

**Analyse der „Downstream“-Effekte
von Vitamin B6 und deren Bedeutung für
*Plasmodium falciparum***

DISSERTATION

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

SABINE BUTZLOFF

aus Schwerin



Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. C. WRENGER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. S. DOBLER
Tag der Disputation: 31.Mai 2013

Hamburg, den 17. Mai 2013

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, cursive 'L' followed by a horizontal line extending to the right.

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Malaria	1
1.1.1 Verbreitung und Geschichte der Malaria	1
1.1.2 Die systematische Einordnung	2
1.1.3 Humanpathogene Arten der Gattung <i>Plasmodium</i>	3
1.1.4 Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	4
1.2 Vitamin B6	6
1.2.1 Vitamine allgemein.....	6
1.2.2 Vitamin B6	6
1.2.2 Biosynthese von Vitamin B6	8
1.3 „Downstream“-Effekte von PLP	10
1.3.1 PLP als Antioxidans	10
1.3.2 PLP als Co-Faktor	12
1.3.2.1 Allgemeiner Reaktionsmechanismus	12
1.3.2.2 PLP-abhängige Reaktionen in <i>P. falciparum</i>	13
1.4 Energie- und Kohlenhydratstoffwechsel	14
1.4.1 Energiegewinnung	14
1.4.2 Energiegewinnung bei <i>P. falciparum</i>	16
1.4.3 Kohlenhydratmetabolismus	17
1.4.4 Die plasmodiale Aspartat Aminotransferase (AspAT)	18
1.4.5 Die plasmodiale Malatdehydrogenase (MDH)	20
1.5 Zielsetzung	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Bezugsquellen von Chemikalien und Kits	24
2.1.2 Verwendete Geräte	27

2.1.3 Puffer und Lösungen.....	28
2.1.4 Medien für <i>E. coli</i> - und <i>Plasmodien</i> - Kulturen.....	31
2.1.5 Bakterien- und Plasmodien- Stämme und Vektoren.....	31
2.1.6 Verwendete Restriktionsenzyme.....	32
2.1.7 Verwendete Software und Datenbanken.....	33
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.2.2 Overlap-PCR (Ho <i>et al.</i> , 1989).....	34
2.2.3 „Site-directed“-Mutagenese-PCR.....	34
2.2.4 RT-PCR.....	35
2.2.5 <i>DpnI</i> -Verdau und Reinigung des PCR-Produkts.....	35
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.2.7 Isolierung von DNA aus einem Agarose-Gel.....	36
2.2.8 Restriktionsverdau.....	36
2.2.9 Ligation.....	36
2.2.10 Transformation.....	36
2.2.11 Kolonie-PCR.....	37
2.2.12 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	37
2.2.13 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	38
2.2.14 DNA-Sequenzierung.....	38
2.2.15 Präparation genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i>	38
2.2.16 Isolation von gesamtRNA aus <i>P. falciparum</i>	39
2.2.17 DNaseI-Verdau.....	39
2.2.18 Bestimmung der DNA- oder RNA- Konzentration und Reinheit.....	39
2.2.19 Reverse Transkription für qPCR.....	40
2.2.20 Quantitative real-time PCR.....	40
2.3 Biochemische Methoden.....	42
2.3.1 Rekombinante Expression.....	42
2.3.2 Co-Expression.....	42
2.3.2.1 Klonierung des pBM1-Vektors für Co-Expressionen in <i>E. coli</i>	43
2.3.3 Bakterienaufschluss zur Proteinisolation.....	44
2.3.4 Proteinaufreinigung über einen His-Tag.....	44
2.3.4.1 Regeneration der Ni-NTA.....	44
2.3.5 Proteinaufreinigung über einen Strep-Tag.....	45
2.3.6 Bestimmung der Protein-Konzentration.....	45
2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	46

