces cerevisiae*. The SNZ1 protein has been shown to interact with the SNO1 protein (5), also named Pdx2, which is a member of another preserved family in yeast consisting of three SNO enzymes (10). The involvement of Pdx2 in *de novo* vitamin B6 synthesis was confirmed by complementation assays of mutants deficient in pyridoxine biosynthesis (11). This pathway for vitamin B6 biosynthesis has been demonstrated in various other organisms such as *Bacillus subtilis* and *Arabidopsis thaliana* (6,9,12-14). In contrast to the *E. coli*-like formation of vitamin B6 leading to pyridoxine 5'-phosphate, the synthesis of the latter pathway results directly in pyridoxal phosphate (PLP), the active form of vitamin B6.

A few years ago Cassera et al. (15), using labeling experiments, suggested the presence of a vitamin B6 metabolite in *P. falciparum* which we later reported to be produced via the DOXP-independent pathway (16) (Figure 1). Moreover, we demonstrated a homologous pathway in the other apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*, where PLP synthesis also is a product of the single copy genes Pdx1 and Pdx2 (17). The two proteins need to act together for enzyme activity, similar to the homologous yeast proteins SNZ1 and SNO1 (6). The functionality of the two proteins of the apicomplexan parasites was verified by complementation of vitamin B6-deficient yeast strains (16). As is the case for yeast, in apicomplexa vitamin B6 is

directly synthesized in its active form PLP (7,8,17,18). The Pdx1 protein is responsible for the creation of PLP by utilizing pentose, triose as well as ammonia. The ammonia is provided by the Pdx2 protein, which possesses glutaminase activity. Interestingly, the activity of Pdx1 is not dependent on the presence of Pdx2 if glutamine is replaced by ammonia, whereas the activity of Pdx2 relies on its interaction with Pdx1 (16,17).

The crystal structures of the *B. subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus* Pdx1 and Pdx2 homologues have already been solved (19,20). The structures of the entire Pdx1/Pdx2 complex from *B. subtilis* and *Thermotoga maritima* have been analyzed only recently, with the identification of PLP synthase as a multimeric protein complex consisting of 12 Pdx1 proteins decorated by 12 Pdx2 proteins (21,22). These data suggest a channel between the individual Pdx1 and Pdx2 proteins for the transfer of the ammonia produced from Pdx2 towards the active site of Pdx1. Amino acid residues involved in the enzyme activity of Pdx1 proteins (21,23) are also present in the Pdx1 enzymes of the apicomplexan parasites *P. falciparum* and *T. gondii*. Interestingly, analyses of the genome data available for *Eimeria* or *Cryptosporidia* and for other protozoan parasites such as *Trypanosoma* and *Leishmania* did not reveal any indices for genes involved in *de novo* vitamin B6 synthesis. This clearly indicates that PLP biosynthesis is not a general event in protozoan parasites. Parasites which are dependent on external sources of vitamin B6 need to take up this nutrient like the human host. After import, B6 vitamers are immediately phosphorylated and thereby trapped within the cell. This catalysis is carried out by pyridoxine kinase (PdxK) (24-27). In addition to performing *de novo* synthesis, the malaria parasite also holds

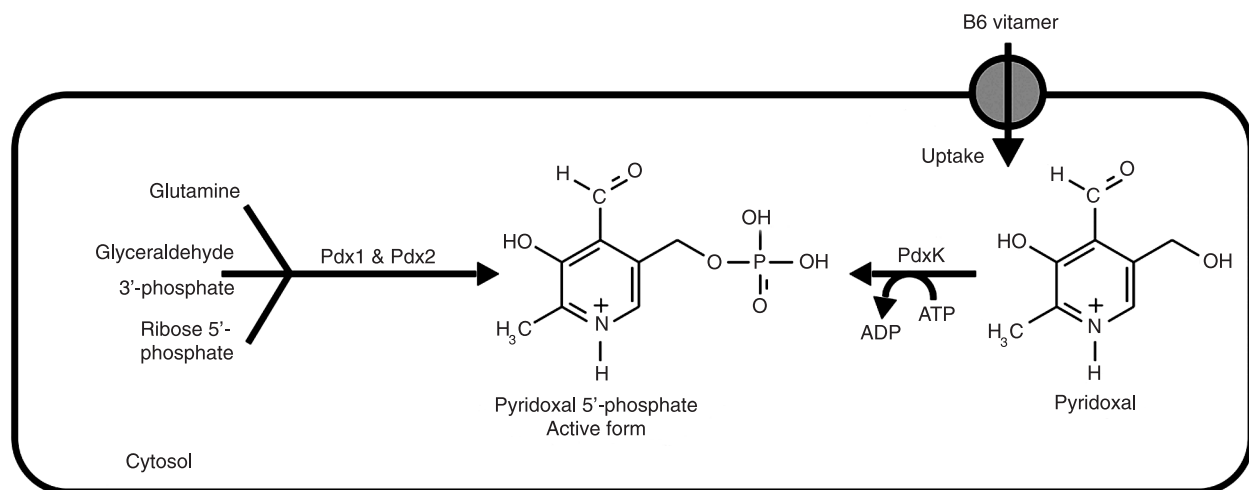


Figure 1. Vitamin B6 biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. For explanation of the abbreviations see text.

a PdxK which enables *P. falciparum* to salvage B6 vitamers (16) (Figure 1). However, the value of the dual PLP provision in *Plasmodium* is not known and needs to be further analyzed.

Suitability of vitamin B6 biosynthesis for chemotherapy

The question arises whether vitamin B6 metabolism can be exploited to develop novel antimalarials. In general, there are two options to interfere with the biosynthesis of plasmodial vitamin B6. i) Since the crystal structure of PLP synthase was solved for *T. maritima* and *B. subtilis*, the design of inhibitors targeting this enzyme complex in order to block biosynthesis was facilitated (21,22). Nevertheless, rational drug design will benefit from structural analyses of the plasmodial PLP synthase crystal to detect parasite-specific targets. ii) On the other hand, emphasis should also be placed on unphosphorylated B6 vitamers, which after uptake are phosphorylated by PdxK and trapped within the parasite (16). Derivatives of these vitamers offer the strategy of channeling inactive co-factors into the depot of PLP, thereby poisoning PLP-dependent enzymes. Both strategies have a high potential for the design of novel drugs in order to interfere with the parasite's vitamin B6 metabolism.

Vitamin B1 and its biosynthesis

Until recently only prokaryotes, fungi and plants were reported to synthesize vitamin B1. Mammals entirely depend on the salvage of vitamin B1 from their diet. The active form of vitamin B1 is thiamine pyrophosphate (TPP) which is a co-factor for various enzymes mainly involved in carbohydrate metabolism such as 2-oxoglutarate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase or transketolase (28,29). The biosynthesis of thiamine occurs by the combination of two different branches. The pyrimidine branch provides 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (HMP), which has to be phosphorylated to HMP diphosphate (HMP-PP) in two consecutive steps by HMP/HMP-P kinase (ThiD; Figure 2) (30-33). In bacteria HMP itself is formed from precursors of the purine biosynthesis by the HMP synthesis enzyme ThiC (34), whereas in yeast the Thi5 protein is suggested to link pyridoxine 5'-phosphate and histidine to form HMP-P (35-37). The product of the other branch is 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole phosphate (THZ-P), which can also be provided by the salvage of THZ upon phosphorylation by THZ kinase (ThiM) (38,39). Subsequently, the respective phosphorylated pyrimidine and thiazole moieties, HMP-PP and THZ-P, are amalgam-

ated by thiamine phosphate synthase (ThiE) to form thiamine phosphate (TMP) (40). An additional phosphorylation step by TMP kinase (ThiL) would be necessary for this to become the active diphosphorylated form (32). However, in yeast as well as in some bacteria ThiL is absent. Therefore, it has been suggested that TMP is first dephosphorylated by a phosphatase before it is pyrophosphorylated by thiamine pyrophosphokinase (TPK) (41,42). The malaria parasite contains the genes encoding for the vitamin B1 synthesis enzymes ThiM, ThiD, and ThiE and their expression and functionality was confirmed (33,43) (Figure 2). Consistent with the situation in other organisms, an open-reading frame encoding for ThiL is not found in the plasmodial genome database.

Creation of a "thiamine pool" in *plasmodium falciparum*

Instead of ThiL, a gene with homology to TPK has been identified (43,44) and analyzed for its kinetic parameters (45) (Figure 2). The plasmodial TPK does not accept the *de novo* synthesized TMP as substrate, which means that TMP must first be dephosphorylated to thiamine before it is pyrophosphorylated to TPP by PftPK (45). The dephosphorylation of TMP is thought to be carried out by a non-specific phosphatase (46). Recently, such a phosphatase was characterized and its substrate specificity for PLP and TMP shown (Knöckel J, Müller IB, Walter RD, Wrenger C, unpublished data).

Pyrophosphorylation of thiamine to TPP takes place solely in the cytosol of the parasite, as demonstrated by immunofluorescence assays of PftPK (45). However, TPP-dependent enzymes are located not only in the cytosol but also in different compartments, a fact that raises the question of TPP transport in these plasmodial organelles (Figure 2). For instance, the TPP-dependent pyruvate dehydrogenase complex is targeted to the apicoplast, whereas the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex has been reported to be mitochondrial (47,48). Assuming that thiamine is pyrophosphorylated exclusively in the cytosol, *P. falciparum* must hold specific transporters to fulfill the need for TPP of both organelle-specific dehydrogenase complexes. The relocation of TPP into the yeast mitochondrion by a specific transporter has been reported (49).

Does plasmodial vitamin B1 biosynthesis serve as a target for chemotherapy?

Promising attempts to exploit vitamin B1 biosynthesis for chemotherapy have been made in bacteria by using the naturally occurring HMP analogue bacimethrin (MeO-HMP)

or the synthetic CF₃-HMP compound (50,51). Although the former compound was successfully tested as a substrate for the plasmodial ThiD protein, bacimethrin did not affect the proliferation rate of the parasite, a fact that could be explained by an inefficient salvage of this analogue (33). Nevertheless, HMP derivatives as such should be considered as promising drug candidates against the malaria parasite, as already shown for bacteria (33,51).

Culturing *P. falciparum* in thiamine-free medium for a few days showed no adverse effect on parasite growth behavior (52); however, extending the period of culture in vitamin B1-deficient medium to ten days revealed a significant need for the externally supplied thiamine precursor HMP or thiamine itself for growth (33). The necessity of HMP in the medium clearly indicates that the parasite is

able to create thiamine but depends on added HMP. Consistent with these results a homologue of the yeast-like Thi5 enzyme was not found in the plasmodial genome database, indicating the absence of a linkage of the vitamin B6 and B1 biosynthesis pathways (36,53-55). Furthermore, there is no plasmodial homologue coding for the bacterial ThiC protein, the enzyme that catalyzes the formation of HMP from aminoimidazole ribonucleotide, an intermediate of purine synthesis (32). The latter is not surprising since purine biosynthesis is absent in the malaria parasite (56). Considering that *Plasmodium* can either salvage HMP - as mentioned above - or thiamine for the formation of TPP offers novel chemotherapeutic strategies to import pro-drugs in the form of HMP or thiamine derivatives. Indeed, pyriothiamine and thiochrome, both

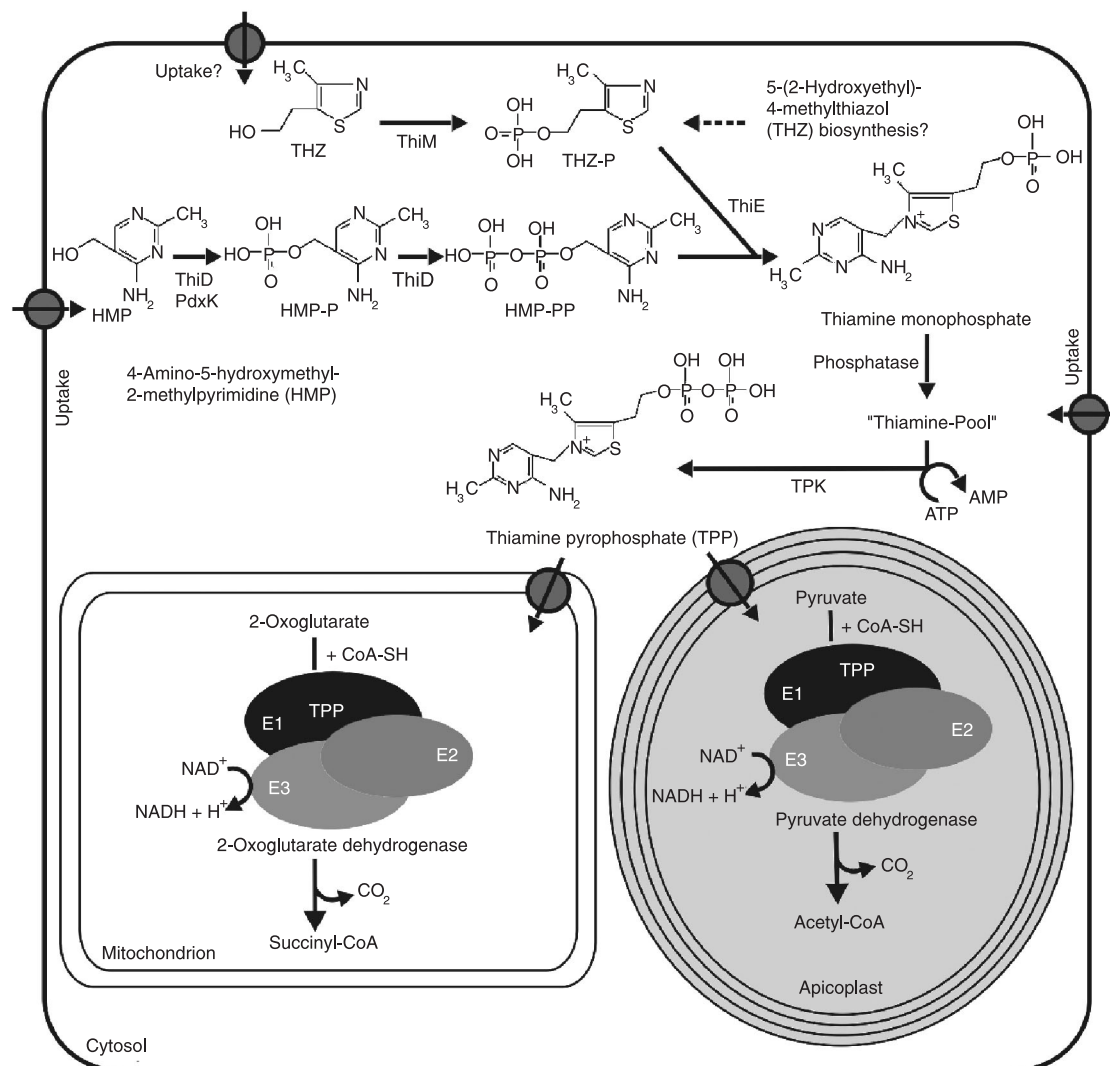


Figure 2. Generation of thiamine pyrophosphate and its trafficking within *Plasmodium falciparum*. Transport mechanisms are indicated by Φ . For explanation of the abbreviations see text.

thiamine derivatives, were tested as substrates for plasmodial TPK. While pyriothiamine is accepted equivalently to thiamine as substrate, thiochrome is not phosphorylated by PFTPK (45). However, testing pyriothiamine on cultured parasites did not reveal any anti-proliferative effect even at a concentration of 0.5 mM, implying an insufficient uptake of this analogue by the parasite or poor targeting of vitamin B1-dependent enzymes by its pyrophosphorylated form (Müller IB, Walter RD, Wrenger C, unpublished data).

Interestingly, cultivation of the parasite in THZ-deficient medium led to normal growth, suggesting that *P. falciparum* might be able to generate THZ *de novo*. Despite the use of bioinformatic tools, genes coding for THZ biosynthesis enzymes could not be identified in the plasmodial genome database (57). The synthesis of either the pyrimidine or the thiazole moiety was discussed for various other organisms, requiring the other part to be salvaged (28,58,59). This might be also the case for the malaria parasite; however, we cannot exclude a THZ biosynthesis pathway different from the prokaryotic pathway in *P. falciparum*.

Does vitamin B1 biosynthesis occur in other apicomplexan parasites?

Enzymes involved in vitamin B1 synthesis as shown for

P. falciparum are apparently absent in the genome of the apicomplexan relatives *E. tenella* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/), and *T. gondii* (<http://www.toxodb.org/toxo/home.jsp>) (17). This major difference poses questions about evolutionary adaptation of these parasites to their hosts. Assuming that the ancestor of apicomplexa had the potential to synthesize vitamin B1 *de novo* or at least to salvage the THZ- and HMP-moieties, apicomplexan parasites like *T. gondii* have lost their ability to synthesize vitamin B1 *de novo* during evolution. Therefore, these parasites entirely depend on thiamine uptake to satisfy their needs, a fact that might be explained by their perfect accommodation to their host cells. The malaria parasite, however, still expresses a rudimentary set of vitamin B1 synthesis enzymes pointing out an insufficient vitamin B1 supply from its host. This distinct adaptation of apicomplexan parasites may result from life cycle and host cell specificity. Further analyses are required to solve the riddle concerning *de novo* co-factor synthesis, uptake and salvage.

In summary, vitamins B1 and B6 are essential co-factors and their biosyntheses offer a powerful potential as drug targets, since these pathways are absent in the human host. Ongoing studies on the structures of the enzymes involved in vitamin B1 and B6 synthesis will allow the design of specific inhibitors blocking these crucial pathways and thereby impairing parasite growth.

References

1. Roa BB, Connolly DM, Winkler ME. Overlap between *pdxA* and *ksgA* in the complex *pdxA-ksgA-apaG-apaH* operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1989; 171: 4767-4777.
2. Lam HM, Tancula E, Dempsey WB, Winkler ME. Suppression of insertions in the complex *pdxJ* operon of *Escherichia coli* K-12 by *lon* and other mutations. *J Bacteriol* 1992; 174: 1554-1567.
3. Ehrenshaft M, Jenks AE, Chung KR, Daub ME. *SOR1*, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora fungi*, is highly conserved in divergent organisms. *Mol Cell* 1998; 1: 603-609.
4. Osmani AH, May GS, Osmani SA. The extremely conserved *pyroA* gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* 1999; 274: 23565-23569.
5. Padilla PA, Fuge EK, Crawford ME, Errett A, Werner-Washburne M. The highly conserved, coregulated *SNO* and *SNZ* gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation. *J Bacteriol* 1998; 180: 5718-5726.
6. Dong YX, Sueda S, Nikawa J, Kondo H. Characterization of the products of the genes *SNO1* and *SNZ1* involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 2004; 271: 745-752.
7. Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW, Begley TP. Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 3682-3683.
8. Raschle T, Amrhein N, Fitzpatrick TB. On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 2005; 280: 32291-32300.
9. Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME. A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9374-9378.
10. Rodriguez-Navarro S, Llorente B, Rodriguez-Manzanique MT, Ramne A, Uber G, Marchesan D, et al. Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6. *Yeast* 2002; 19: 1261-1276.
11. Ehrenshaft M, Daub ME. Isolation of *PDX2*, a second novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaeobacteria, and a subset of eubacteria. *J Bacteriol* 2001; 183: 3383-3390.
12. Mittenhuber G. Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3: 1-20.