2.3.8 Coomassie-Gel-Färbung.....	46
2.3.9 Western-Blot-Analyse.....	46
2.3.10 Strippen von Nitrozellulosemembranen	47
2.3.11 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	47
2.3.12 Static Light Scattering (SLS)	48
2.4 Methoden der Zellbiologie	49
2.4.1 Zellkulturführung	49
2.4.2 Zellausstriche zur Bestimmung der Parasitämie	49
2.4.3 Transfektion von <i>Plasmodium falciparum</i>	49
2.4.3.1 Transfektion von <i>Plasmodien</i> im Ringstadium	49
2.4.3.2 Elektroporation von Erythrozyten.....	50
2.4.4 Einfrieren von <i>Plasmodien</i> -Kulturen.....	50
2.4.5 Auftauen von <i>Plasmodien</i> -Stabilaten	51
2.4.6 Synchronisation der Parasiten mittels Sorbitol	51
2.4.7 IC ₅₀ Bestimmung über Einbau von radioaktivem Hypoxanthin.....	51
2.4.8 Isolation von <i>Plasmodien</i> mittels Saponin-Lyse.....	52
2.4.9 Isolation der Parasitenstadien mittels Percoll-Gradient.....	53
2.4.10 Fluoreszenzmikroskopie	53
2.4.11 Erstellen von Wachstumskurven	53
2.5 Methoden zur Analyse des Zusammenhangs von PLP und ¹O₂	54
2.5.1 Generierung des pARL-Pdx1-K83A-Strep Überexpressionskonstruktes.....	54
2.5.2 Methode der ¹ O ₂ -Detektion im Parasiten	55
2.7 Methoden zur Untersuchung der plasmodialen AspAT	56
2.7.1 AspAT-Enzymaktivität für Aspartat.....	56
2.7.2 AspAT-Enzymaktivität für Glutamat	56
2.7.3 Mutation von AspAT	57
2.7.4 Co-Expression der AspAT-WT und AspAT-CoMutante	58
2.7.5 Klonierung des Überexpressionskonstruktes der AspAT-CoMutante	59
2.8 Methoden zur Untersuchung der plasmodialen MDH	59
2.8.1 MDH – Aktivitätstest.....	59
2.8.2 Mutation der plasmodialen MDH.....	60
2.8.3 Co-Aufreinigung von MDH-WT und MDH-Mutanten	61
2.8.4 Klonierung der Überexpressionskonstrukte der MDH	62

3. ERGEBNISSE	64
3.1 Vitamin B6 und Singulett Sauerstoff in <i>Plasmodium falciparum</i>	64
3.1.1 PLP-Gehalt im Wildtyp und in dem Pdx1/Pdx2-Überexprimierer	64
3.1.2 Expression einer dominant-negativen Mutante der PLP-Synthase im Parasiten	65
3.1.2.1 Herstellung der Zelllinien 3D7-Pdx1K83A-Strep und.....	65
3D7-Pdx1K83A-Strep/Pdx2E53Y-Myc	65
3.1.2.2 Wachstumsstudien der transgenen Zelllinien unter Cercosporineinfluss.....	66
3.1.2.3 Detoxifikation von $^1\text{O}_2$ durch PLP	67
3.1.3 Methode zur Quantifizierung von Singulett Sauerstoff in <i>P. falciparum</i>	68
3.1.3.1 Ermittlung des lineareren Bereiches der $^1\text{O}_2$ -Eichkurve.....	69
3.1.3.2 Sättigungskurve für APF	70
3.1.3.3 Einteilung der Stadien nach Pixeln	71
3.1.3.4 Eichkurven	72
3.1.3.5 Endogene Konzentrationen an Singulett Sauerstoff	73
3.2 Die PLP-abhängige AspAT und die MDH	75
3.2.1 Analysen der Aspartat Aminotransferase (AspAT)	75
3.2.1.1 Enzymkinetik der Rückreaktion.....	75
3.2.1.2 Generierung und Charakterisierung inaktiver AspAT-Mutanten	77
3.2.1.3 Co-Expression von pASK-IBA3-AspAT-WT-Strep und pBM1-AspAT-CoMutante-His..	81
3.2.1.4 <i>in vivo</i> - 3D7-AspAT Überexprimierer.....	84
3.2.1.5 Analyse transgener 3D7-AspAT Zelllinien unter Mangel an Aspartat	85
3.2.2 Analysen der MDH.....	87
3.2.2.1 Bestimmung der kinetischen Konstante K_M für MDH	87
3.2.2.2 Generierung und Charakterisierung inaktiver MDH-Mutanten	88
3.2.2.3 Bindung der Wildtyp-MDH durch die Mutanten.....	91
3.2.2.4 Inaktivierung des Wildtyps durch die Mutante.....	92
3.2.2.5 Lokalisationsstudie der MDH in <i>P. falciparum</i>	94
3.2.2.6 Analyse der 3D7-MDH Überexprimierer unter Standardbedingungen.....	95
3.2.2.7 Analyse der 3D7-MDH Zelllinien unter variierenden Malat-Konzentrationen.....	96
3.2.3 AspAT- und MDH-Mutanten - co-transgene Parasiten	97
3.2.3.1 Wachstumsanalyse unter Standardbedingungen	97
3.2.3.2 qPCR Analyse der co-transgenen Parasiten	99
3.2.3.3 Analyse der co-transgenen Parasiten unter Aspartatmangel	100

4. DISKUSSION	102
4.1 Vitamin B6 - Bedeutung der <i>de novo</i> Synthese für <i>P. falciparum</i>	102
4.2 Die Bedeutung der PLP-abhängigen AspAT für <i>P. falciparum</i>	106
4.2.1 Dominant-negative Mutanten der AspAT und der MDH in <i>P. falciparum</i>	108
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	117
6. LITERATURVERZEICHNIS	119
Danksagung	131
Erklärung	132
Anhang	133

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
APAD	3-Acetylpyridin Adenin Dinukleotid
APF	3'-(p-Aminophenyl) Fluoreszein
as	antisense
AU	Arbitrary Unit (willkürliche Einheit)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSD	Blasticidin S
CDC	Centers for Disease Control
cDNA	copyDNA
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
dsDNA	doppelsträngige DNA
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Goi	Gene of Interest
h	Stunde
HABA	2-[4'-Hydroxy-benzeneazo]benzoic acid
HRP	Meerrettichperoxidase
HT-PBS	human tonicity phosphate-buffered saline
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
Kbp	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MCS	Multiple cloning site
min	Minute

mRNA	messenger RNA
n.Chr.	nach Christus
n.d.	nicht detektierbar
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PLP	Pyridoxal-5-Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Royal Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	sense
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde
SLS	Static light scattering
Tab	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIS	translation initiation site
tRNA	transfer RNA
UV	ultraviolet
V	Volt
Vol	Volumen
WHO	World Health Organization
WR	Walter Reed

1. Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Verbreitung und Geschichte der Malaria

Die Hälfte der auf der Erde lebenden Menschen ist dem Risiko einer Malaria-Infektion ausgesetzt. Zurzeit sind 104 Länder endemisch für Malaria, wobei in sechs Ländern bis zu 50 % der Infektionen mit Malaria verzeichnet werden können. Dazu zählen Nigeria, die Demokratische Republik Kongo, Tansania, Uganda, Mosambik und die Elfenbeinküste (WHO, 2012). 2010 wurden laut WHO 219 Millionen Menschen mit Malaria infiziert, von denen 660 000 starben. 90 % der Todesfälle durch Malaria, von denen die meisten Opfer Kinder unter fünf Jahren sind, treten in Afrika auf (WHO, 2012). Auf der in Abbildung 1 gezeigten Karte sind die im Jahr 2010 von Malaria betroffenen Länder abgebildet.