13. Belitsky BR. Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for *de novo* pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J Bacteriol* 2004; 186: 1191-1196.
14. Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N, Fitzpatrick TB. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13687-13692.
15. Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, Merino EF, del Portillo HA, Peres VJ, et al. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2004; 279: 51749-51759.
16. Wrenger C, Eschbach ML, Muller IB, Warnecke D, Walter RD. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2005; 280: 5242-5248.
17. Knockel J, Muller IB, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate *de novo*. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 152: 108-111.
18. Gengenbacher M, Fitzpatrick TB, Raschle T, Flicker K, Sinning I, Muller S, et al. Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem* 2006; 281: 3633-3641.
19. Bauer JA, Bennett EM, Begley TP, Ealick SE. Three-dimensional structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5'-phosphate biosynthesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 2704-2711.
20. Zhu J, Burgner JW, Harms E, Belitsky BR, Smith JL. A new arrangement of (beta/alpha)₈ barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J Biol Chem* 2005; 280: 27914-27923.
21. Zein F, Zhang Y, Kang YN, Burns K, Begley TP, Ealick SE. Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 2006; 45: 14609-14620.
22. Strohmeier M, Raschle T, Mazurkiewicz J, Rippe K, Sinning I, Fitzpatrick TB, et al. Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 19284-19289.
23. Raschle T, Arigoni D, Brunisholz R, Rechsteiner H, Amrhein N, Fitzpatrick TB. Reaction mechanism of pyridoxal 5'-phosphate synthase. Detection of an enzyme-bound chromophoric intermediate. *J Biol Chem* 2007; 282: 6098-6105.
24. Kerry JA, Rohde M, Kwok F. Brain pyridoxal kinase. Purification and characterization. *Eur J Biochem* 1986; 158: 581-585.
25. Yang Y, Zhao G, Winkler ME. Identification of the pdxK gene that encodes pyridoxine (vitamin B6) kinase in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 141: 89-95.
26. Scott TC, Phillips MA. Characterization of *Trypanosoma brucei* pyridoxal kinase: purification, gene isolation and expression in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88: 1-11.
27. Park JH, Burns K, Kinsland C, Begley TP. Characterization of two kinases involved in thiamine pyrophosphate and pyridoxal phosphate biosynthesis in *Bacillus subtilis*: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine kinase and pyridoxal kinase. *J Bacteriol* 2004; 186: 1571-1573.
28. Friedrich W. *Vitamins*. Berlin: Walter de Gruyter; 1988.
29. Pohl M, Sprenger GA, Muller M. A new perspective on thiamine catalysis. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 335-342.
30. Mizote T, Tsuda M, Smith DD, Nakayama H, Nakazawa T. Cloning and characterization of the thiD/J gene of *Escherichia coli* encoding a thiamin-synthesizing bifunctional enzyme, hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase. *Microbiology* 1999; 145 (Part 2): 495-501.
31. Reddick JJ, Kinsland C, Nicewonger R, Christian T, Downs DM, Winkler ME, et al. Overexpression, purification and characterization of two pyrimidine kinases involved in the biosynthesis of thiamine: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine kinase and 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate kinase. *Tetrahedron* 1998; 54: 15983-15991.
32. Begley TP, Downs DM, Ealick SE, McLafferty FW, Van Loon AP, Taylor S, et al. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* 1999; 171: 293-300.
33. Wrenger C, Eschbach ML, Muller IB, Laun NP, Begley TP, Walter RD. Vitamin B1 *de novo* synthesis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* depends on external provision of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine. *Biol Chem* 2006; 387: 41-51.
34. Zhang Y, Taylor SV, Chiu HJ, Begley TP. Characterization of the *Bacillus subtilis* thiC operon involved in thiamine biosynthesis. *J Bacteriol* 1997; 179: 3030-3035.
35. Hohmann S, Meacock PA. Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1385: 201-219.
36. Wightman R, Meacock PA. The THI5 gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. *Microbiology* 2003; 149: 1447-1460.
37. Morett E, Korb J, Rajan E, Saab-Rincon G, Olvera L, Olvera M, et al. Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 790-795.
38. Mizote T, Nakayama H. The thiM locus and its relation to phosphorylation of hydroxyethylthiazole in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1989; 171: 3228-3232.
39. Settembre EC, Dorrestein PC, Zhai H, Chatterjee A, McLafferty FW, Begley TP, et al. Thiamin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: structure of the thiazole synthase/sulfur carrier protein complex. *Biochemistry* 2004; 43: 11647-11657.
40. Peapus DH, Chiu HJ, Campobasso N, Reddick JJ, Begley TP, Ealick SE. Structural characterization of the enzyme-substrate, enzyme-intermediate, and enzyme-product complexes of thiamin phosphate synthase. *Biochemistry* 2001; 40: 10103-10114.
41. Nosaka K, Kaneko Y, Nishimura H, Iwashima A. Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, THI80, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; 268: 17440-17447.
42. Baker LJ, Dorocke JA, Harris RA, Timm DE. The crystal structure of yeast thiamin pyrophosphokinase. *Structure* 2001; 9: 539-546.
43. Bozdech Z, Ginsburg H. Data mining of the transcriptome of *Plasmodium falciparum*: the pentose phosphate pathway and ancillary processes. *Malar J* 2005; 4: 17.
44. Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, et al. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 203-216.

45. Eschbach ML, Muller IB, Gilberger TW, Walter RD, Wrenger C. The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* expresses an atypical N-terminally extended pyrophosphokinase with specificity for thiamine. *Biol Chem* 2006; 387: 1583-1591.
46. Muller S, Kappes B. Vitamin and cofactor biosynthesis pathways in *Plasmodium* and other apicomplexan parasites. *Trends Parasitol* 2007; 23: 112-121.
47. Foth BJ, Stimmler LM, Handman E, Crabb BS, Hodder AN, McFadden GI. The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast. *Mol Microbiol* 2005; 55: 39-53.
48. McMillan PJ, Stimmler LM, Foth BJ, McFadden GI, Muller S. The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses two distinct dihydrolipoamide dehydrogenases. *Mol Microbiol* 2005; 55: 27-38.
49. Marobbio CM, Voza A, Harding M, Bisaccia F, Palmieri F, Walker JE. Identification and reconstitution of the yeast mitochondrial transporter for thiamine pyrophosphate. *EMBO J* 2002; 21: 5653-5661.
50. Zilles JL, Croal LR, Downs DM. Action of the thiamine antagonist bacimethrin on thiamine biosynthesis. *J Bacteriol* 2000; 182: 5606-5610.
51. Lawhorn BG, Gerdes SY, Begley TP. A genetic screen for the identification of thiamin metabolic genes. *J Biol Chem* 2004; 279: 43555-43559.
52. Divo AA, Geary TG, Davis NL, Jensen JB. Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *J Protozool* 1985; 32: 59-64.
53. Tazuya K, Adachi Y, Masuda K, Yamada K, Kumaoka H. Origin of the nitrogen atom of pyridoxine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1244: 113-116.
54. Zeidler J, Ullah N, Gupta RN, Pauloski RM, Sayer BG, Spenser ID. 2'-Hydroxypyridoxol, a biosynthetic precursor of vitamins B(6) and B(1) in yeast. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 4542-4543.
55. Zeidler J, Sayer BG, Spenser ID. Biosynthesis of vitamin B1 in yeast. Derivation of the pyrimidine unit from pyridoxine and histidine. Intermediacy of urocanic acid. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 13094-13105.
56. Sherman IW. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). *Microbiol Rev* 1979; 43: 453-495.
57. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; 419: 498-511.
58. Schopfer WH. *Plants and vitamins*. Waltham: Chronica Botanica Company; 1949.
59. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277: 48949-48959.

The Assembly of the Plasmodial PLP Synthase Complex Follows a Defined Course

Ingrid B. Müller¹*, Julia Knöckel¹*, Matthew R. Groves², Rositsa Jordanova², Steven E. Ealick³, Rolf D. Walter¹, Carsten Wrenger^{1*}

1 Department of Biochemistry, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany, **2** European Molecular Biology Laboratory-Hamburg Outstation, Hamburg, Germany, **3** Department of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, New York, United States of America

Abstract

Background: Plants, fungi, bacteria and the apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum* are able to synthesize vitamin B6 *de novo*, whereas mammals depend upon the uptake of this essential nutrient from their diet. The active form of vitamin B6 is pyridoxal 5-phosphate (PLP). For its synthesis two enzymes, Pdx1 and Pdx2, act together, forming a multimeric complex consisting of 12 Pdx1 and 12 Pdx2 protomers.

Methodology/Principal Findings: Here we report amino acid residues responsible for stabilization of the structural and enzymatic integrity of the plasmodial PLP synthase, identified by using distinct mutational analysis and biochemical approaches. Residues R85, H88 and E91 (RHE) are located at the Pdx1:Pdx1 interface and play an important role in Pdx1 complex assembly. Mutation of these residues to alanine impedes both Pdx1 activity and Pdx2 binding. Furthermore, changing D26, K83 and K151 (DKK), amino acids from the active site of Pdx1, to alanine obstructs not only enzyme activity but also formation of the complex. In contrast to the monomeric appearance of the RHE mutant, alteration of the DKK residues results in a hexameric assembly, and does not affect Pdx2 binding or its activity. While the modelled position of K151 is distal to the Pdx1:Pdx1 interface, it affects the assembly of hexameric Pdx1 into a functional dodecamer, which is crucial for PLP synthesis.

Conclusions/Significance: Taken together, our data suggest that the assembly of a functional Pdx1:Pdx2 complex follows a defined pathway and that inhibition of this assembly results in an inactive holoenzyme.

Citation: Müller IB, Knöckel J, Groves MR, Jordanova R, Ealick SE, et al. (2008) The Assembly of the Plasmodial PLP Synthase Complex Follows a Defined Course. PLoS ONE 3(3): e1815. doi:10.1371/journal.pone.0001815

Editor: Haiwei Song, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore

Received: November 15, 2007; **Accepted:** February 14, 2008; **Published:** March 19, 2008

Copyright: © 2008 Müller et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant WA 395/15.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: wrenger@bni-hamburg.de

✉ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The active form of vitamin B6 is pyridoxal 5-phosphate (PLP), which is an essential cofactor for more than 100 enzymes and thereby involved in catalytic reactions such as amino acid decarboxylation, elimination and amino-transfer [1]. PLP is synthesized *de novo* by plants, almost all bacteria and fungi; however, mammals depend entirely on the uptake of this indispensable nutrient from their diet. As shown for yeast, the non-phosphorylated inactive cofactor is imported via specific transporters and finally trapped within the cell by phosphorylation catalyzed by pyridoxal kinase (PdxK) [2,3]. Thus, the dual provision of PLP by *de novo* synthesis and salvage indicates necessity and importance of this cofactor for the survival of yeast and other organisms.

Currently two different pathways for the biosynthesis of PLP are known. The *E. coli*- (DOXP-dependent) creates from the substrates 4-phosphohydroxy-L-threonine, 1-deoxyxylulose 5-phosphate (DOXP) and glutamate pyridoxine. In contrast the fungi-like- (DOXP-independent) pathway, which has been firstly described in the fungus *Cercospora nicotianae*, synthesises the active cofactor PLP from ribose 5-phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate and gluta-

mine by an enzyme complex consisting of two proteins - Pdx1 and Pdx2 [4–11]. The Pdx2 protein exhibits glutaminase activity and delivers ammonia to Pdx1 [5,6] (Fig. 1). The crystal structures of Pdx1 (YaaD or PdxS), and Pdx2 (YaaE or PdxT) from various organisms have been analyzed [12–14]. Only recently the structures of the B6 biosynthesis complex (PLP synthase) from *T. maritima* and *B. subtilis* have been solved. Pdx1 assembles into a dodecamer, consisting of two hexameric crowns, each decorated by six Pdx2 molecules [15,16].

Here we report on biochemical analyses of the interaction of the plasmodial Pdx1:Pdx1 interfaces as well as about effects on Pdx2 binding and catalysis. In contrast to the static nature of the Pdx1 crystal structures, this study allows functional insights into the behaviour of the highly dynamic plasmodial complex and suggests a possible path for its assembly. The amino acids that are crucial for the plasmodial PLP complex should be further exploited for the design of specific drugs which will be restricted to the malaria parasite and not harming the human host.

Malaria is one of the most serious infectious diseases in the world (WHO, Communicable Disease Report). Antimalarial drugs are losing more and more efficacy against the deadliest agent,

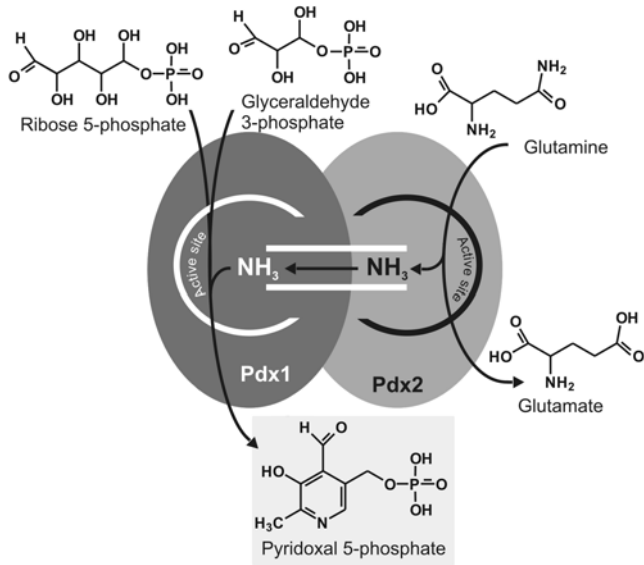


Figure 1. Reaction scheme of the Pdx1 and Pdx2 proteins. The *PfPdx2* enzyme depends on its interaction with *PfPdx1* for glutaminase activity. The Pdx1 enzyme is responsible for the *de novo* synthesis of PLP by utilizing the substrates ribose 5-phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate and ammonia, whereas the latter is provided by deamination of glutamine by Pdx2 via substrate channelling to the attached *PfPdx1* protein. The reactions of each enzyme are indicated. doi:10.1371/journal.pone.0001815.g001

Plasmodium falciparum. Since a vaccine is not available, an urgent need exists to identify novel targets for the development of new chemotherapeutics [17].

Results

Specific activity and mutagenic analyses of the active sites of Pdx1 and Pdx2

The specific activity of the plasmodial vitamin B6 biosynthesis complex consisting of *PfPdx1* and *PfPdx2* (1:1 ratio) was determined to be 662 ± 54 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein if ribose 5-phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate and glutamine were used

as substrates. This is about seven-fold higher than the specific activity previously observed for the plasmodial enzymes by Gengenbacher *et al.* [14] and might result from a different expression system and purification methods. In the presence of ammonium chloride instead of glutamine, the plasmodial Pdx1 protein alone revealed a specific activity of 746 ± 76 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein. Because of the observed similar activity, analyses on the amino acid residues from the *PfPdx1* active site as well as for the Pdx1:Pdx1 interface were carried out by the latter enzyme assay without *PfPdx2*.

Structural analysis of Pdx1 (PdxS) from *Geobacillus stearothermophilus* suggested a participation of residues D24, K81 and K149 in the binding of ribulose 5-phosphate or catalysis [13]. Subsequently the amino acids K149 from *B. subtilis* and K82 in the PLP synthase subunit (YaaD) from *Thermatoga maritima*, respectively, were observed to be covalently attached to ribulose 5-phosphate [7,15]. The homologues of these residues in Pdx1 of the plasmodial enzyme are D26, K83 and K151, respectively (Fig. 2A). These amino acid residues were substituted by alanine using site directed mutagenesis and the mutant proteins were analysed for enzymatic activity (Fig. 3). The *PfPdx1* DKK (D26A/K83A/K151A) triple mutant enzyme as well as each individual mutant were inactive. The results confirmed that residues D26, K83 and K151 are important for *PfPdx1* activity; however, a glutaminase assay with the *PfPdx2* wild-type enzyme and the respective *PfPdx1* showed that the ability of Pdx2 to hydrolyze glutamine was not affected with activities in the same range as previously reported for the wild-type enzymes [6] (Table 1). This indicates that the *PfPdx1* DKK mutant still binds to *PfPdx2*. To verify the ability of the *PfPdx1* DKK mutant to bind to the C-terminal 6× HIS-Tag harbouring *PfPdx2*HIS wild-type protein, co-purification analyses were performed (Fig. 4A). The results clearly demonstrate that modification of these active site residues of *PfPdx1* does not affect its ability to interact with *PfPdx2*.

K151 is crucial for the dodecameric conformation of the plasmodial Pdx1

The molecular mass of the wild-type *PfPdx1* dodecamer is 424 ± 12 kDa, as determined by static light scattering (SLS) (Fig. 5). These data indicate that the wild-type *PfPdx1* assembles into a dodecameric structure (double crown formation), as has been

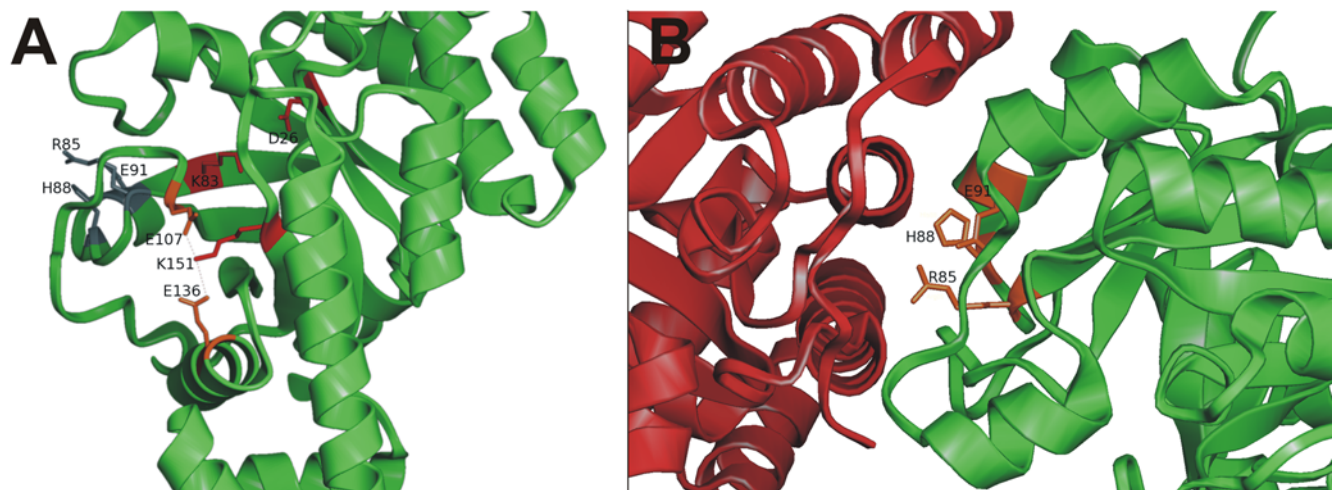


Figure 2. (A) Homology model of one plasmodial Pdx1 monomer showing the analyzed amino acid residues as indicated. (B) The interface region between two *PfPdx1* proteins within the same hexameric ring illustrating the amino acid residues R85, H88 and E91, which are involved in Pdx1:Pdx1 binding. The model was generated by Swiss-Model [30] and visualised by PyMOL (www.pymol.org). doi:10.1371/journal.pone.0001815.g002

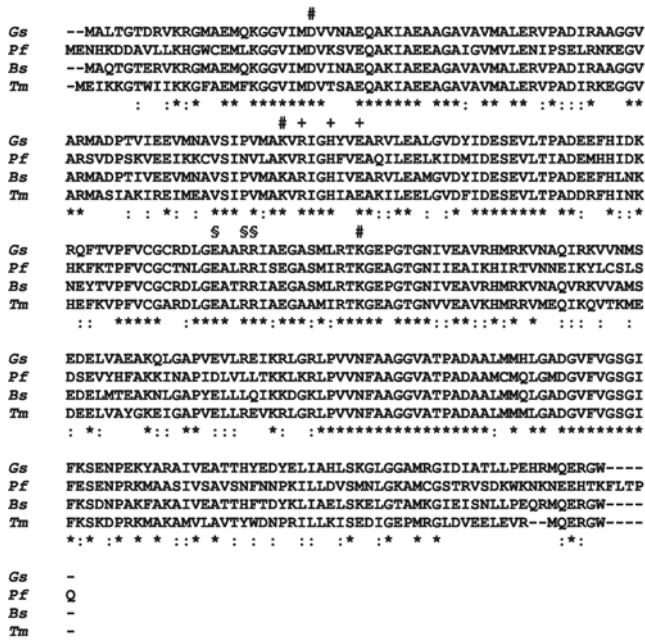


Figure 3. Alignment of the deduced amino acid sequences of the YaaD protein from *Thermotoga maritima* (Tm, AC: Q9WYU4), the Pdx1 protein from *Bacillus subtilis* (Bs, AC: NP_387892), the PdxS protein from *Geobacillus stearothermophilus* (Gs, AC: Q5L3Y2) with the Pdx1 protein from *P. falciparum* (Pf, AC: XP_966196). The alignment was performed by using CLUSTALW [31]. Identical (*) and similar (:) amino acid residues are indicated below the protein sequence. Gaps (-) were introduced into the sequence to maximize homology and to compensate for the different chain lengths. Mutated amino acid residues, which are predicted to be participating within the active site and the additional phosphate binding site, are labelled above by (+) and (\$), respectively. The exchanged amino acid residues, proposed to be involved in the Pdx1:Pdx1 interaction, are labelled above the sequence by (#).
doi:10.1371/journal.pone.0001815.g003

shown for the counterparts in *T. maritima* and *B. subtilis* [15,16]. Surprisingly, the double crown formation is inhibited in the *PfPdx1* DKK mutant, which falls apart into two separate crowns,

thereby revealing a hexameric structure with molecular mass of 238 ± 5 kDa as determined by SLS (Fig. 5). In order to narrow down which amino acid residues of the *PfPdx1* DKK triple mutant are involved in *PfPdx1*:*PfPdx1* interactions, the three amino acids were mutated individually and the derived proteins were analysed by SLS. Mutation of the *PfPdx1* D26 and K83, which are expected to lie within the active site, does not alter the assembly state of *PfPdx1* wild-type protein; however the mutation of *PfPdx1* K151 to alanine - as shown for the DKK triple mutant in Figure 5 - destabilizes the *PfPdx1* assembly (Table 1). The result indicates that this amino acid residue, previously suggested to participate in the formation of the active site of *PfPdx1*, is also involved in the formation of the dodecameric structure of Pdx1 in *P. falciparum*.