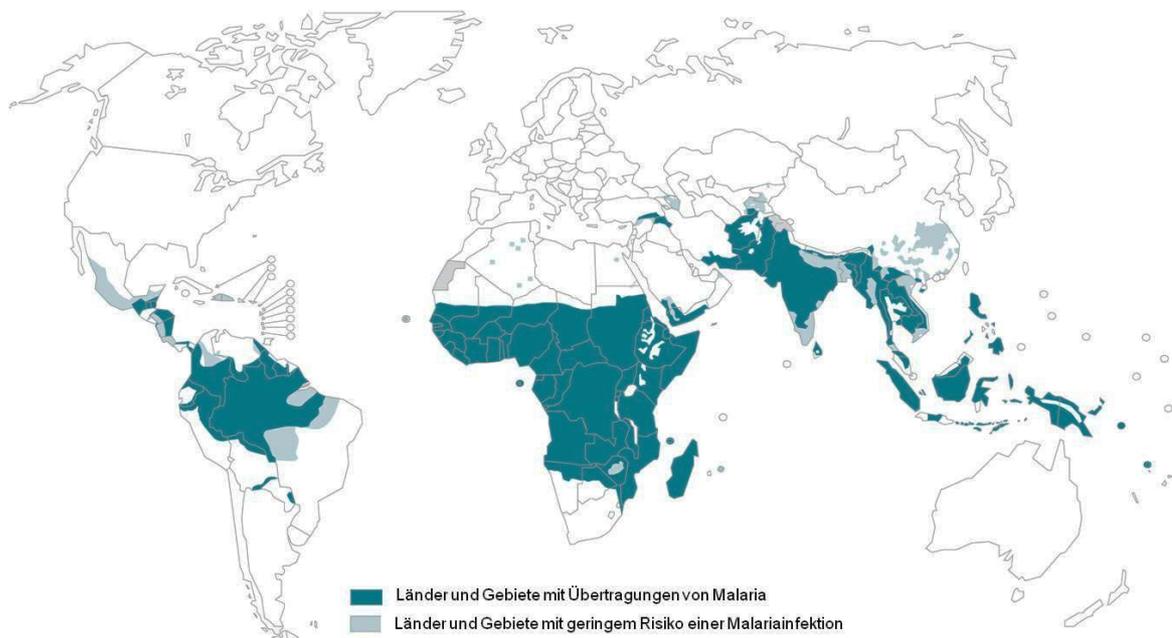


Abb. 1 Von Malaria betroffene Länder und Gebiete 2010 (WHO, 2011).

Malaria trat bereits vor 4000 Jahren auf - der Krankheitserreger wurde jedoch erst 1880 in Algerien von Alphonse Laveran beschrieben. Die Symptome der Malaria wurden schon in alten chinesischen Schriften festgehalten und bereits 340 n. Chr. wurde die fiebersenkende Wirkung von *Artemisia annua* (einjähriger Beifuß) zur Behandlung der Malaria beschrieben. Die Gattungsbezeichnung *Plasmodium* wurde 1885 von den Italienern Marchiafava und Celli vorgeschlagen. 1897 konnte der britische Offizier Ronald Ross nachweisen, dass die Übertragung der Protozoen durch weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles* geschieht. Die gegen die Parasiten aktive Komponente von *Artemisia annua* wurde 1971 von chinesischen Wissenschaftlern isoliert und ist heute unter dem Namen Artemisinin bekannt (CDC, 2010), welches erfolgreich als Malariamedikament eingesetzt wird.

In den letzten Jahren bildeten sich jedoch selbst gegen Artemisinin resistente Plasmodienpopulationen in Ländern, in denen Artemisinin nur als Monopräparat verabreicht wurde (WHO, 2013; Noedl *et al.*, 2008; Dondorp *et al.*, 2009). Gegen andere Malariawirkstoffe sind schon länger resistente Plasmodien verbreitet. So traten die ersten bekannten Chloroquinresistenzen bei Plasmodien bereits in den späten 1950er an der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha auf (Young und Moore, 1961). Gegen die Kombination aus Sulphadoxin und Pyrimethamin tauchten, ebenfalls in Südost-Asien, wiederum schon in den 1960er Jahren erste Resistenzen auf (Mahajan und Farooq, 2004; Björkman und Phillips-Howard, 1990). Alarmierend schnell verloren Medikamente ihre Wirksamkeit gegen Malaria. Von Resistenzen gegen Atovaquon wurde bereits nach weniger als einem Jahre berichtet und gegen Mefloquin traten resistente Stämme nach fünf Jahren Anwendung auf (Müller und Hyde, 2010).

1.1.2 Die systematische Einordnung

Die Gruppe der Alveolata (Abbildung 2) beinhaltet die Stämme Apikomplexa und Ciliophora, zu denen ausschließlich einzellige Eukaryonten gehören (Lucius und Loos-Frank, 2008). Die Stammbezeichnung ergibt sich durch das Vorkommen von unterschiedlich stark ausgeprägten flachen Vakuolen unter der Zellmembran, den Alveolen. Zu dem Unterstamm der Apikomplexa zählen neben *P. falciparum* auch *Toxoplasma gondii* (Erreger der Toxoplasmose) und *Cryptosporidium parvum* (Erreger der Cryptosporidiose). Der namensgebende Apikalkomplex ist eine charakteristische Struktur, die zum Eindringen des

Parasiten in die Wirtszelle dient. Der Komplex ist apikal lokalisiert und besteht aus sekretorischen Organellen (Mikronemen und Rhoptrien) und dem Polringkomplex. Der Apikoplast, ein chloroplastenähnliches Organell, ist ein weiteres Merkmal vieler Apikomplexa. Im Gegensatz zu den Plastiden besitzt der Apikoplast jedoch vier Organellmembranen. Es wird vermutet, dass der Apikoplast durch eine sekundäre Endosymbiose einer Rotalge und einer eukaryontischen Zelle entstanden ist (Ralph *et al.*, 2004; Maréchal und Cesbron-Delauw 2001). Des Weiteren ist die Gattung *Plasmodium*, neben den Gattungen *Leucocytozoon* und *Haemoproteus* (Lucius und Loos-Frank, 2008), aufgrund ihres heterogenen Generationswechsels, der intrazellulären Lebensweise in Blutzellen und der Übertragung durch Arthropoden auf Wirbeltiere, der Ordnung Haemosporidia unterzuordnen (Mehlhorn und Piekarski, 2002).

Gruppe: Alveolata

Stamm: Apikomplexa

Klasse: Haematozoa

Ordnung: Haemosporida

Familie: Plasmodiidae

Gattung: Plasmodium

Abb. 2 Systematische Einordnung der Gattung *Plasmodium*
(Lucius und Loos-Frank, 2008)

1.1.3 Humanpathogene Arten der Gattung *Plasmodium*

Über 200 verschiedene Arten gehören zur Gattung *Plasmodium* und parasitieren in Säugetieren, Vögeln und Reptilien (Dongyou Liu, 2012). Für den Menschen sind bislang fünf Arten von Bedeutung: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. oval*, *P. malariae* und die, nach neueren Erkenntnissen ebenfalls humanpathogene Art, *P. knowlesi* (Cox-Singh, 2012). *P. vivax* und *P. ovale* sind die Erreger der Malaria tertiana, für die 48stündige Fieberschübe charakteristisch sind. Beide Erreger sind in der Lage Ruhestadien (Hypnozoiten) in der Leber zu bilden, wodurch trotz erfolgreicher Behandlung des Blutstadiums ein erneutes Auftreten der Symptome

erfolgen kann. Malaria quartana wird durch *P. malariae* hervorgerufen, bei der die erythrozytäre Schizogonie 72 Stunden dauert (Kayser *et al.*, 2010).

Die gefährlichste humanpathogene Art ist *P. falciparum*, der Erreger der Malaria tropica. Diese zeigt einen atypischen Fieberrhythmus, der sie von dem bei anderen Malaria-Formen unterscheidet. Weitere Charakteristika sind die hohe Parasitämie und die daraus resultierende hämolytische Anämie. Infektionen mit *P. falciparum* führen häufig zur zerebralen Malaria, die sich durch Blutgerinnsel im Gehirn manifestiert und dadurch verantwortlich für die hohe Letalität ist.