Interestingly, addition of 10 mM glutamine (Q) to the buffer used in size exclusion chromatography, resulted in an approximate 50% shift in the assembly of the hexameric formation of the DKK mutant towards the dodecameric structure as estimated from the molecular mass plot obtained by SLS (Fig. 6A). A similar effect was obtained by the addition of 10 mM glutamic acid (E) as well as asparagine (N), although to a lesser extent. In contrast alanine (A) does not affect dodecamer formation.

The amino acid residues E107, E136 and K189 were identified as being proximal to K151 using a homology model of the plasmodial Pdx1 protein (Fig. 2A). E107 and E136 were mutated to alanine and analyzed for their conformation by size exclusion chromatography and SLS. None of these mutants, including the double mutation of both glutamic acids, E107 and E136, showed an effect on dodecamer assembly (data not shown).

Previous crystal structure analyses showed that H116, R131, E135, R138, R139, K150 and K188 in the *T. maritima* structure are located in a phosphate-binding site [15]. All of these amino acid residues are conserved in the plasmodial Pdx1 protein at the positions H117, R132, E136, R139, R140, K151 and K189 (Fig. 3). Mutating the amino acid residues E136, R139 and R140 to alanine (ERR) abolishes the enzyme activity of *PfPdx1*, implying the importance of these residues for PLP synthesis. Nevertheless, the *PfPdx1* ERR mutant reveals a molecular mass of 421 ± 20 kDa as measured by SLS, which correlates well with the dodecameric formation of the wild-type complex. The glutaminase activity of *PfPdx2* is not affected (Table 1), indicating binding of Pdx2 to Pdx1 as confirmed by co-purification experiments (Fig. 4B).

Table 1. Properties of *P. falciparum* mutated Pdx1 and Pdx2 proteins in comparison to the wild type.

Mutations in <i>PfPdx1</i>	<i>TmYaaD</i>	<i>PfPdx1</i> [$\mu\text{U mg}^{-1}$]	<i>PfPdx2</i> [mU mg^{-1}]	Oligomerization state of <i>PfPdx1</i>	Pdx1:Pdx2 interaction
Wild-type (WT)		746 ± 76	266 ± 19	dodecamer	+
D26A	25	n. d.	285 ± 30	dodecamer	+
K83A	82	n. d.	291 ± 22	dodecamer	+
K151A	150	n. d.	251 ± 16	hexamer	+
DKK to AAA (D26/K83/K151)	25, 82, 150	n. d.	274 ± 44	hexamer ^a	+
H88A	87	n. d.	172 ± 13	monomer	(+)
E91A	90	n. d.	95 ± 14	monomer	(+)
RHE to AAA (R85/H88/E91)	84, 87, 90	n. d.	n. d.	monomer	-
ERR to AAA (E136/R139/R140)	135, 138, 139	n. d.	286 ± 8	dodecamer	+

The properties of the recombinant *P. falciparum* vitamin B6 biosynthesis enzymes Pdx1 and Pdx2 were determined as described in the Material and Methods section. The results represent the mean values of at least three independent experiments; (*TmYaaD*) corresponding amino acid residues of YaaD (Pdx1) in *T. maritima*; (*PfPdx1*) PLP formation by *PfPdx1* ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$); (*PfPdx2*) glutaminase activity of *PfPdx2* ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$); (+) co-purification of *PfPdx1* and *PfPdx2* to a lesser extent; n. d. = not detectable for PLP formation by *PfPdx1* ($<10 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

^aapprox. 50% dodecamer in the presence of 10 mM glutamine

doi:10.1371/journal.pone.0001815.t001

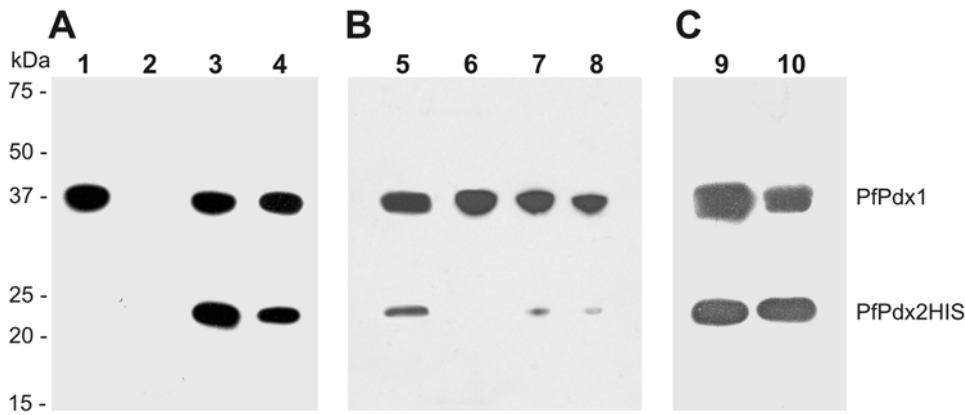


Figure 4. Western blot analysis of the co-purified *PfPdx1* and *PfPdx2HIS* proteins. Cell homogenates of the recombinant expression of the plasmodial Pdx1 protein and Pdx2HIS protein (6× His-tag instead of a Strep-tag) were mixed and subsequently purified via Strep-tag affinity chromatography of the *PfPdx1* protein. The co-purification was visualized by Western blot analysis using a monoclonal anti-Strep antibody (IBA) and the HIS-probe-HRP (Pierce) as described in Material and Methods. (A) Co-purification of the *PfPdx1* wild-type (3) and the *PfPdx1* DKK (D26A, K83A and K151A) triple mutant protein (4) with the *PfPdx2HIS* wild-type. As a control the *PfPdx1* wild-type (WT) (1) and the *PfPdx2HIS* (2) single proteins were purified via Strep-tag affinity chromatography and applied in Western blot analysis. (B) Co-purification of the *PfPdx1* ERR (5), *PfPdx1* RHE (6) as well as the *PfPdx1* H88A (7) and *PfPdx1* E91A (8) mutant proteins with the plasmodial Pdx2HIS wild-type. (Note: The *PfPdx1* R85A mutant was not recombinantly expressible.) (C) The gate-keeper *PfPdx2HIS* E53Y (9) and *PfPdx2HIS* R154W (10) mutants were co-purified with the *PfPdx1* wild-type protein via its Strep-tag.
doi:10.1371/journal.pone.0001815.g004

As a result of these experiments, we propose that the role of K151 in the assembly of dodecameric Pdx1 does not depend upon the neighbouring residues in the final assembled structure, rather that its interaction partners during the assembly must be distal from its final position, possibly even on adjacent monomers of the dodecamer.

Analysis of the interaction of Pdx1 monomers in *P. falciparum*

As already mentioned, biochemical analyses of the plasmodial PLP synthase revealed a 1:1 ratio of both Pdx1 and Pdx2 proteins [6,14]. The crystal structures of the PLP synthase of *T. maritima* and *B. subtilis* demonstrate that the dodecameric complex of Pdx1

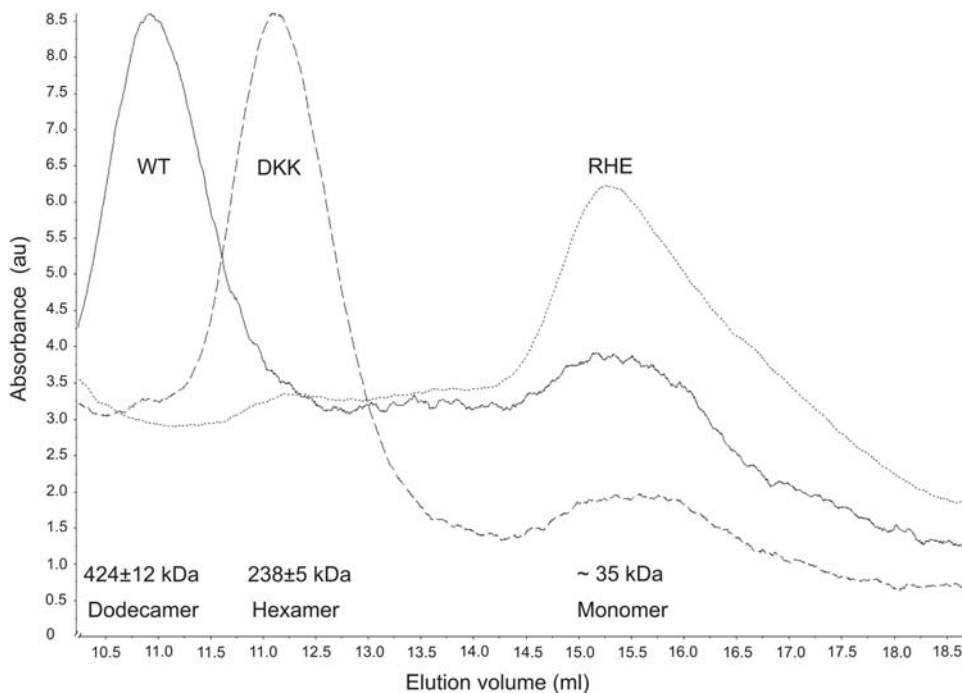


Figure 5. Static light scattering of the plasmodial Pdx1 DKK and RHE mutant proteins in comparison to the wild-type (WT). In order to analyze the structural conformation of the *PfPdx1* proteins, size exclusion chromatography was performed with the *PfPdx1* WT (—), *PfPdx1* DKK (---) and the *PfPdx1* RHE (.....) mutant proteins and the masses measured by static light scattering. The corresponding molecular masses and the proposed structural assemblies are given below. Aliquots of the three peak fractions were subsequently analysed by SDS-PAGE, which confirmed the presence of *PfPdx1* (data not shown).
doi:10.1371/journal.pone.0001815.g005

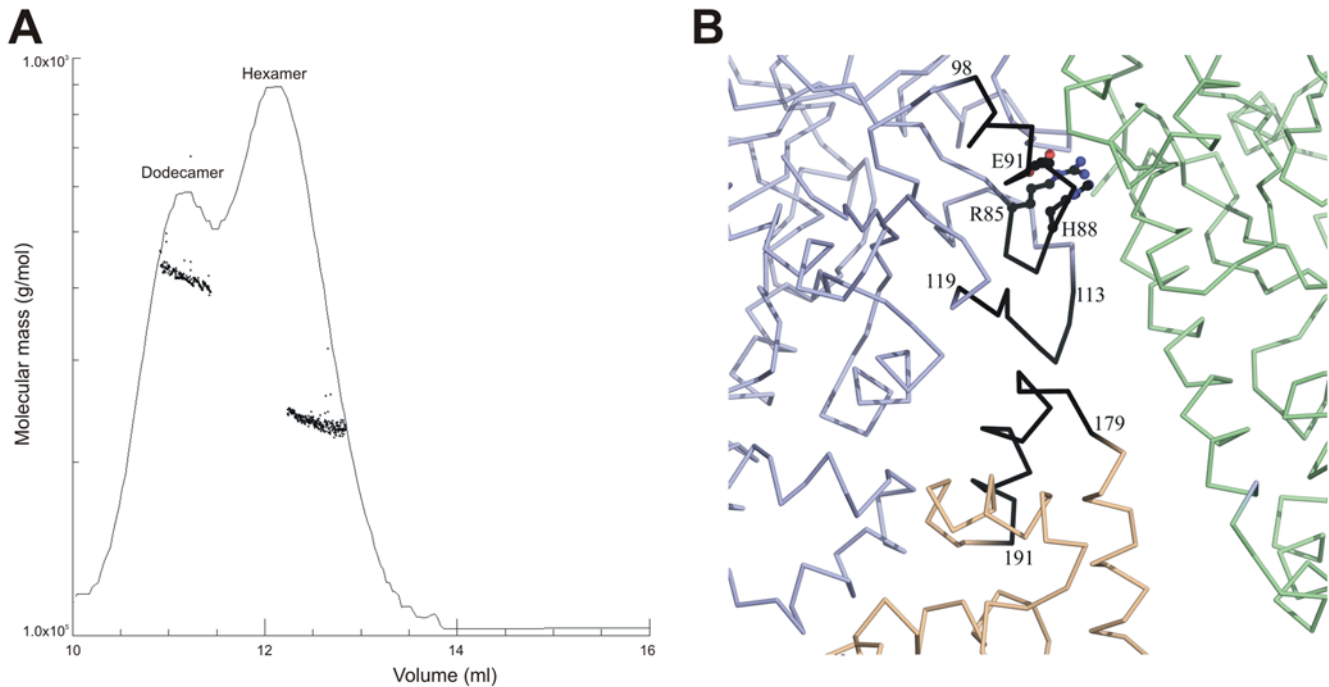


Figure 6. (A) Influence of glutamine on the conformation of the *PfPdx1* DKK mutant. Static light scattering analysis of the plasmodial Pdx1 DKK protein was performed in the presence of 10 mM glutamine. The proposed structural conformations are given above the peak fractions. (B) Affect of mutations on Pdx1 interactions between hexamers. Monomers coloured in green and violet belong to the upper hexameric crown and the monomer coloured in salmon belongs to the lower hexameric crown. Mutations in R85, H88 and E91 of the upper crown affect the conformation of loop 113–119, which interacts with loop-helix 179–191 in the lower crown. Helix 88–98 interacts directly with Pdx2 (not shown). doi:10.1371/journal.pone.0001815.g006

is decorated by the identical number of Pdx2 monomers, which in turn have no direct contact to one another and are therefore interacting only with the respective Pdx1 protein [15,16]. Thus, the double crown complex depends solely on the interaction of Pdx1. Through an analysis of the protein sequence of the plasmodial Pdx1 and the homology model, a number of amino acids within the *PfPdx1*:*PfPdx1* interface region were identified (Fig. 2B). These residues include R85, H88 and E91 in *P. falciparum*, corresponding to amino acids conserved in other organisms as indicated in Figures 2A,B and 3. To analyse the impact of these residues on enzyme activity as well as their importance for the assembly of the entire complex, they were mutated to alanine. No PLP synthesis activity of the plasmodial Pdx1 mutants was obtained; however, the glutaminase activity of *PfPdx2* remained, although it was reduced to approx. 66% and 36% in the presence of the *PfPdx1* mutants H88A and E91A, respectively (Table 1). The reaction catalyzed by *PfPdx2* complexed with the *PfPdx1* triple mutant RHE did not reveal any detectable glutaminase activity, indicating that the interaction of the *PfPdx1* monomers might affect *PfPdx2* binding. Furthermore, to verify whether the homomeric relations influence the assembly of *PfPdx1* and *PfPdx2*, co-purification experiments were performed. The *PfPdx1* wild-type protein and mutants as well as the *PfPdx2*HIS wild-type protein were heterologously expressed and the bacterial homogenates were mixed in an approx. 1:1 ratio. Subsequently, the proteins were purified via affinity chromatography using the Strep-tag of the respective *PfPdx1* wild-type or mutant proteins. Western blot analysis clearly demonstrated co-purification of the wild-type forms, whereas the *PfPdx1* mutants were found to be incompetent in binding *PfPdx2* (Fig. 4B). The oligomeric states of the *PfPdx1* RHE, H88A and E91A mutant proteins were further analyzed by size exclusion chromatography

and SLS. No significant assembly to dodecameric or hexameric formation was detected in either the absence (Fig. 5/6A) or presence of glutamine. Therefore, the *PfPdx1* RHE triple mutant impedes formation of the entire complex and exists in solution only as a monomer. Furthermore, even the single mutants H88A and E91A led to a monomeric state. The R85A mutant did not express and no further analysis of this mutant was performed.

Ammonia shuttle from PfPdx2 to PfPdx1

PLP synthesis by *PfPdx1* depends on ammonia, which is supplied by the hydrolysis of glutamine to glutamate and ammonia by *PfPdx2*, the glutaminase attached to *PfPdx1* [6,14]. Ammonia is thought to be transferred to the catalytic site of Pdx1 via a protein channel [13,15,16]. Analysis of the Pdx2 structure led to the suggestion that the amino acid residues E53 and R154 are the gate-keepers of the ammonia translocation to Pdx1 [15]. Exchanging these amino acids to tyrosine (E53Y) and tryptophan (R154W), respectively, resulted in the total loss of the *PfPdx2* glutaminase activity, while the ability of *PfPdx1* to generate PLP is not affected if ammonium is added as an ammonia source. These mutations did not influence the ability of *PfPdx2* to form a complex with *PfPdx1* as clearly demonstrated by co-purification experiments (Fig. 4C).

Discussion

Two different vitamin B6 biosynthetic pathways have been previously described [18,19]. While the DOXP-dependent pathway, consisting of the Pdx protein family, has been well characterised [10,11,20,21], the DOXP-independent pathway, first found in fungi, has only recently been identified [18,19]. The enzymes involved in the DOXP-independent pathway share neither sequence similarities nor substrate acceptance with *E. coli*

Pdx proteins. Furthermore, vitamin B6 biosynthesis in *E. coli* leads to pyridoxine phosphate, which is subsequently oxidized to PLP by pyridoxine oxidase. The synthesis of the DOXP-independent pathway seems to be more efficient since it results directly in the formation of pyridoxal phosphate, the active form of vitamin B6. This pathway, originally identified by Ehrenshaft *et al.* [22] in *Cercospora nicotianae*, a plant pathogen, is also found in *S. cerevisiae* as well as some archaeobacteria, eubacteria, the plant *A. thaliana*, and recently in the protozoan parasites *P. falciparum* and *T. gondii* [5,6,9,18,23].

PLP is an essential cofactor for various enzymes many of which are involved in fundamental metabolic reactions [1]. Deletion of vitamin B6 biosynthesis enzymes resulted in auxotrophy for this nutrient in bacterial cells [24] and led to a developmental arrest in plant embryos [9]. Attempts to disrupt the open reading frame of the plasmidial *pdx1* have failed so far, which might indicate an indispensability of the gene for the survival of the parasite.

Analyses of the crystal structures of the entire PLP synthase complex in *T. maritima* and *B. subtilis* revealed a dodecameric Pdx1 conformation, which is decorated by twelve Pdx2 proteins [15,16]. Very recently, the interface of Pdx1 and Pdx2 has been described [16]; however, amino acid residues involved in the interaction of the Pdx1 subunits to form the double crown remained to be explored. Therefore, site directed mutagenesis was employed to modify highly conserved amino acid residues that were suggested to form a buried charge cluster and might be located in the Pdx1:Pdx1 interface [13,15]. These highly conserved residues are R85, H88, E91 and D222 in the plasmidial Pdx1 enzyme. Substitution of H88 and E91 by alanine as well as the derived triple mutant RHE (R85A, H88A, E91A) resulted in the loss of *PfPdx1* activity. Interestingly, these mutant proteins were neither able to form a dodecamer nor to associate with *PfPdx2*. While these residues primarily interact within the hexameric crown, they interact indirectly with the opposing hexamer through loop 113–119. This loop in turn contacts helix 179–191 of the second hexamer and may mediate dodecameric formation through this mechanism (Fig. 6B). The effect of RHE on Pdx1-Pdx2 interactions is less clear. These residues are positioned at the N-terminus of helix 88–98 and the loop following this helix interacts directly with Pdx2; thus, it is possible that R85, H88 and E91 are required indirectly for Pdx1-Pdx2 interactions as well.

In *T. maritima* the active site of YaaD contains the amino acid residues D25, K82 and K150 [15]. Mutation of these residues in the bacterial Pdx1 enzyme impedes PLP synthesis [15,25]. This motif is also present in the plasmidial Pdx1 protein and mutagenic analyses of the respective residues (D26A, K83A and K151A) show loss of Pdx1 activity. However, the mutations have no impact on the *PfPdx1*:*PfPdx2* binding ability and on the glutaminase activity of *PfPdx2* (Table 1). Interestingly, the *PfPdx1* DKK mutation leads to a split of the dodecamer into two hexamers. In the presence of glutamine, the destabilizing effect of the DKK triple mutation is reduced by about 50% suggesting an involvement of glutamine in the stabilization of the *PfPdx1* assembly.

The dissociation of the dodecamer is demonstrated to be a result of the K151A mutation. Examination of the structural data of the *B. subtilis* Pdx1 complex (2NV2; www.pdb.org) demonstrates that the equivalent residue (K149) orientates such that the terminal amino group points away from the active site and towards the central cavity of the assembled Pdx1 dodecamer. Nevertheless, it has been shown that K149 in the *B. subtilis* enzyme is involved in ribulose 5-phosphate binding [7]. K151 in the homologous *P. falciparum* Pdx1 is located in neither the Pdx1 nor the Pdx2 interface and consequently its role in formation of the Pdx1 dodecamer is intriguing. In the structure of *T. maritima* YaaD, this residue is pointed towards the

phosphate binding site containing ERR [15]. It has been proposed that this site marks the glyceraldehyde 3-phosphate binding site or an alternative ribulose 5-phosphate binding site and that K151 participates in this binding [15]. ERR directly interact with helix 183–191 of the opposing hexameric crown forming extensive interactions. Interestingly, addition of exogenous amino acids with similar sizes and/or charge to K151 can mimic the function of this lysine by partially restoring the dodecameric conformation. However, this result was observed *in vitro* and remains for elucidation whether this effect is of physiological relevance.

The observation that Pdx1 exists as monomers, hexamers and dodecamers, and that only the hexamers and dodecamers interact with Pdx2 suggests a possible order of assembly. Hexameric crowns probably form first, likely mediated by residues R85, H88 and E91. Once a crown has formed, it can bind Pdx2, as evidenced by the data from our co-purification assays, followed by the assembly of two crowns to form a dodecameric Pdx1 core. Alternatively, the dodecameric core could form first, followed by addition of 12 Pdx2 monomers. These two possibilities are not easily differentiated and clarification of the exact mechanism will require additional biochemical and structural studies.

It has been reported that the bacterial YaaD and PdxS proteins from *T. maritima* and *G. stearothermophilus*, respectively, possess an additional phosphate binding site, which might interact with the phosphate group of the second substrate, glyceraldehyde 3-phosphate [13,15]. Modification of the homologous amino acid residues in *P. falciparum*, E136, R139 and R140, abolished *PfPdx1* activity, which emphasizes the important role for catalysis of these amino acid residues.

For the generation of the active cofactor PLP, an ammonia source is required, which is provided by the glutaminase Pdx2 via substrate channelling [6,14,23]. Structural analysis of the bacterial YaaD (Pdx1) and YaaE (Pdx2) complexes suggested a putative ammonia channel [15,16]. The passage of ammonia seems to be modulated by a gate consisting of E47 and R135 in the *T. maritima* enzyme [15]. Mutagenesis of the respective conserved counterparts in *P. falciparum* (E53 and R154) indeed results in the loss of *PfPdx2* activity, suggesting a potential steric interference within the ammonia tunnel, thereby blocking the transmission of ammonia towards *PfPdx1*. Interestingly, despite the proximity of the gate to *PfPdx1*, the mutation of these two amino acid residues does not influence the binding capability of *PfPdx2* to *PfPdx1*.

In conclusion, the results presented here suggest a possible path through which the plasmidial PLP synthase forms a hierarchical complex using a defined assembly sequence. Confirmation of the PLP synthase assembly path will require additional experiments to probe the dynamic behaviour of assembly. This sequence of events provides a further opportunity to interfere with the assembly of the complex and can be exploited for the development of novel chemotherapeutics to combat malaria.

Materials and Methods

Materials

Restriction enzymes and ligase were purchased from New England Biolabs, USA. Oligonucleotides were from Operon, Germany. The cloning vector pASK-IBA3, Strep-Tactin-Sepharose, anhydrotetracycline and desthiobiotin were from IBA (Institut für Bioanalytik, Germany). All other used chemicals were from Sigma, Germany.

Expression and purification of the PfPdx1 and PfPdx2

E. coli BLR (DE3) (Stratagene, Germany) was transformed with *P. falciparum* Pdx1 and Pdx2 previously cloned into the expression

vector pASK-IBA3 [6]. Single colonies were picked and grown overnight in Luria-Bertani medium containing 50 µg mL⁻¹ ampicillin. The bacterial culture was diluted 1:50 and grown at 37°C until the A₆₀₀ reached 0.5. The expression was initiated with 200 ng mL⁻¹ of anhydrotetracycline and the cells were grown for 4 h at 37°C before being harvested. The cell pellet was resuspended in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl containing 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, sonicated, and centrifuged at 50,000 × g for 1 hour at 4°C. The recombinant Strep-Tag fusion protein was purified according to the manufacturer's recommendation (IBA). The eluate of the affinity chromatography was analysed by SDS-PAGE [26]. The concentration of the purified recombinant protein was determined according to Bradford [27].

Oligonucleotides and site-directed mutagenesis of PfPdx1 and PfPdx2

Oligonucleotides were designed to replace amino acid residues in the proposed active site as well as in the interface of Pdx1:Pdx1 (Table 2). The putative active site residues of the Pdx1 domain (D26, K83 and K151) were mutated to alanine and the putative amino acid residues involved in ammonia channelling of Pdx2 were substituted by tyrosine and tryptophan (Table 2). 35 ng of the double-stranded supercoiled expression plasmid *PfPdx1*-IBA3 or *PfPdx2*-IBA3 [6] and 100 ng of mutagenic sense and antisense primers were used in a 50 µL PCR containing deoxyribonucleotides, reaction buffer, and *Pfu* DNA polymerase as described previously [28]. The cycling parameters were 95°C for 50 s, 55°C for 60 s, and 68°C for 9 min for 17 cycles. The linear

amplification product was treated with endonuclease *DpnI* (New England Biolabs) for 1 h to eliminate the parental template. A 10 µL aliquot from each PCR was used for the transformation of competent *E. coli* XL10GOLD cells (Stratagene). All mutations were verified by automatic sequencing (AGOWA, Germany). Finally, one clone of each construct was transformed for the expression in competent *E. coli* BLR (DE3) cells. The expressed proteins were purified as described above.

Enzyme assays

The glutaminase activity of *PfPdx2* was assayed in two steps, according to [5,6], by measuring the formation of glutamate, which is subsequently converted to 2-oxoglutarate by glutamate dehydrogenase with acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD) as co-substrate. For activity the enzyme complex consisting of Pdx1 and Pdx2 is required [6]; therefore, both enzymes were mixed in an equimolar ratio (total amount 30 µg). The assay was performed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 in the presence of 10 mM glutamine in a total volume of 300 µL at 37°C for 20 min. The enzymatic reaction was stopped by boiling for 1 min. A 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 buffer containing 1 mM EDTA, 0.5 mM APAD and 7 units of glutamate dehydrogenase was added to a final volume of 1 ml and incubated for up to 90 min at 37°C. Finally, the samples were centrifuged for 1 min at 14,000 × g and the absorbance of the supernatant was determined at a wavelength of 363 nm. The specific activity was calculated with the molar extinction coefficient of APADH (reduced form of APAD) of 8900 M⁻¹ cm⁻¹.

Table 2. Oligonucleotides which are used for cloning or site directed mutagenesis of *PfPdx1* and *PfPdx2*. Mutation sites are underlined and in bold.

Name:	Oligonucleotide Sequence (5' → 3')
PfPdx1-D26A-S	GCTTAAAGGAGGAGTTATTATG <u>GCT</u> GTA AAAAGTGTAGAACAAAGC
PfPdx1-D26A-AS	GCTGTCTACACTTTTAC <u>AGC</u> CATAATAACTCCTCCTTAAAGC
PfPdx1-K83A2-S	GTTTCTATTAATGTTCTTGCT <u>GCT</u> GTTCTGATTGGTCATTTTG
PfPdx1-K83A2-AS	CAAAATGACCAATACGAAC <u>AGC</u> AGCAAGAACATTAATAGAAAC
PfPdx1-K151A-S	GAGCTTCTATGATAAGAACT <u>GCC</u> GGCGAAGCTGGTACAGGTAATATTATAG
PfPdx1-K151A-AS	CTATAATATTACCTGTACCAGTTCGCC <u>GGC</u> AGTTCCTATCATAGAAGCTCC
PfPdx1-R85A-S	GTTCTTGCTAAAGTT <u>GCA</u> ATTGGTCATTTTGTGAAG
PfPdx1-R85A-AS	CTTCAACAAAATGACCAATT <u>GCA</u> ACTTTAGCAAGAAC
PfPdx1-H88A-S	CTTGCTAAAGTTCGATTGGC <u>GCC</u> TTTGTGGAAGCACAAATTTAG
PfPdx1-H88A-AS	CTAAAATTTGTGCTTCAACAAA <u>GGC</u> GCCAATACGAACCTTAGCAAG
PfPdx1-E91A-S	GTATTGGTCATTTTGT <u>GCA</u> GCACAAATTTAGAAGAGC
PfPdx1-E91A-AS	GCTCTTCAAATTTGTGCT <u>TGCA</u> ACAAAATGACCAATAC
PfPdx1-RHE-AAA-S	CGTTTCTATTAATGTTCTTGCTAAAGTT <u>GCT</u> ATTGGC <u>GCC</u> TTTGT <u>GCA</u> GCACAAATTTAGAAGAGCTTAAATTTG
PfPdx1-RHE-AAA-AS	CAATTTTAAAGCTCTTCAAATTTG <u>TGCT</u> TGCAACAAA <u>GGC</u> GCCAAT <u>AGC</u> AACCTTAGCAAGAACATTAATAGAAACG
PfPdx1-ERR-AAA-S	GTATGTGGGTGTACAAATTTA <u>GGC</u> GCCGCTCTA <u>GCAGCA</u> ATATCTGAAGGAGCTTCTATG
PfPdx1-ERR-AAA-AS	CATAGAAGCTCCTCAGATAT <u>TGCTGCT</u> AGAGC <u>GGC</u> GCCTAAATTTGTACACCCACATAC
PfPdx1-E107A-S	GCTTAAATTTGATATGATAGATGAAAGC <u>GCT</u> GTATTAACAATTTG
PfPdx1-E107A-AS	CAATTTGTAATAC <u>AGCG</u> CTTTCATCTATCATATCAATTTTAAAGC
PfPdx2-IBA3HIS-AS	GCGCGCGGTCTCAGCGCTTAAATGATGATGATGATGATGACCTGAATATTTGTAATTTTAAAC
PfPdx2-E53Y-S	GGGCTTGAATTCAGGTGGAT <u>TAT</u> TCCACAACGTACGTCG
PfPdx2-E53Y-AS	CGACGTACAGTTGTGGAA <u>TAT</u> TCCACCTGGAATTACAAGCCC
PfPdx2-R154W-S	CTTAACAGCGCCTGCATAT <u>TGGG</u> CACCTTATATAAGAGAA
PfPdx2-R154W-AS	TTCTCTTATAAAGGTGC <u>CCA</u> TATGCAGGCCGCTGTTAAG

doi:10.1371/journal.pone.0001815.t002

For the synthesis of PLP, the enzymes Pdx1 and Pdx2 are required. The reaction was performed in the presence of the substrates 0.5 mM ribose 5-phosphate, 1 mM glyceraldehyde 3-phosphate and 10 mM glutamine in a buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 150 mM NaCl [24]. PLP biosynthesis by Pdx1 alone was carried out under equivalent conditions; however glutamine was replaced by 10 mM ammonium salt. The total volume of 1 mL per reaction was incubated for 30 min at 37°C. Subsequently, the supernatant was analysed at 414 nm for the formation of a Schiff base between PLP and the Tris base using a spectrophotometer [7,8].

Co-purification experiments of PfPdx1 and PfPdx2

The plasmodial proteins were recombinantly expressed as described above. After sonication and centrifugation, the supernatants of the respective Pdx1 wild-type or mutant proteins were combined with the supernatants of the PfPdx2 expression. For co-purification the Strep-tag encoded by the pASK-IBA3 expression vector was substituted by a 6× His-tag using a PCR reaction containing the oligonucleotides PfPdx2-IBA3-S and PfPdx2HIS-IBA3-AS according to [6]. Subsequently, the mixture of PfPdx1 and PfPdx2HIS was purified via Strep-Tactin affinity chromatography as described above. For visualizing the co-purification, Western blot analyses were performed employing a monoclonal Strep-tag II antibody (IBA) at a dilution of 1:20000 and a secondary anti-mouse horseradish peroxidase labelled goat antibody (BioRad, Germany) at a dilution of 1:20000. The PfPdx2HIS protein was detected by the HIS-Probe-HRP reagent (Pierce, USA) at a dilution of 1:5000. The hybridization signals

were visualised on X-ray films (Retina, Germany) using the ECL plus detection system, according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare).

Determination of the oligomeric state of PfPdx1

In order to investigate the complex formation of PfPdx1, the Strep-tagged protein was purified as described above. Subsequently 100 µg of the protein were separated by gel filtration on a Superdex 200 10/30 column (GE Healthcare). The elution buffer contained 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl with and without 10 mM glutamine, glutamic acid, asparagine or alanine, respectively. A miniDAWN Tristar (Wyatt Technologies, USA) was connected immediately downstream of the separation media and used to collect static light scattering (SLS) data [29]. The SLS data were analyzed using the package ASTRA, based on the absorption coefficient for PfPdx1 of 19855 M⁻¹ cm⁻¹ and the molecular mass of 34.2 kDa.

Acknowledgments

The authors would like to thank Marie-Luise Eschbach and Bärbel Bergmann for excellent technical assistance. J. K. conducted part of this work in fulfilment of the requirement for a Ph.D. from the University of Hamburg.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SE CW IM JK MG RJ RW. Performed the experiments: SE CW IM JK MG RJ. Analyzed the data: SE CW IM JK MG RJ RW. Wrote the paper: SE CW IM JK MG RJ RW.

References

- Percudani R, Peracchi A (2003) A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep* 4: 850–854.
- Stolz J, Vielreicher M (2003) Tpn1p, the plasma membrane vitamin B6 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 18990–18996.
- Kerry JA, Rohde M, Kwok F (1986) Brain pyridoxal kinase. Purification and characterization. *Eur J Biochem* 158: 581–585.
- Belitsky BR (2004) Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for de novo pyridoxal 5-phosphate biosynthesis. *J Bacteriol* 186: 1191–1196.
- Dong YX, Sueda S, Nikawa J, Kondo H (2004) Characterization of the products of the genes SNO1 and SNZ1 involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 271: 745–752.
- Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Warnecke D, Walter RD (2005) Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 280: 5242–5248.
- Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW, Begley TP (2005) Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc* 127: 3682–3683.
- Raschle T, Amrhein N, Fitzpatrick TB (2005) On the two components of pyridoxal 5-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 280: 32291–32300.
- Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N, et al. (2005) Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13687–13692.
- Lam HM, Tancula E, Dempsey WB, Winkler ME (1992) Suppression of insertions in the complex pdxJ operon of *Escherichia coli* K-12 by lon and other mutations. *J Bacteriol* 174: 1554–1567.
- Lam HM, Winkler ME (1992) Characterization of the complex pdxH-tyrS operon of *Escherichia coli* K-12 and pleiotropic phenotypes caused by pdxH insertion mutations. *J Bacteriol* 174: 6033–6045.
- Bauer JA, Bennett EM, Begley TP, Ealick SE (2004) Three-dimensional structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5-phosphate biosynthesis. *J Biol Chem* 279: 2704–2711.
- Zhu J, Burgner JW, Harms E, Belitsky BR, Smith JL (2005) A new arrangement of (β/α)₈ barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J Biol Chem* 280: 27914–27923.
- Gengenbacher M, Fitzpatrick TB, Raschle T, Flicker K, Sinning I, et al. (2006) Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem* 281: 3633–3641.
- Zein F, Zhang Y, Kang YN, Burns K, Begley TP, et al. (2006) Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 45: 14609–14620.
- Strohmeier M, Raschle T, Mazurkiewicz J, Rippe K, Sinning I, et al. (2006) Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19284–19289.
- Newton P, White N (1999) Malaria: new developments in treatment and prevention. *Annu Rev Med* 50: 179–192.
- Ehrenschaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9374–9378.
- Osmani AH, May GS, Osmani SA (1999) The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* 274: 23565–23569.
- Roa BB, Connolly DM, Winkler ME (1989) Overlap between pdxA and ksgA in the complex pdxA-ksgA-apaG-apaH operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 171: 4767–4777.
- Hill RE, Himmeldirk K, Kennedy IA, Pauloski RM, Sayer BG, et al. (1996) The biogenetic anatomy of vitamin B6. A 13C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271: 30426–30435.
- Ehrenschaft M, Jenns AE, Chung KR, Daub ME (1998) SOR1, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora fungi*, is highly conserved in divergent organisms. *Mol Cell* 1: 603–609.
- Knöckel J, Müller IB, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C (2006) The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate de novo. *Mol Biochem Parasitol* 152: 108–111.
- Pflug W, Lingens F (1983) Occurrence of pyridoxaminephosphate oxidase and pyridoxal kinase in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem* 364: 1627–1630.
- Raschle T, Arigoni D, Brunisholz R, Amrhein N, Fitzpatrick TB (2007) Reaction mechanism of pyridoxal 5'-phosphate synthase: Detection of an enzyme bound chromophoric intermediate. *J Biol Chem* 282: 6098–6105.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Bradford MM (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.
- Wrenger C, Lüersen K, Krause T, Müller S, Walter RD (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.
- Geerlof A, Brown J, Coutard B, Eglhoff MP, Enguita FJ, et al. (2006) The impact of protein characterization in structural proteomics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 1125–1136.

30. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31: 3381–3385.
31. Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, et al. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

Poisoning Pyridoxal 5-Phosphate-Dependent Enzymes: A New Strategy to Target the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

Ingrid B. Müller¹*, Fang Wu², Bärbel Bergmann¹, Julia Knöckel¹, Rolf D. Walter¹, Heinz Gehring², Carsten Wrenger¹

1 Department of Biochemistry, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany, **2** Department of Biochemistry, University of Zürich, Zürich, Switzerland

Abstract

The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is able to synthesize *de novo* pyridoxal 5-phosphate (PLP), a crucial cofactor, during erythrocytic schizogony. However, the parasite possesses additionally a pyridoxine/pyridoxal kinase (PdxK) to activate B6 vitamers salvaged from the host. We describe a strategy whereby synthetic pyridoxyl-amino acid adducts are channelled into the parasite. Trapped upon phosphorylation by the plasmodial PdxK, these compounds block PLP-dependent enzymes and thus impair the growth of *P. falciparum*. The novel compound PT3, a cyclic pyridoxyl-tryptophan methyl ester, inhibited the proliferation of *Plasmodium* very efficiently (IC₅₀-value of 14 μM) without harming human cells. The non-cyclic pyridoxyl-tryptophan methyl ester PT5 and the pyridoxyl-histidine methyl ester PHME were at least one order of magnitude less effective or completely ineffective in the case of the latter. Modeling *in silico* indicates that the phosphorylated forms of PT3 and PT5 fit well into the PLP-binding site of plasmodial ornithine decarboxylase (PfODC), the key enzyme of polyamine synthesis, consistent with the ability to abolish ODC activity *in vitro*. Furthermore, the antiplasmodial effect of PT3 is directly linked to the capability of *Plasmodium* to trap this pyridoxyl analog, as shown by an increased sensitivity of parasites overexpressing PfPdxK in their cytosol, as visualized by GFP fluorescence.