1.1.4 Lebenszyklus von *P. falciparum*

Der Lebenszyklus von *P. falciparum* findet in zwei unterschiedlichen Wirten statt (Abbildung 3). Zwei asexuelle Vermehrungen erfolgen in menschlichen Leberzellen und in Erythrozyten. Die sexuelle Vermehrung findet in der *Anopheles*-Mücke statt. Die mit *Plasmodien* infizierte Mücke sticht einen Menschen um ihr Blutmahl einzunehmen. Dabei werden rund 2000 Sporozoiten in die Dermis des Menschen injiziert, von denen bis zu 30 ausreichen eine Infektion hervorzurufen. Die Sporozoiten wandern aktiv in die Blutgefäße und werden von diesen zur Leber transportiert. In den Hepatozyten durchlaufen die *Plasmodien* die erste Vervielfältigung, die sogenannte exoerythrozytäre Schizogonie. Hierbei werden pro Zelle innerhalb von sechs Tagen bis zu 30 000 Merozoiten gebildet (Jensen und Mehlhorn, 2009). Durch Lyse des Merosoms werden die Merozoiten in die Blutbahn entlassen, wo sie Erythrozyten befallen (Sturm *et al.*, 2006). Es erfolgt die erythrozytäre Schizogonie, die ein sich ständig wiederholender Prozess ist. In den roten Blutzellen entwickeln sich die Merozoiten innerhalb von 48 Stunden über Trophozoiten zu reifen Schizonten, die wiederum bis zu 32 Merozoiten enthalten. Nach Verlassen des Erythrozyten befallen diese innerhalb kürzester Zeit neue rote Blutzellen. Bei der Malaria tropica sind nur junge Trophozoiten im sogenannten Ringstadium im peripheren Blut zu finden. Erythrozyten mit weiterentwickelten Parasiten binden an die Endothelzellen der Blutkapillaren (Sequestrierung) und entgehen somit der Selektion durch die Milz. Nach einigen Generationen entwickeln sich aus den Merozoiten männliche und weibliche Gametozyten, die so genannten Mikro- und Makrogamonten. Durch einen weiteren Stich der *Anopheles*-Mücke gelangen diese in den Darm der Mücke. Hier entstehen aus dem Mikrogamont mehrere Mikrogameten, die den Makrogameten befruchten. Die entstehende Zygote

entwickelt sich weiter zum beweglichen Ookinet, welcher durch die Mitteldarmwand wandert und sich zwischen Epithelzelle und Basalmembran einnistet. Hier erfolgt die Weiterentwicklung zur Oozyste. Durch Sporogonie entstehen in der Oozyste tausende Sporozoiten, die über die Hämolymphe zur Speicheldrüse der Mücke gelangen und von dort auf einen neuen Wirt übertragen werden können (Jensen und Mehlhorn, 2009; Abbildung 3).