Citation: Müller IB, Wu F, Bergmann B, Knöckel J, Walter RD, et al. (2009) Poisoning Pyridoxal 5-Phosphate-Dependent Enzymes: A New Strategy to Target the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. PLoS ONE 4(2): e4406. doi:10.1371/journal.pone.0004406

Editor: Alfred Lewin, University of Florida, United States of America

Received: September 16, 2008; **Accepted:** December 12, 2008; **Published:** February 6, 2009

Copyright: © 2009 Müller et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants WA 395/15 and WR 124/2 and by COST Switzerland (Action 922, Grant C02.0017). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ibmueller@bni-hamburg.de

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Malaria is one of the most threatening diseases in the world, with more than 300 million infected people and up to 2 million fatalities annually, mainly young children and pregnant women living in Africa. The causative agent of the most severe form, tropical malaria, is *Plasmodium falciparum*, a protozoan parasite that sequesters in the red blood cells of its human host. As yet, there are no vaccines available and the few antimalarials are losing their efficacy due to the rapid spread of drug-resistant parasites. There is therefore an urgent need to find new strategies to interfere with the parasite's metabolism.

Pyridoxal 5-phosphate (PLP) is the active form of vitamin B₆, which comprises the vitamers pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine as well as their related phosphate esters. It is a crucial cofactor for various enzymatic reactions, predominantly involved in the transformation of amino acids [1]. Many of the PLP-dependent enzymes are essential and therein offer the possibility to target diseases [2]. There are already promising attempts, such as the inhibition of γ -aminobutyric acid (GABA) aminotransferase by vigabatrin in epilepsy therapy [3] or of alanine racemase by antibacterial agents [4,5]. The PLP-dependent enzyme ornithine decarboxylase (ODC) is a target in the fight against African trypanosomes, the causative agent of sleeping sickness, and against cancer [2,6,7]. ODC is the key enzyme in the formation of

polyamines, which are essential for cellular proliferation and differentiation [8,9], and accordingly, polyamine biosynthesis in the malaria parasite is also considered to be a possible drug target [10].

The reactions of PLP-dependent enzymes are highly diverse; however the initial formation of a Schiff base of PLP with the amino group of an amino acid is a common intermediate to all of them. Reduction of the Schiff base leads to a covalent coenzyme-substrate adduct resembling a transition-state analog with high affinity to the apoprotein [11]. Over thirty years ago, Heller et al. [12] synthesized several phosphopyridoxyl-amino acids that mimic the Schiff base intermediate involved in enzymatic decarboxylation. Among these, N-(5-phosphopyridoxyl)-ornithine inhibited rat liver ODC by binding to the holoenzyme in a non-competitive manner with respect to substrate and cofactor. Recently, a new analog, the BOC-protected pyridoxyl-ornithine conjugate (POB), was shown to inhibit human ODC in cells as well as the growth of various tumor and transformed cells effectively, whereas non-tumorigenic cells were less affected [13]. Another analog, pyridoxyl-histidine methyl ester (PHME), was able to inhibit human histidine decarboxylase in human mastocytoma cells without affecting proliferation [14].

Plants, bacteria, as well as some fungi are able to synthesize PLP *de novo*, whereas mammals entirely depend on the dietary uptake of pyridoxal, pyridoxine and pyridoxamine. They are converted into PLP via phosphorylation by pyridoxal/pyridoxine kinase (PdxK; EC

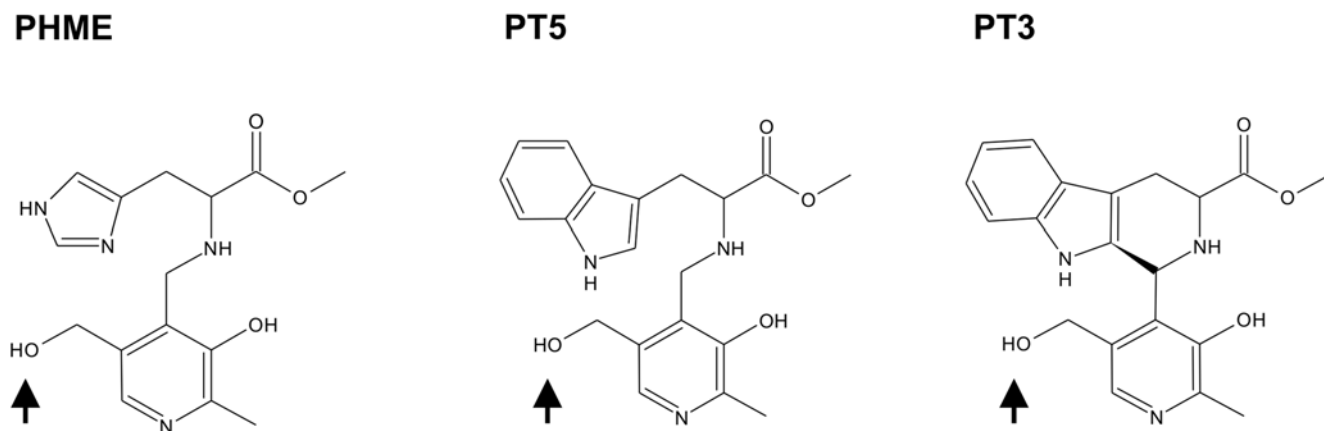


Figure 1. Structures of the pyridoxyl-amino acid adducts PHME, PT5 and PT3. The phosphorylation sites are indicated by arrows.
doi:10.1371/journal.pone.0004406.g001

2.7.1.35) and subsequent oxidation by pyridoxine/pyridoxamine oxidase (EC 1.4.3.5). Although PdxK is widely distributed in human tissues, oxidase activity is low or absent in most cells [15]. Human erythrocytes have both enzymes and are proposed to be the main carrier of vitamin B6. PLP in red blood cells is mostly bound to proteins. To provide tissues with pyridoxal, PLP is dephosphorylated by vitamin B6 specific phosphatase within the erythrocyte [16]. The plasmodial parasite generates vitamin B6 *de novo* in its erythrocytic stage [17,18]. The assembly of the plasmodial PLP-synthesis machinery follows a hierarchically defined course, which seems to be essential for activity [19]. In addition, the parasite possesses a functional PdxK [17], which in other protozoan parasites that lack *de novo* synthesis, such as trypanosomes, is the only enzyme activating salvaged pyridoxal [20].

In this report we present a new approach to target the malaria parasite by designing and testing novel pyridoxyl-adducts as antimalarials. In a first step these compounds are trapped upon phosphorylation in the parasite. In this state they mimic PLP and together with the substrate moiety they bind and inhibit efficiently PLP-dependent enzymes, which eventually kills the parasite. We validate their potency as substrates of *Pf*PdxK as well as their inhibitory effect on the PLP-dependent enzyme *Pf*ODC, and finally we demonstrate that the antiplasmodial effect can be directly linked to the activity of the plasmodial PdxK as transgenic parasites overexpressing *Pf*PdxK exhibit an increased sensitivity towards the pyridoxyl-analog.

Results

Pyridoxyl-amino acids are substrates of the plasmodial PdxK

Our strategy is based on the fact that pyridoxal is phosphorylated by the plasmodial PdxK and the resulting PLP is thereby trapped within the parasite. In this respect the non-phosphorylated pyridoxyl-adducts PT3, PT5 and PHME (shown in Figure 1; their synthesis and that of their phosphorylated forms is described in the section Supporting information, Text S1) were tested as potential substrates of *Pf*PdxK. All three pyridoxyl-adducts were phosphorylated by the plasmodial enzyme with specific activities of 38, 20 and 64 nmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively (Table 1).

Phosphorylated pyridoxyl-amino acids inhibit *Pf*ODC in vitro

Phosphorylation of pyridoxal is required in order to obtain the active cofactor for the enzymatic reaction of PLP-dependent

enzymes. The activity of ODC depends on PLP and its competition by the pyridoxyl-adducts was measured as a representative for PLP-dependent enzymes. The non-phosphorylated pyridoxyl-adducts, PHME, PT5 and PT3, did not inhibit the plasmodial ODC activity in the standard *in vitro* assay (Table 1). Only the phosphopyridoxyl-adducts PPHME and PPT5 act as inhibitors on the plasmodial ODC with IC₅₀-values of 58 μM and 64 μM, respectively, as shown in Table 1. Since PPT3 was not available its inhibitory potential was analyzed by *in silico* modeling.

Structural analysis of *Pf*ODC binding to PPT3 and PPT5

The active species of PT3 and PT5 in cells are presumed to be their phosphorylated forms. To study the binding mode in the active site of plasmodial ODC and to elucidate binding differences, PPT3 and PPT5 were modeled into the active site of *Pf*ODC (Figure 2). The 5-phosphate-pyridoxyl motif forms hydrogen bonds with Ser868B, Met967B, His998B and Tyr1384B in both compounds. The side chains of both PPT3 and PPT5 occupy the pocket formed by Asp887B, Lys868B, Cys1355A, Asn1393A, Arg1117B, Asp1320B, Asp1356A and the hydrophobic residues Tyr1384B, Tyr966B, Phe1392A. The indole ring of PPT3 and PPT5 is engaged in hydrophobic interactions with Tyr1384B. The N atom of the indole ring of the cyclic PPT3 can

Table 1. PT3, PT5, PHME and their phosphate esters as substrates of *Pf*PdxK or inhibitors of *Pf*ODC

Compounds	Specific activity of <i>Pf</i> PdxK (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) ^{a)}	Inhibition of <i>Pf</i> ODC activity IC ₅₀ -value [μM] ^{a)}
PHME	64±4	n.d.
PT5	20±2	n.d.
PT3	38±4	n.d.
PPHME	n.d.	58±11
PPT5	n.d.	64±13
Pyridoxine ^{b)}	112±9	
Pyridoxal ^{b)}	50±4	
Pyridoxamine ^{b)}	30±2	

^{a)}All results represent the mean values±standard deviations of three to six independent experiments; n. d.= not detectable.

^{b)}Values are taken from [17].

doi:10.1371/journal.pone.0004406.t001

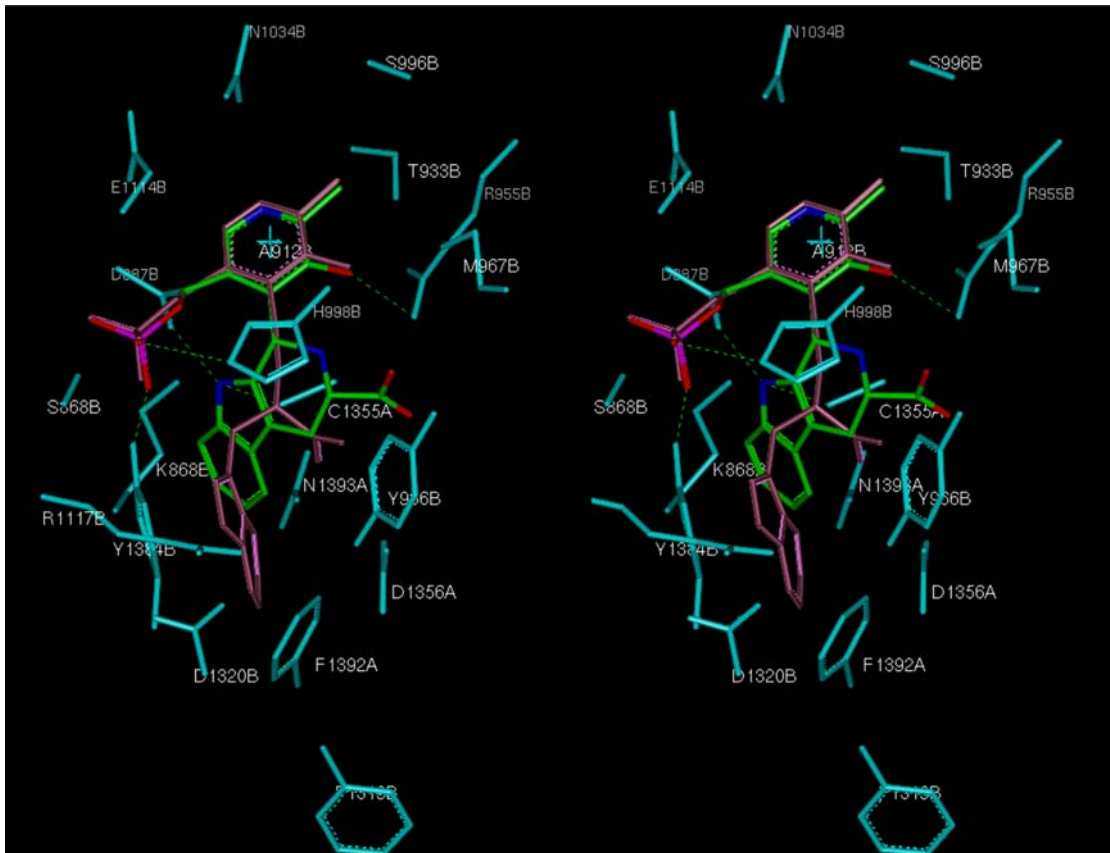


Figure 2. Stereo view of the putative binding mode of PPT3 and PPT5 in the active site of *PfODC*. Residues surrounding the coenzyme-substrate analogs within a distance of 3 Å are indicated in cyan. PPT5 is colored in pink and the cyclic form PPT3 is colored in green and by default atom types (O, N). The hydrogen bonds formed by PPT3 and *PfODC* are shown with green dotted lines.
doi:10.1371/journal.pone.0004406.g002

form hydrogen bonds with Asp887B and Cys1355A, whereas the non-cyclic PPT5 can form one with Asp1320B.

PT3 exhibits distinct antiplasmodial activity

To analyze the potential of the pyridoxyl-amino acid conjugates in blocking the proliferation of cultured *P. falciparum*, the parasites were treated with the non-phosphorylated forms. Additionally, deoxyypyridoxine, known to be effective against *P. lophorae* [21], was tested as a control. While deoxyypyridoxine and PHME had no effect on parasite growth, PT3 inhibited the proliferation of cultured *Plasmodium* with an IC_{50} -value of 14 μ M (Figure 3). PT5 also showed antiplasmodial activity, however, the apparent IC_{50} -value was more than one order of magnitude higher. The phosphorylated compounds did not inhibit plasmodial growth at all (data not shown). Interestingly, the effect of PT3 on the growth of mammalian cells was marginal. At a concentration of 50 μ M PT3 the growth was decreased to about 75% of the untreated control. Treating the cells with 100 μ M PT3 only slightly increased inhibition further (Table 2).

Localization of the *PfPdxK*

In order to determine the localization of the plasmodial PdxK, the open reading frame of *gfp* was fused to the 3'-end of *pfpdxk* resulting in a *PfPdxK*-GFP chimera. Three weeks post-transfection, cells resistant to the selection drug WR99210 were obtained and successful transfection of the construct was confirmed by plasmid rescue (data not shown). The *PfPdxK*-GFP chimera

revealed an even distribution in the parasite's cytosol (Fig. 4A) and its expression was confirmed by western blot analysis showing a band of the expected size of 82 kDa only in the transgenic cell line (Fig. 4B).

P. falciparum overexpressing *PfPdxK* is more sensitive towards PT3

Since *PfPdxK* presumably activates the prodrug PT3, thereby triggering inhibition of parasite growth, another transgenic *P. falciparum* cell line was created. This cell line overexpressed *PfPdxK* fused to a C-terminal strep tag II encompassing ten amino acid residues (*PfPdxK*-strep), thus avoiding possible steric influences of the GFP protein. The expression of *PfPdxK*-strep was verified by northern blot analysis of total RNA (Figure 5A). Additional to the endogenous mRNA of about 3 kb, present in wild-type and *PfPdxK*-strep parasites (a), a 4 kb band occurred only in the transgenic *PfPdxK*-strep expressing cell sample (b). The corresponding *PfPdxK*-strep protein was further verified by western blot analysis, using a monoclonal antibody against the fused strep tag (Figure 5B). To analyze the effect of PT3 on the transgenic *PfPdxK*-overexpressing cells as well as on wild-type parasites, proliferation was monitored over a period of 6 days. The experiment clearly revealed that *PfPdxK*-overexpressing cells that were treated with 7 μ M PT3, corresponding to half the IC_{50} -value, exhibited a considerably increased doubling time (45.0 h, calculated as described in Materials and Methods), in comparison to untreated *PfPdxK*-strep cells (17.5 h). This parameter was only

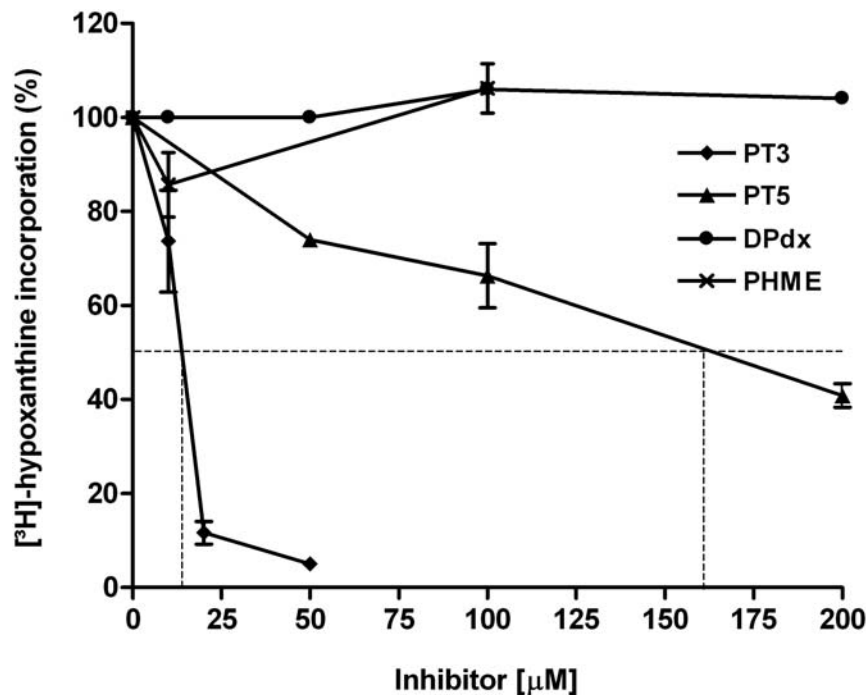


Figure 3. Effect of PT3, PT5 and PHME on cultured *Plasmodium*. Proliferation was determined after 48 h incubation by the [^3H]-hypoxanthine incorporation assay described in Material and Methods. The experiment presented is representative of at least three independent analyses each in triplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0004406.g003

slightly altered for wild-type cells from 16.9 h for the untreated control to 20.7 h for the culture treated with PT3 (Figure 6).

Discussion

The general lack of progress in malaria control depends not least on account of resistance to common antimalarials [22]. In this respect, not only the search for novel drug targets in the parasite's metabolism but also new approaches should be considered to fight the parasite.

We propose here a strategy to poison PLP-dependent enzymes in order to kill the human malaria parasite *P. falciparum*. PLP is a cofactor in more than 140 distinct enzymatic reactions, corresponding to approx. 4% of all classified activities [1]. Many of the PLP-dependent enzymes are essential; once blocked, the death of the parasite follows, as reported for the plasmodial ornithine decarboxylase (*PjODC*) [10,23]. The idea behind the proposed strategy is hence to target critical PLP-dependent enzymes of the parasite simultaneously by using pyridoxyl-adducts as prodrugs.

Wu et al. [14] showed that the pyridoxyl-histidine methyl ester (PHME) acts as a potent transition-state inhibitor of histidine decarboxylase (hHDC) in human cells. When PHME was applied to cultured *P. falciparum* no significant growth inhibition was observed; similar to the result obtained with the pyridoxine analog deoxyypyridoxine, although the latter was previously reported to be an effective inhibitor in a different system [21]. Either these two compounds do not interfere sufficiently with the parasite's metabolism or have only a limited uptake. Since the erythrocyte, the host cell that harbors *Plasmodium*, is regarded as the main carrier of vitamin B6 in the human [15], the question arises whether the strategy of poisoning PLP-dependent enzymes in the parasite is at all applicable. However, it was shown that PLP is immediately bound by hemoglobin [24] and hence of limited availability for the parasite. It therefore remains to be clarified to what extent the parasite relies on salvage, given that the *de novo* synthesis of PLP seems to be functional in the blood stage, during which *Plasmodium* can survive without additional pyridoxine [25].

In this study we present the newly synthesized pyridoxyl-tryptophan methyl esters PT3 and PT5 (Figure 1). The cyclic PT3 exhibits an antimalarial effect in the low micromolar range, with an IC_{50} -value of 14 μM , whereas the non-cyclic PT5 is one order of magnitude less effective (Figure 3). PT3 treatment of human cells revealed only a moderate effect (as shown in Table 2), suggesting that the impact of PT3 is parasite-specific. Moreover, effective inhibition of *Plasmodium* at the cellular level with this pyridoxyl-analog demonstrated that *de novo* synthesis of PLP is unable to compensate for the adverse effect of PT3 on parasite survival. While we assume that, *in vivo*, there is a dual provision to the parasite's PLP pool, further experiments concerning uptake and functional analyses on knock-out parasites would have to be performed to establish the contributions and relative importance of salvage and *de novo* synthesis.

Table 2. Effect of PT3 on mammalian cell lines

Mammalian cell lines	Growth inhibition (%)*	
	50 μM PT3	100 μM PT3
RD	74 \pm 5	60 \pm 7
A 549	73 \pm 8	65 \pm 8
FRHK 4	76 \pm 6	73 \pm 9

*Of untreated control; all results represent the mean values \pm standard errors of at least three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0004406.t002

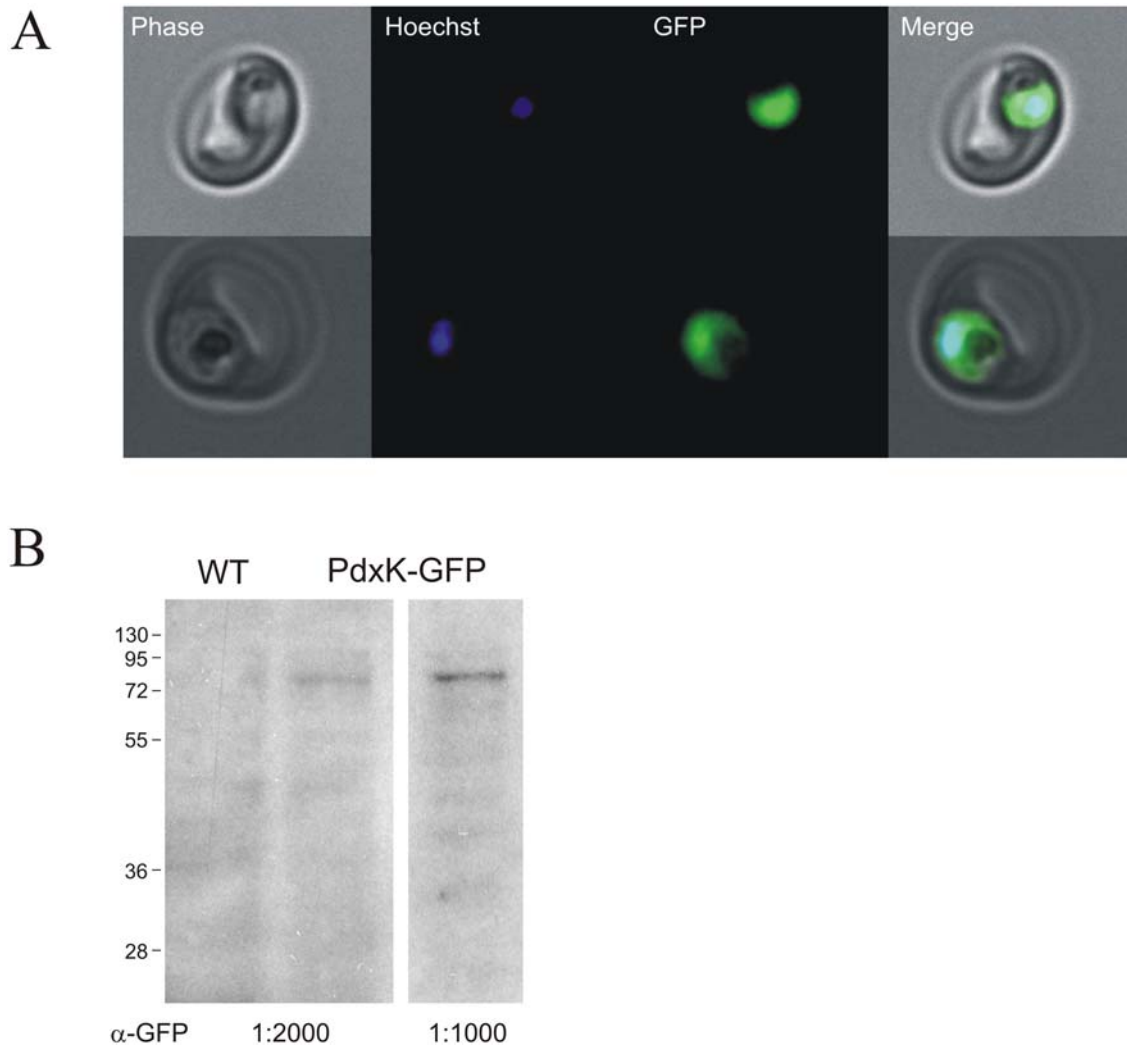


Figure 4. Localization of *PfPdxK*-GFP in living parasites by fluorescence microscopy. A) Fluorescence of the GFP moiety (green) is found in the parasite's cytosol. The nucleus is stained with Hoechst dye (blue). B) Total protein homogenates of WT and *PfPdxK*-GFP parasites were separated by SDS-PAGE and *PfPdxK*-GFP was visualized by western blot analysis using an anti-GFP antibody diluted 1:2000 (left panel) and 1:1000 (right panel). doi:10.1371/journal.pone.0004406.g004

As well as demonstrating their antimalarial effect the studies presented here show that both compounds, PT3 and PT5, are phosphorylated by the *PfPdxK* *in vitro* at levels comparable to those for the natural substrates pyridoxal and pyridoxamine (Table 1). From this we assume that the pyridoxyl-analogs are likely to be trapped in the parasite. Their trapping in the erythrocyte can be discounted since, beside a PdxK, the host also possesses pyridoxal phosphatase activities [16].

In order to examine whether the phosphorylated pyridoxyl-amino acid adducts are able to interact with their assumed target enzyme, the inhibitory effect on the plasmodial ODC activity was measured. As expected, only the phosphorylated analogs interfered with the decarboxylation of ornithine to putrescine and were thus able to displace PLP in *PfODC* (Table 1). The fact that pyridoxyl-histidine and -tryptophan inhibit ODC is contrary to the generally accepted view that such transition state inhibitors should be designed only as coenzyme-substrate adducts.

As PPT3 was not available, its inhibitory action on plasmodial ODC could not be experimentally measured and thus its interaction was studied *in silico*. Molecular modeling of PPT3 and PPT5 in the active site of *PfODC* predicted that these would

have different binding affinities to the enzyme. PPT3 forms hydrogen bonds with Asp887B and Cys1355A of *PfODC*, whilst PPT5 can form only one, with Asp1320 (Figure 2). The concerted hydrogen bonding of the N atom of the indole ring of PT3 with Asp887B and Cys1355A found in the modelled complex, which results in an additional hydrogen bond in comparison to the complex with PPT5, could account for the better binding of PPT3. Whether this is the main contribution or whether additional energetically favourable interactions are present is beyond the scope of the present modelling studies. Notably, Cys1355A has been assumed to be the catalytic residue in *PfODC* [26], with a function comparable to Cys360 in mammalian [27] and trypanosomal ODC [28]. Cys360 modification totally abolishes ODC activity, as demonstrated with the well-known suicide inhibitor DFMO [27].

The use of pyridoxyl-adducts as competitive transition-state inhibitors has already been tried by many groups and their potency confirmed [12,29]. However, using such compounds as prodrugs against *Plasmodium* had not been tested so far. The strategy proposed here is highly dependent on the phosphorylation by *PfPdxK* to activate and trap the phosphorylated prodrug in the

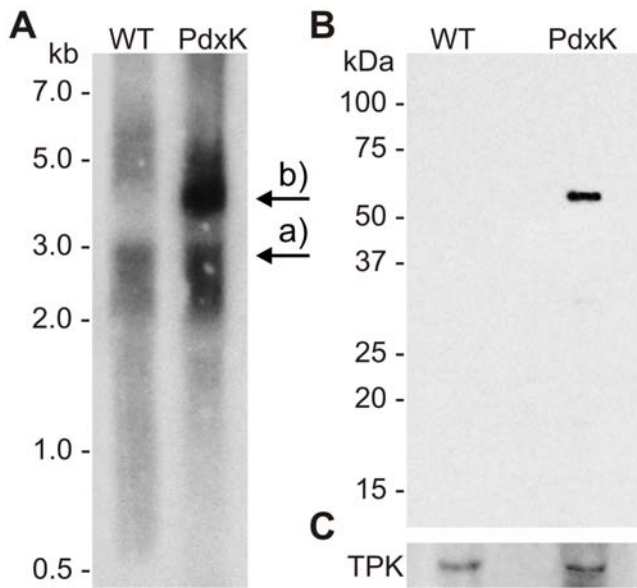


Figure 5. Analysis of *PfPdxK*-strep expression in *P. falciparum*. A) RNA isolated from wild-type (WT) and transgenic *PfPdxK*-strep (PdxK) cells was analyzed by a northern blot, on which beside the endogenous *pdxk* (a) an additional band of approx. 4 kb was detected only in PdxK, corresponding to the expected size of the exogenous transcript (b). B) Total protein homogenates of WT and PdxK parasites were separated by SDS-PAGE and the expression of *PfPdxK*-strep was visualized by western blot analysis using an anti-strep antibody. C) The western blot was reprobated with a specific anti-thiamine pyrophosphokinase (TPK) antibody as loading control.

doi:10.1371/journal.pone.0004406.g005

cell. The key role of *PfPdxK* could be demonstrated by overexpressing a transgenic copy of *PfPdxK* in the parasite. By means of a GFP chimera, a cytosolic localization of *PfPdxK* - important for trapping PT3 - could be observed (Figure 4). As GFP might disturb the enzyme activity of PdxK, a construct carrying a small strep tag (10 amino acids) instead of GFP (238 amino acids) was also generated. Expression of the *PfPdxK*-strep fusion product, previously shown to maintain PdxK activity [17], was subsequently confirmed by western and northern blot analyses (Figure 5). Since in this case *PfPdxK* is not the target enzyme but the activator of the prodrug PT3, an increased sensitivity of transgenic *PfPdxK* overexpressing cells would be expected relative to wild-type. Consistent with the proposed strategy, monitoring parasite growth over several days clearly revealed that the impact of PT3 on *PfPdxK* overexpressing cells was considerably stronger. The growth rate of these cells was reduced by 61% relative to the untreated control (Figure 6B), whereas the proliferation of the wild-type was only inhibited by 19% (Figure 6B). From that we conclude that a time-dependent accumulation of PPT3 in the parasite's cytosol occurred, emphasizing the key role of *PfPdxK*.

Our results suggest that the pyridoxyl-tryptophan derivative enters the parasite, possibly directly via an amino acid transporter. After phosphorylation, PPT3 displaces PLP from the active site of ODC (and other PLP-dependent enzymes) or binds directly to newly synthesized apoenzymes which ultimately arrests growth of *P. falciparum* (Figure 7). The significant superiority of the cyclic form (PT3) compared to the open form (PT5) of pyridoxyl-tryptophan in inhibiting proliferation of the parasite can be explained by differences in binding of *Pf*ODC as indicated by the molecular modeling studies.

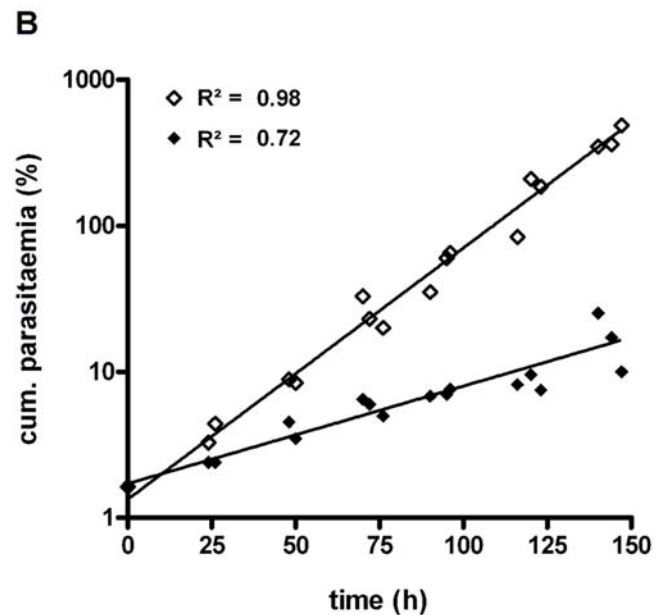
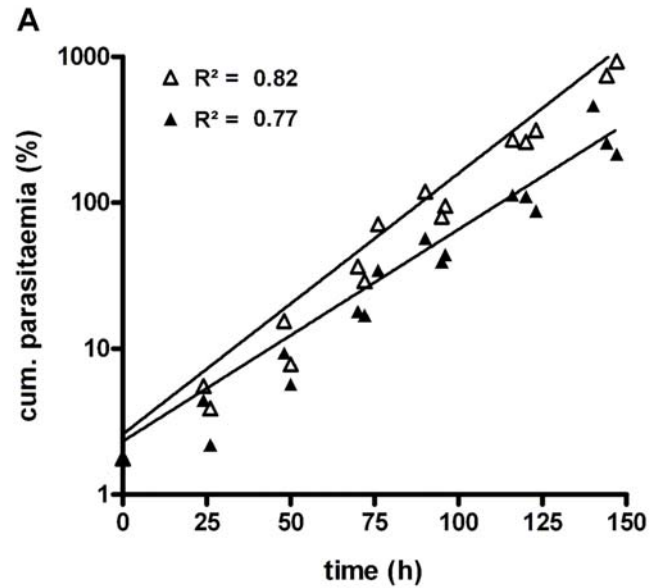


Figure 6. Effect of PT3 on the growth of transgenic *P. falciparum*. A) Wild-type as control (triangle) and B) *PfPdxK*-strep overexpressing cells (diamond) were cultured with (filled) and without (open) 7 μ M PT3 for 150 h. Cumulative parasitaemias were calculated by extrapolation from observed parasitaemias and the corresponding dilution factors that were employed at each sub-culturing step. The data consist of three independent monitorings plotted on a semi-logarithmic scale with exponential regression shown as trend lines with respective R^2 -values.

doi:10.1371/journal.pone.0004406.g006

The selective inhibition profile for proliferation achieved with PT3 - IC_{50} of 14 μ M for *P. falciparum* (Figure 3) and $IC_{50} > 100 \mu$ M for human cells (Table 2) - suggests that the approach of poisoning *Plasmodium* with PLP-mimicking compounds holds considerable promise. Further studies will be required to show whether, besides ODC, additional plasmodial enzymes are effectively targeted and to improve the prodrugs by appropriate structural modifications.

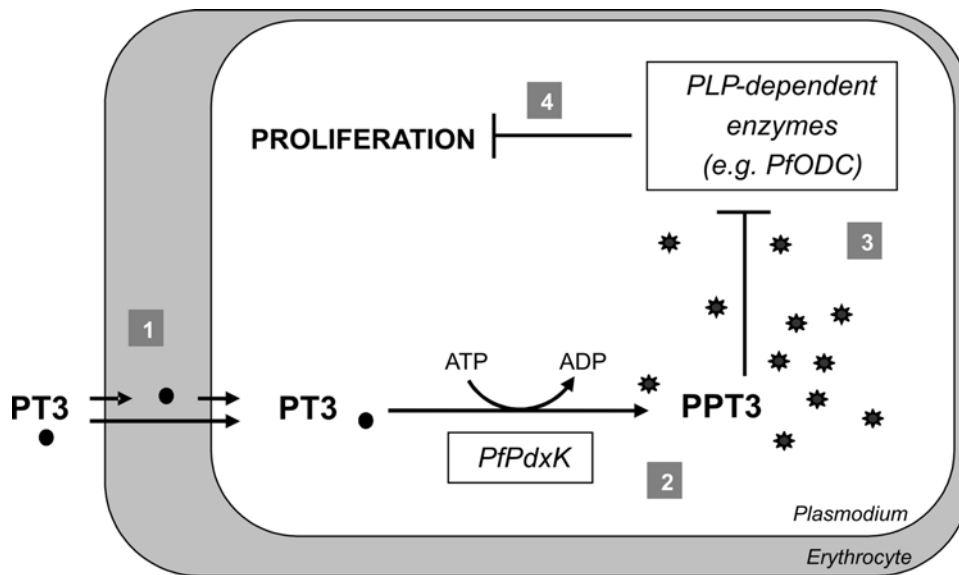


Figure 7. Schematic action of PT3. 1) Uptake of PT3 occurs either via a parasite specific transport system directly into the parasite or indirectly via the host cytosol where PT3 might be phosphorylated and dephosphorylated by the human enzymes, PdxK and pyridoxal phosphatase, respectively. 2) Activation of PT3 upon phosphorylation by *PfPdxK* leads to an accumulation of the compound as PPT3 in the cell. 3) PPT3 competes with PLP for binding in the active site of *PfODC* or other PLP-dependent enzymes. 4) Inhibition of crucial PLP-dependent enzymes, such as ODC, results in growth arrest.

doi:10.1371/journal.pone.0004406.g007

Materials and Methods

Materials

Restriction enzymes and ligase were purchased from New England Biolabs, USA. Oligonucleotides were from Operon, Germany. Strep-Tactin-Sepharose, anhydrotetracycline and dethiobiotin were from IBA (Institut für Bioanalytik, Germany). Radioactive compounds: [^3H]-hypoxanthine, [$\gamma\text{-}^{33}\text{P}$]-ATP and [^{14}C]-L-ornithine were from GE Healthcare, Germany. All other chemicals were from Sigma, Germany, unless otherwise stated.

Enzyme assays

Recombinant expression using an anhydrotetracycline inducible system and affinity purification via strep tag of the plasmodial PdxK as well as the bifunctional *P. falciparum* AdoMetDC/ODC were carried out as described previously [30]. The enzyme assay of the *PfPdxK* was performed in 70 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, containing either 200 μM pyridoxine according to Wrenger et al. [17] or up to 200 μM of the non-phosphorylated pyridoxyl-adducts (PHME, PT5 and PT3), 5 mM MgCl_2 , 500 μM (2 μCi ^{33}P) ATP as well as 2.5 μg protein in a total volume of 100 μl . The reaction took place at 37°C for 1 h. The data were analyzed using GraphPad Prism 4.0. *PfODC* activity was assayed as described [26] by measuring the formation of $^{14}\text{CO}_2$ from [^{14}C]-L-ornithine at 37°C. The standard assay contained, in a final volume of 250 μl : 40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 10 μM pyridoxal 5-phosphate, 100 μM (125 nCi ^{14}C) L-ornithine and 2 μg recombinant *PfODC*/AdoMetDC. The reaction occurred at 37°C for 30 min. The inhibitory effect, expressed as the IC_{50} -value, of the phosphopyridoxyl-adducts (PPHME and PPT5) was determined at concentrations of 50, 100 and 200 μM .

Molecular modeling

The model structure of *PfODC* together with bound PLP and DFMO [31] was obtained from the protein data bank (<http://www.rcsb.org>, PDB code: 1M9V).

The active site model of *PfODC* with PPT3 and PPT5 was generated on the basis of the known 3D coordinates of the complex of *PfODC* with PLP-DFMO followed by energy minimization with the InsightII/Built module (steepest descents, up to a maximum derivative of 20 kcal/mol, consistent valence force field, CVFF). The structures were further optimized by energy minimization using the InsightII/Discover module (conjugation gradient, until a maximum derivative of 0.01 kcal/mol was reached, CVFF) according to Wu et al. [14].

Inhibition assays on cultured *P. falciparum* and mammalian cells

P. falciparum 3D7-strain was maintained in continuous culture according to Trager and Jensen as modified [23]. The parasites were grown in human erythrocytes (O+), RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM HEPES, 20 mM sodium bicarbonate and 0.5% AlbuMAX II (Invitrogen, Germany) at 4% hematocrit. The cells were cultivated in 90 mm Petri dishes (Nunc, Denmark) and incubated at 37°C in presence of 90% N_2 , 5% O_2 and 5% CO_2 . The impact of deoxyhypoxanthine and the pyridoxyl-adducts PHME, PT5 and PT3 on the erythrocytic stages of *P. falciparum* was determined by using the [^3H]-hypoxanthine incorporation assay as described [23] and the IC_{50} -value of PT3 was calculated from sigmoidal inhibition curves using GraphPad Prism 4.0. Additionally, 50 and 100 μM PT3 was tested against human cell lines RD and A 549 as well as the rhesus monkey cells FRHK 4 cultured in DMEM complete medium (PAA Laboratories, Austria) containing 7.5% FCS (Invitrogen) at 5% CO_2 for 48 h at 37°C in 96 well plates. Cell viability was determined by incorporation of [^3H]-hypoxanthine as described above using 10000 cells per well. To analyze the long term effect of PT3 on the PdxK-overexpressing and wild-type parasites, growth rates were monitored for several days by light microscopy of Giemsa-stained thin smears with a starting parasitaemia between 1 and 2%. Growth curves were generated with GraphPad Prism 4.0 using an exponential equation to calculate the slopes.

Generating transgenic parasites

To overexpress the plasmodial PdxK in the parasite as a strep tag II (strep) fusion protein or as a *PfPdxK*-GFP chimera, two constructs were generated carrying *pfpdxk* fused to C-terminal strep or GFP, respectively. The open reading frame of *pfpdxk* was amplified by PCR from gDNA using the Expand Long Template PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Germany) and the specific oligonucleotides *PfPdxK*-pARL-kpn-S (sense) 5'-GAGAGGTACCATGAAGAAG-GAAAATATTATCTCC-3' and *PfPdxK*-strep-avr-AS (antisense) 5'-GAGACCTAGGCTATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCC AAGCGCTAAAAAACAGGCTCTTCTTTAATTAATAATTC-3' for the strep (underlined) fusion protein and *PfPdxK*-pARL-avr-AS (antisense) 5'-GAGACCTAGGAAAAAACAGGCTCTTCTTTAATTAATAATTC-3' for the *PfPdxK*-GFP chimera to obtain a 1451 bp or 1484 bp fragment, respectively, comprising the full *pfpdxk* ORF without the stop codon and with strep, respectively. The fragments were cloned into pARL1a- [32] containing GFP with KpnI and Avr II restriction enzymes (bold) resulting in the constructs pARL-*PfPdxK*-strep and pARL-*PfPdxK*-GFP. Both constructs were confirmed by automated sequencing on an ABI 377 (Applied Biosystems Inc., Germany) and the plasmid DNA for transfection was obtained using a Maxi Prep Kit (Qiagen, Germany). Prior to transfection, parasites were synchronized with 5% sorbitol [33] and cultivated for at least one additional cycle of schizogony. Transfection was carried out by spontaneous uptake of DNA [34]. Before electroporation, 400 μ l red blood cells were washed in cytomix [35] and mixed with 100 μ g circular plasmid DNA dissolved in 30 μ l Tris-EDTA. Electroporation was performed in a 0.2 cm gap cuvette (Biorad, Germany) at 310 V and 900 μ F in an EasyJect Gene Pulser (EquiBio, Germany). Red blood cells preloaded with DNA in this way were transferred into prewarmed medium and provided with 50 μ l red blood cells infected with 10% schizonts. The next day the culture medium was supplemented with 5 nM WR99210 (Jacobus Pharmaceutical Company, USA) as the selection drug. The *PfPdxK*-strep parasites obtained were maintained in 50 nM WR99210 to induce overexpression of the *PfPdxK*-strep fusion protein.

Analysis of transgenic parasites

Wild-type and *PfPdxK*-strep overexpressing parasites were separated from the host cell with saponin [36] and kept at

-20°C for protein isolation or resuspended in Trizol (Invitrogen) for RNA extraction according to the manufacturer's instructions; 25 μ g total RNA were analyzed by northern blotting [37] using a radiolabeled *pfpdxk*-probe. Total plasmodial protein extract was obtained by boiling the parasites at 95°C for 5 min in an SDS- and mercaptoethanol-containing buffer. Equal amounts (15 μ g) were separated on 10% SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schüll, Germany). Expression of *PfPdxK*-GFP and of *PfPdxK*-strep was analyzed using either a polyclonal anti-GFP antibody (1:1000 and 1:2000; Invitrogen) or a monoclonal anti-strep antibody (1:5000; IBA) and HRP-coupled secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies (1:10000; Invitrogen, Germany), respectively. The blot was stripped and reprobed with a polyclonal antibody against plasmodial thiamine pyrophosphokinase (TPK) (1:10000; [38]) and the secondary anti-rabbit HRP coupled antibody (1:10000, Dianova, Germany). The detection was performed using ECL (Millipore, Germany). The green fluorescence of the *PfPdxK*-GFP chimera was detected and captured in live cells using a Zeiss Axioskop 2 and the OpenLab software (Improvision, Germany). The parasite's nuclei were visualized with 0.2 μ g/ml Hoechst 33342 dye (Invitrogen, Germany).

Supporting Information

Text S1

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004406.s001 (0.02 MB DOC)

Acknowledgments

The authors would like to thank John Hyde (University of Manchester) for constructive comments and corrections and Klaus Grywna (Department of Virology) for the provision of the mammalian cell lines. WR99210 was a kind gift of Jacobus Pharmaceutical Company.

Author Contributions

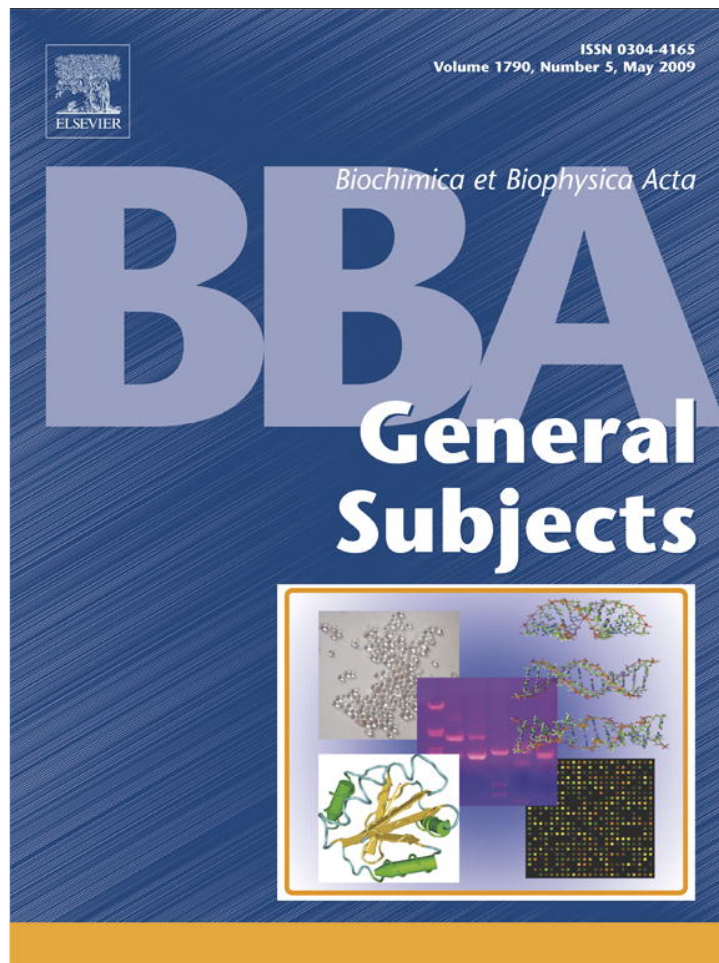
Conceived and designed the experiments: IBM FW RDW HG CW. Performed the experiments: IBM FW BB JK CW. Analyzed the data: IBM FW BB JK RDW HG CW. Contributed reagents/materials/analysis tools: IBM FW RDW HG CW. Wrote the paper: IBM FW RDW HG CW.

References

- Percudani R, Peracchi A (2003) A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep* 4: 850–854.
- Amadasi A, Bertoldi M, Contestabile R, Bettati S, Cellini B, et al. (2007) Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. *Curr Med Chem* 14: 1291–1324.
- Storici P, De Biase D, Bossa F, Bruno S, Mozzarelli A, et al. (2004) Structures of gamma-aminobutyric acid (GABA) aminotransferase, a pyridoxal 5'-phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with gamma-ethynyl-GABA and with the antiepilepsy drug vigabatrin. *J Biol Chem* 279: 363–373.
- Stamper GF, Morollo AA, Ringe D (1998) Reaction of alanine racemase with 1-aminoethylphosphonic acid forms a stable external aldimine. *Biochemistry* 37: 10438–10445.
- Noda M, Kawahara Y, Ichikawa A, Matoba Y, Matsuo H, et al. (2004) Self-protection mechanism in D-cycloserine-producing *Streptomyces lavendulae*. Gene cloning, characterization, and kinetics of its alanine racemase and D-alanyl-D-alanine ligase, which are target enzymes of D-cycloserine. *J Biol Chem* 279: 46143–46152.
- Pegg AE, Shantz LM, Coleman CS (1995) Ornithine decarboxylase as a target for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 22: 132–138.
- Wang CC (1995) Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 93–127.
- Seiler N, Raul F (2005) Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* 9: 623–642.
- Casero RA Jr, Marton LJ (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6: 373–390.
- Muller IB, Das Gupta R, Luersen K, Wrenger C, Walter RD (2008) Assessing the polyamine metabolism of *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Mol Biochem Parasitol* 160: 1–7.
- Eliot AC, Kirsch JF (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem* 73: 383–415.
- Heller JS, Canellakis ES, Bussolotti DL, Coward JK (1975) Stable multisubstrate adducts as enzyme inhibitors. Potent inhibition of ornithine decarboxylase by N-(5'-phosphopyridoxyl)-ornithine. *Biochim Biophys Acta* 403: 197–207.
- Wu F, Grossenbacher D, Gehring H (2007) New transition state-based inhibitor for human ornithine decarboxylase inhibits growth of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 6: 1831–1839.
- Wu F, Yu J, Gehring H (2008) Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase. *Faseb J* 22: 890–897.
- Fonda ML, Harker CW (1982) Metabolism of pyridoxine and protein binding of the metabolites in human erythrocytes. *Am J Clin Nutr* 35: 1391–1399.
- Gao GJ, Fonda ML (1994) Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B6 phosphatase from human erythrocytes. *J Biol Chem* 269: 7163–7168.
- Wrenger C, Eschbach ML, Muller IB, Warnecke D, Walter RD (2005) Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 280: 5242–5248.
- Gengenbacher M, Fitzpatrick TB, Raschle T, Flicker K, Sinning I, et al. (2006) Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem* 281: 3633–3641.

19. Muller IB, Knockel J, Groves MR, Jordanova R, Ealick SE, et al. (2008) The assembly of the plasmidial PLP synthase complex follows a defined course. *PLoS ONE* 3: e1815.
20. Scott TC, Phillips MA (1997) Characterization of *Trypanosoma brucei* pyridoxal kinase: purification, gene isolation and expression in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 88: 1–11.
21. Platzer EG, Kassis JA (1978) Pyridoxine kinase in *Plasmodium lophurae* and duckling erythrocytes. *J Protozool* 25: 556–559.
22. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, et al. (2002) Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis* 2: 564–573.
23. Das Gupta R, Krause-Ihle T, Bergmann B, Muller IB, Khomutov AR, et al. (2005) 3-Aminoxy-L-aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2857–2864.
24. Friedrich W (1988) *Vitamins*. Berlin: Walter de Gruyter. pp 1060.
25. Divo AA, Geary TG, Davis NL, Jensen JB (1985) Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *J Protozool* 32: 59–64.
26. Muller S, Da'dara A, Luersen K, Wrenger C, Das Gupta R, et al. (2000) In the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* 275: 8097–8102.
27. Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P, Pegg AE (1992) Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J Biol Chem* 267: 150–158.
28. Grishin NV, Osterman AL, Brooks HB, Phillips MA, Goldsmith EJ (1999) X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: the native structure and the structure in complex with alpha-difluoromethylornithine. *Biochemistry* 38: 15174–15184.
29. Khomutov RM, Dixon HB, Vdovina LV, Kirpichnikov MP, Morozov YV, et al. (1971) N-(5'-phosphopyridoxyl)glutamic acid and N-(5'-phosphopyridoxyl)-2-oxopyrrolidine-5-carboxylic acid and their action on the apoenzyme of aspartate aminotransferase. *Biochem J* 124: 99–106.
30. Wrenger C, Luersen K, Krause T, Muller S, Walter RD (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.
31. Birkholtz L, Joubert F, Neitz AW, Louw AI (2003) Comparative properties of a three-dimensional model of *Plasmodium falciparum* ornithine decarboxylase. *Proteins* 50: 464–473.
32. Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, et al. (2004) Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol* 270: 263–276.
33. Lambros C, Vanderberg JP (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65: 418–420.
34. Deitsch K, Driskill C, Welles T (2001) Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res* 29: 850–853.
35. van den Hoff MJ, Moorman AF, Lamers WH (1992) Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res* 20: 2902.
36. Umlas J, Fallon JN (1971) New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *Am J Trop Med Hyg* 20: 527–529.
37. 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: 311–315.
38. Eschbach ML, Muller IB, Gilberger TW, Walter RD, Wrenger C (2006) The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* expresses an atypical N-terminally extended pyrophosphokinase with specificity for thiamine. *Biol Chem* 387: 1583–1591.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

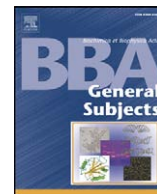
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Mobility of the conserved glycine 155 is required for formation of the active plasmodial Pdx1 dodecamer

Julia Knöckel^{a,1}, Rositsa Jordanova^b, Ingrid B. Müller^a, Carsten Wrenger^a, Matthew R. Groves^{b,*}

^a Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Department of Biochemistry, Bernhard Nocht Strasse 74, D-20359 Hamburg, Germany

^b European Molecular Biology Laboratory, Hamburg Outstation, Notkestrasse 85, D-22603 Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2008
Received in revised form 19 February 2009
Accepted 23 February 2009
Available online 9 March 2009

Keywords:

Malaria
Pdx1 assembly
Static light scattering
Circular dichroism
Vitamin B6 biosynthesis

ABSTRACT

Background: Vitamin B6 synthesis requires a functional Pdx1 assembly that is dodecameric *in vivo*. We have previously shown that mutation of a catalytic lysine in the plasmodial Pdx1 protein results in a protein that is both inactive and hexameric *in vitro*.

Methods: Static and dynamic light scattering, circular dichroism, co-purification and enzyme assays are used to investigate the role of a glycine conserved in all Pdx1 family members.

Results: Static light scattering indicates that a glycine to alanine mutant is present as a hexamer *in vitro*. Subsequent circular dichroism experiments demonstrate that a significant change in secondary structure content is induced by this mutation. However, this mutant is still competent to bind and support Pdx2 activity. **Conclusions:** As the mutated glycine occupies an unrestricted region of the Ramachandran plot the additional stereo-chemical restrictions imposed on alanine residues strongly support our hypothesis that significant structural rearrangement of Pdx1 is required during the transition from hexamer to dodecamer.

General significance: The presented results demonstrate that reduction in the mobility of this region in Pdx1 proteins is required for formation of the *in vivo* dodecamer, negatively affecting the activity of Pdx1, opening the possibility of allosteric Pdx1 inhibitors.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The active form of vitamin B6 is pyridoxal 5-phosphate, which is an essential enzyme cofactor in all organisms [1]. Humans depend upon dietary uptake of vitamin B6, whereas fungi, bacteria and plants synthesise PLP *de novo* [2–6]. The apicomplexan parasites *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* have recently been shown to possess a functional vitamin B6 biosynthesis pathway [7–9]. This pathway is a promising drug target, as it is absent in humans and the novelty of the target reduces the probability of latent drug resistance and cross-interaction of inhibitors with the host.

Vitamin B6 is synthesised by a complex that consists of two enzymes: Pdx1 and Pdx2. Biochemical analysis demonstrated that the Pdx1:Pdx2 complex functions as a glutamine amidotransferase with Pdx2 as the glutaminase domain and Pdx1 as the pyridoxal-5-phosphate synthase domain, utilizing the substrates ribose 5-

phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate and ammonia. Pdx2 exhibits glutaminase activity (providing ammonia to Pdx1 for the formation of the active cofactor PLP) only in the presence of Pdx1 [5,7,10]. Crystal structures are available for both Pdx1 and Pdx2 from various organisms [8,11–14] showing that Pdx1 assembles into a dodecamer, decorated by twelve Pdx2 molecules [13,14].

We recently demonstrated that the mutation of a conserved active site lysine of *Pf*Pdx1 (Supplementary Fig. 1; K151) results not only in an inactive protein, but is also deficient in assembly, forming hexamers *in vitro* [15]. However, this hexameric *Pf*Pdx1 is still able to bind and support *Pf*Pdx2 activity. The conserved lysine residue is distal from the Pdx1 intersubunit interfaces in the available dodecameric crystal structures [13,14]. Thus, we had previously suggested that residues in this region undergo a structural rearrangement as the *Pf*Pdx1 hexamers associate into the native dodecamer [15].

The sequence immediately proximal to *Pf*Pdx1 K151 contains a conserved glycine residue that occupies an unrestricted region of the Ramachandran plot [16] in all currently available Pdx1 structures. When a homology model of *Pf*Pdx1 is requested from the SWISS-MODEL server [17] this conserved glycine (G155) occupies the left handed alpha region (ϕ/ψ 67°/35°; model included as Supplementary data). Analysis of this residue in the available crystal structures indicates that there is no stereo-chemical or structural reason that it

Abbreviations: CD, circular dichroism; DLS, dynamic light scattering; *Pf*Pdx1 or *Pf*Pdx2, *P. falciparum* Pdx1 or Pdx2, PLP, pyridoxal 5-phosphate; SLS, static light scattering

* Corresponding author. Tel.: +49 40 89902 161; fax: +49 40 89902 149.

E-mail address: groves@embl-hamburg.de (M.R. Groves).

¹ Part of this work was conducted in partial fulfillment of the requirement for a Ph.D. from the University of Hamburg.

could not be replaced by another small, hydrophobic side chain (such as alanine).

In this manuscript we report the investigation of the role of G155 by mutagenesis. We demonstrate by biophysical techniques that Pfpdx1 G155A is present as a hexamer *in vitro* and is inactive. However, this hexameric mutant is still able to bind and support the activity of Pfpdx2. Secondary structural analysis by circular dichroism demonstrates a change in the α -helical content of the mutant – clearly indicating that significant structural rearrangement is required from the hexameric to dodecameric state.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Restriction enzymes and ligase were purchased from New England Biolabs, USA and oligonucleotides from Operon, Germany. The cloning vector pASK-IBA3, Strep-Tactin-Sepharose, anhydrotetracycline and desthiobiotin from IBA (Institut für Bioanalytik, Germany). All other chemicals were from Sigma, Germany.

2.2. Expression and purification of Pfpdx1 and Pfpdx2

E. coli BLR (DE3) (Stratagene, Germany) were transformed with *P. falciparum* Pdx1 or Pdx2 cloned into the expression vector pASK-IBA3 [7]. Expression was induced at A₆₀₀ 0.5 with 200 ng ml⁻¹ anhydrotetracycline and the cells were grown for 4 h at 37 °C before harvesting. The Strep-Tag fusion protein was purified according to the manufacturer's recommendation (IBA). The concentration of the purified recombinant protein was determined pursuant to Bradford [18].

2.3. Oligonucleotides and site-directed mutagenesis of Pfpdx1 and Pfpdx2

Oligonucleotides were designed to replace glycine 144, 152 and 155 of Pfpdx1 (Supplementary Table 1). Mutagenesis was performed as described [15] and verified by sequencing (MWG, Germany).

2.4. Enzyme activity measurements

The glutaminase activity of Pfpdx2 was assayed in two steps, according to [5,7], by measuring the formation of glutamate, which is subsequently converted to 2-oxoglutarate by glutamate dehydrogenase with acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD) as co-substrate. As Pfpdx2 activity requires the formation of the Pfpdx1:Pfpdx2 complex [7] both enzymes were mixed in an equimolar ratio (total amount 30 μ g). Alternatively the activity of Pfpdx2 was analysed by a coupled fluorescence assay with minor modification as described by [19]. Both plasmidial enzymes were mixed in an equimolar ratio (total amount 15 μ g).

The assay was performed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 in the presence of 10 mM glutamine, 0.5 units horseradish peroxidase (Sigma), 5 units glutamate dehydrogenase, 100 μ M NADP, 500 nM Amplex Red (Invitrogen) and recombinant *Staphylococcus aureus* NADP-Oxidase [20] in a total volume of 1000 μ l at 37 °C for 10 min. Subsequently the fluorescence of the synthesised resurofin was determined by an excitation wavelength of 590 nm and an emission wavelength of 605 nm.

PLP Synthesis reactions requiring both Pfpdx1 and Pfpdx2 were performed in the presence of the substrates 0.5 mM ribose 5-phosphate, 1 mM glyceraldehyde 3-phosphate and 10 mM glutamine in a buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 150 mM NaCl. PLP biosynthesis by Pfpdx1 alone was carried out with 10 mM ammonium chloride instead of glutamine [10,21]. Alternatively, Pfpdx1 activity was measured in a fluorescence assay according to Sharma [22], in a total volume of 1 ml containing 100 mM potassium phosphate, pH 8.0. After incubation of the reaction for 30 min at 37 °C 200 μ l of 100 mM

K₂HPO₄, pH 8.0, and 5.26 mM NaHSO₃ were added and the formation of PLP was measured at an excitation wavelength of 328 nm and an emission wavelength of 393 nm.

2.5. Co-purification of Pfpdx1 and Pfpdx2HIS

For co-purification experiments, the Strep-Tag of Pfpdx2 was exchanged into a 6 \times HIS-Tag by PCR [15]. The proteins were expressed as described above. After sonication and centrifugation, the expression supernatants of the respective Pfpdx1 wild-type or mutant proteins were combined with the supernatants of Pfpdx2HIS expression. Proteins were co-purified and visualized by immunodetection employing a monoclonal Strep-tag II antibody (IBA) and secondary anti-mouse horseradish peroxidase labelled goat antibody (BioRad, Germany) or HIS-Probe-HRP reagent (Pierce, USA) as described in [15].

2.6. Determination of Pfpdx1 oligomeric state

In order to investigate the oligomeric state of Pfpdx1, the strep-tagged protein was purified as described above and protein concentrations were measured at A₂₈₀, using a Pfpdx1 absorption coefficient of 19,855 cm⁻¹ M⁻¹. Subsequently 100 μ g of Pfpdx1 were applied to a Superdex 200 10/30 column (GE Healthcare) equilibrated in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl. A miniDAWN Tristar (Wyatt Technologies, USA) was connected immediately downstream of the separation media and used to collect static light scattering (SLS) data [15,23]. The SLS data was analysed using the package ASTRA (Wyatt Technologies, USA). Peak fractions of both wild-type and G155A Pfpdx1 were analysed by dynamic light scattering (DLS) after elution using a DynaPro 99 and the manufacturers recommended software.

2.7. Circular dichroism (CD) experiments

CD spectra were recorded in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0 at 20 °C, using a Jasco J-810 automatic recording CD spectropolarimeter with a thermostatically controlled cell holder. Protein concentrations were determined as described above. The spectra, measured in the 190–240 nm far UV-region, are averages of three scans and were corrected by subtracting the baseline of the buffer and are reported as mean residue molar ellipticity ([θ]_R). An average residue molecular mass of 110 Da was used in calculations. Data analysis was carried out with SELCON3 [24] and CONTINLL [25,26] at the DichroWeb server [27,28], using protein reference set 4 [29,30].

3. Results

Our previous results indicated that K151 plays a role in the assembly of two Pfpdx1 hexameric crowns into a dodecamer [15]. As K151 is distal from the subunit interfaces of the final Pfpdx1 structure we proposed that this region undergoes structural rearrangement during the formation of the dodecamer. K151 is flanked by a number of conserved glycine residues [31] and it is reasonable to expect that mutation of these glycines will result in a significantly less flexible molecule. Indeed, when glycine residues G144, G152 and G155 were individually exchanged to proline by site-directed mutagenesis the expressed Pfpdx1 mutants were insoluble, probably due to misfolding (data not shown). Subsequently, these glycine residues were substituted by alanine resulting in the mutants Pfpdx1 G144A, Pfpdx1 G152A and Pfpdx1 G155A. Although Pfpdx1 G144A was insoluble, Pfpdx1 G152A and G155A were solubly expressed.

3.1. Static and dynamic light scattering

The Pfpdx1 G152A and Pfpdx1 G155A mutant proteins were analysed by SLS. While analysis of the SLS data indicated the presence of aggregates for the Pfpdx1 G152A mutant (Mw > 3 MDa;

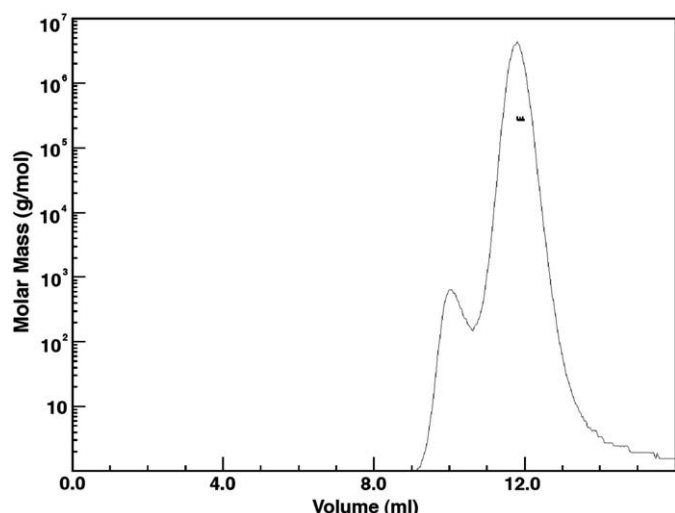


Fig. 1. Static light scattering measurement of the *in vitro* molecular mass of *PfPdx1* G155A. Size exclusion chromatography was performed with *PfPdx1* G155A (UV absorption chromatogram in black) and the *in vitro* mass measured as described in [Materials and methods](#). The measured molecular mass of *PfPdx1* G155A is 220 ± 8 kDa, in good agreement with a *PfPdx1* hexamer.

data not shown), the *in vitro* molecular mass of *PfPdx1* G155A was measured as 220 ± 8 kDa, consistent with a *PfPdx1* hexamer ([Fig. 1](#)). Wild-type and G155A *PfPdx1* proteins were also analysed by DLS, with observed hydrodynamic radii of 3.9 nm (σ 0.5 nm) and 4.8 nm (σ 1.2 nm), respectively.

3.2. Circular dichroism

In order to determine the effect of the mutations upon *PfPdx1* secondary structure CD experiments were performed. The CD spectra of *PfPdx1* wild-type and G155A mutant were found to be significantly different ([Fig. 2](#)). Analysis with SELCON3 [24] and CONTINLL [25,26] indicate the presence 51–55% α -helices and 9–10% β -strands in wild-type *PfPdx1*, in good agreement with the *PfPdx1* model ([Supplementary data](#); 48% α -helices, 12% β -strands). However, CD analysis of *PfPdx1* G155A revealed the presence of 32–33% α -helices and 17–18% β -strands. Similar values were obtained for *PfPdx1* K151A mutant (data not shown) that we have previously shown to be a hexamer *in vitro* [15]. This hexameric form of *PfPdx1* was also shown to bind and support *PfPdx2* activity.

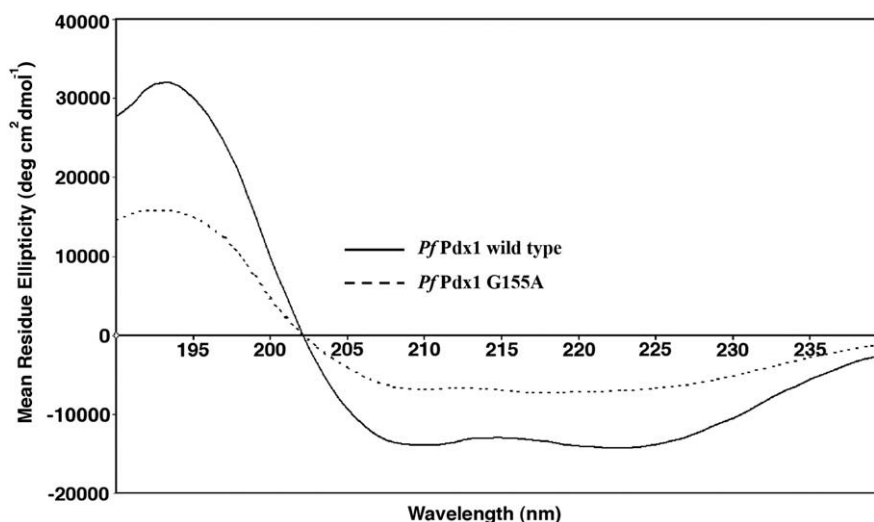


Fig. 2. Circular dichroism spectra of *PfPdx1* wild-type and *PfPdx1* G155A. Circular dichroism spectra of *PfPdx1* wild-type (black) and *PfPdx1* G155A (dotted) were recorded and analysed as described. The differences in the spectra indicate a significant change in secondary structural content of *PfPdx1* upon mutagenesis of the conserved G155 to alanine.

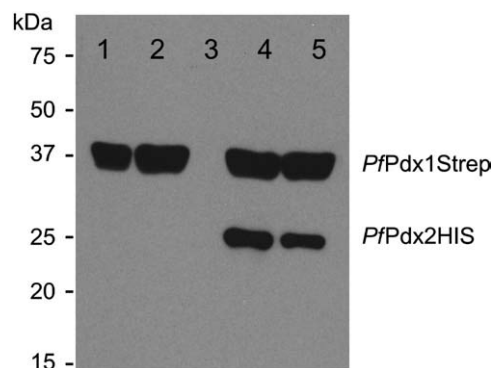


Fig. 3. Western blot analysis of *PfPdx1* and *PfPdx2HIS* proteins. Cell homogenates of recombinantly expressed *PfPdx1* and *PfPdx2HIS* were mixed and subsequently purified via Strep-tag affinity chromatography of the *PfPdx1* protein. Co-purification was visualized by Western blot analysis of the *PfPdx1* wild-type (4) and the *PfPdx1* G155A mutant (5) with the *PfPdx2HIS*. As a control *PfPdx1* wild-type (WT) (1), *PfPdx1* G155A mutant (2) and *PfPdx2HIS* (3) were purified via Strep-tag affinity chromatography and visualized by Western blot analysis.

3.3. Analysis of *PfPdx1* G155A:*PfPdx2* interaction and enzymatic activity

Co-purification experiments were performed to determine whether *PfPdx1* G155A mutant binds *PfPdx2*. Western blot analysis clearly demonstrated co-purification of *PfPdx2HIS* with both the wild-type control and *PfPdx1* G155A ([Fig. 3](#)). While assays revealed that *PfPdx1* G155A was inactive, *PfPdx2* enzymatic activity is unimpaired by the G155A mutation ([Table 1](#)).

4. Discussion

The results presented demonstrate that assembly of plasmodial PLP synthetase into the native dodecamer is dependent on the mobility of G155. While this residue is conserved in all Pdx1 homologs ([Fig. 1](#) and model, [Supplementary data](#)) an analysis of available structures indicates no backbone stereo-chemical restraints on G155 that preclude its replacement by another amino acid. Substitution of G155 and the other nearby glycine residues G144 and G152 with proline results in insolubly expressed proteins, which we interpret as loss of the wild-type fold. However, the G155A mutant is able to form hexamers ([Fig. 1](#)) as well as bind and support *PfPdx2* activity ([Fig. 3](#)). This indicates that both the *PfPdx1*:*PfPdx1* and *PfPdx1*:*PfPdx2* intermolecular surfaces are correctly formed, as was previously

Table 1

A summary of the biophysical and biochemical properties of the G155A *Plasmodium falciparum* Pdx1 mutant as described in the text.

Mutations in Pfpdx1	Pfpdx1 wild-type	Pfpdx1 G155A
Secondary structure content from CD (α -helices/ β -strand; %)	55/10	33/18
SLS measure mass (kDa)	424 ± 12 ^a	220 ± 8
DLS measured hydrodynamic radius (nm)	3.9 ± 0.5	4.8 ± 1.2
Pdx2 binding	+++	+++
Specific activity of Pfpdx1 (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	746 ± 76 ^a	n.d.
Specific activity of Pfpdx2 (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Pfpdx1 + Pfpdx2)	266 ± 19 ^a	285 ± 21
Oligomeric state	Dodecamer	Hexamer

Kinetic results represent the mean values of at least three independent experiments. n.d., not detectable.

^a Values are taken from [15].

suggested for the Pfpdx1 K151 mutant [15]. However, the Pfpdx1 G155A mutant is unable to form dodecamers. The CD results show that the secondary structure of G155A is perturbed when compared to the wild-type (Fig. 2), with a loss in α -helical content and a concomitant increase in β -strand formation. Given that Pfpdx1 is still competent to form hexamers but is inactive we propose the loss in helical structure and gain in β -strand to be localized to the helices at the hexamer:hexamer interface, which also support some of the catalytic residues. The change in conformation of this region is supported by the change in hydrodynamic radius as determined by DLS (Table 1).

These findings support our hypothesis that flexibility of this region is required for assembly into the final wild-type dodecamer. To date, all attempts to delete the open reading frame of *P. falciparum* pdx1 have failed, which might indicate that Pdx1/Pdx2 function is essential for the survival of the parasite. Additionally, it was shown that transcripts of pdx1/2 are present in the blood stage of *P. falciparum* as determined by northern blotting [7]. Thus, inhibition of the final assembly stage, by small molecules or conformational antibodies, could result in a degradation or loss of function of plasmodial PLP synthesis and provide a novel therapeutic approach against malarial infection. An *in vivo* analysis of the effect of Pfpdx1 hexamer formation in cultured parasites and structural studies on the Pfpdx1 G155A mutant is underway.

Acknowledgements

The authors thank Ms Julia Abe for excellent technical assistance. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant WR 124/2.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbagen.2009.02.016.

References

- [1] R. Percudani, A. Peracchi, A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes, *EMBO reports* 4 (2003) 850–854.
- [2] M. Ehrenshaft, P. Bilski, M.Y. Li, C.F. Chignell, M.E. Daub, A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 9374–9378.
- [3] A.H. Osmani, G.S. May, S.A. Osmani, The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 23565–23569.
- [4] B.R. Belitsky, Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for de novo pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 1191–1196.

- [5] Y.X. Dong, S. Sueda, J. Nikawa, H. Kondo, Characterization of the products of the genes SNO1 and SNZ1 involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 745–752.
- [6] M. Tambasco-Studart, O. Titiz, T. Raschle, G. Forster, N. Amrhein, T.B. Fitzpatrick, Vitamin B6 biosynthesis in higher plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 13687–13692.
- [7] C. Wrenger, M.L. Eschbach, I.B. Muller, D. Warnecke, R.D. Walter, Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5242–5248.
- [8] M. Gengenbacher, T.B. Fitzpatrick, T. Raschle, K. Flicker, I. Sinning, S. Muller, P. Macheroux, I. Tews, B. Kappes, Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3633–3641.
- [9] J. Knöckel, I.B. Muller, B. Bergmann, R.D. Walter, C. Wrenger, The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate de novo, *Mol. Biochem. Parasitol.* 152 (2007) 108–111.
- [10] K.E. Burns, Y. Xiang, C.L. Kinsland, F.W. McLafferty, T.P. Begley, Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 3682–3683.
- [11] J.A. Bauer, E.M. Bennett, T.P. Begley, S.E. Ealick, Three-dimensional structure of YaeE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5'-phosphate biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 2704–2711.
- [12] J. Zhu, J.W. Burgner, E. Harms, B.R. Belitsky, J.L. Smith, A new arrangement of (beta/alpha)₈ barrels in the synthase subunit of PLP synthase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27914–27923.
- [13] F. Zein, Y. Zhang, Y.N. Kang, K. Burns, T.P. Begley, S.E. Ealick, Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*, *Biochemistry* 45 (2006) 14609–14620.
- [14] M. Strohmeier, T. Raschle, J. Mazurkiewicz, K. Rippe, I. Sinning, T.B. Fitzpatrick, I. Tews, Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 19284–19289.
- [15] I.B. Muller, J. Knöckel, M.R. Groves, R. Jordanova, S.E. Ealick, R.D. Walter, C. Wrenger, The assembly of the plasmodial PLP synthase complex follows a defined course, *PLoS ONE* 3 (2008) e1815.
- [16] G.N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *J. Mol. Biol.* 7 (1963) 95–99.
- [17] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (2006) 195–201.
- [18] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [19] K.E. McElroy, P.J. Bouchard, M.R. Harpel, K.Y. Horiuchi, K.C. Rogers, D.J. Murphy, T.D. Y. Chung, R.A. Copeland, Implementation of a continuous, enzyme-coupled fluorescence assay for high-throughput analysis of glutamate producing enzymes, *Anal. Biochem.* 284 (2000) 382–387.
- [20] K. Streker, C. Freiberg, H. Labischinski, J. Hacker, K. Ohlsen, *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 2249–2256.
- [21] T. Raschle, N. Amrhein, T.B. Fitzpatrick, On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 32291–32300.
- [22] S.K. Sharma, K. Dakshinamurti, Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in biological samples, *J. Chromatogr.* 578 (1992) 45–51.
- [23] A. Geerlof, J. Brown, B. Coutard, M.P. Eglhoff, F.J. Enguita, M.J. Fogg, R.J. Gilbert, M.R. Groves, A. Haouz, J.E. Nettleship, P. Nordlund, R.J. Owens, M. Ruff, S. Sainsbury, D.I. Svergun, M. Wilmanns, The impact of protein characterization in structural proteomics, *Acta crystallographica* 62 (2006) 1125–1136.
- [24] N. Sreerama, R.W. Woody, A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism, *Anal. Biochem.* 209 (1993) 32–44.
- [25] S.W. Provencher, J. Glockner, Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* 20 (1981) 33–37.
- [26] I.H. van Stokkum, H.J. Spoelder, M. Bloemendal, R. van Grondelle, F.C. Groen, Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra, *Anal. Biochem.* 191 (1990) 110–118.
- [27] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* 89 (2008) 392–400.
- [28] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W668–W673.
- [29] N. Sreerama, S.Y. Venyaminov, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 243–251.
- [30] N. Sreerama, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 252–260.
- [31] D. Higgins, J. Thompson, T. Gibson, J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.