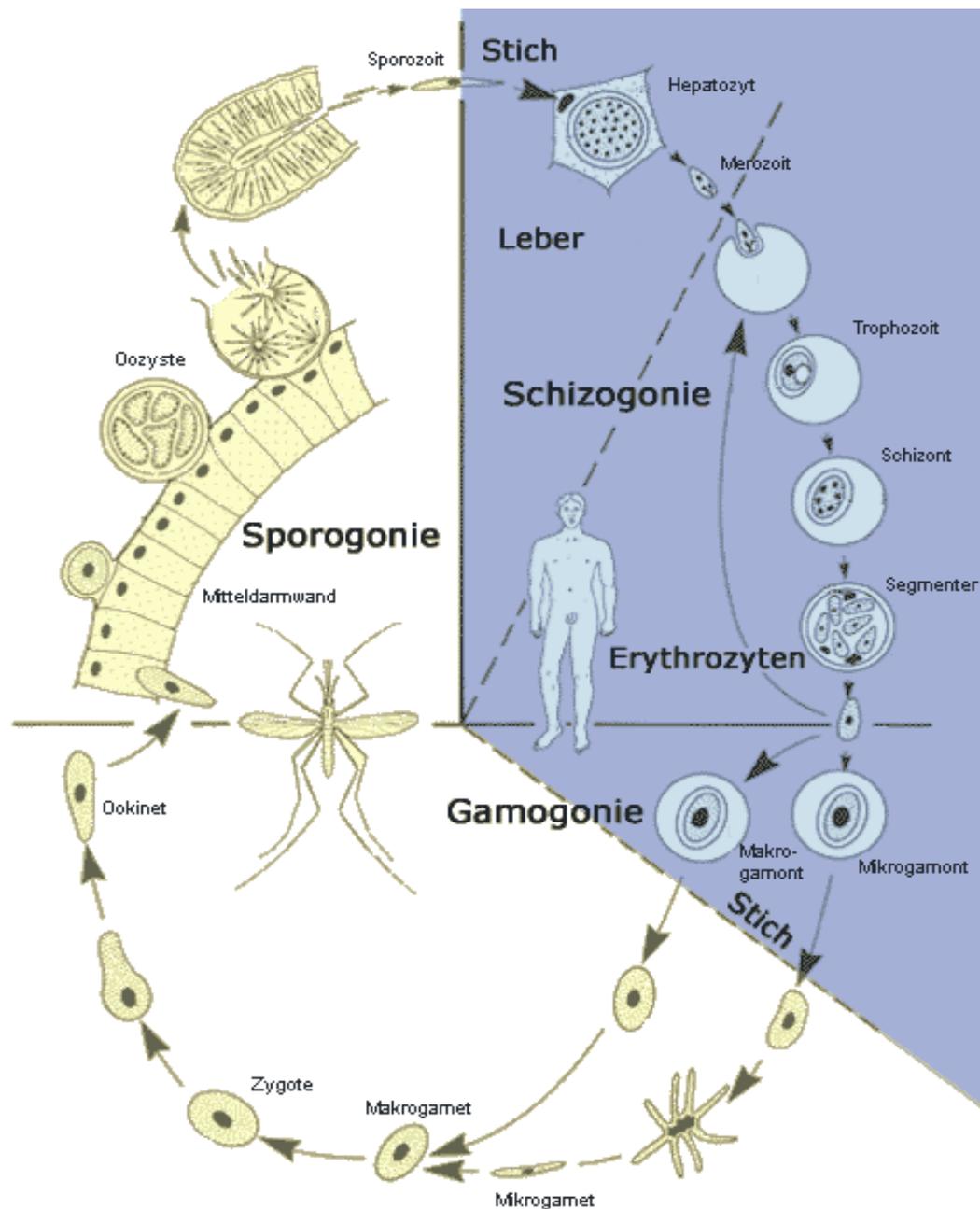


Abb. 3 Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* (Jensen und Mehlhorn 2009). Blau hinterlegt sind die Entwicklungsstadien des Parasiten im Zwischenwirt, dem Mensch. Die Stadien in der *Anopheles*-Mücke, dem Endwirt, sind auf weißem Hintergrund dargestellt.

1.2 Vitamin B6

1.2.1 Vitamine allgemein

Der Begriff „Vitamin“ wurde 1912 von Casimir Funk, einem polnischen Biochemiker, geprägt. Er führte den Begriff „Vitamin“, zusammengesetzt aus „vita“ für „Leben“ und „amin“ für „stickstoffhaltig“, ein (Piro *et al.*, 2010).

Heutzutage gehören zur Gruppe der Vitamine grundverschiedene Substanzen, die weder in ihrer Struktur noch in ihrer Funktion im Organismus viel gemeinsam haben. Vitamine sind organische Substanzen, die für den Organismus in geringen Mengen notwendig sind und mit der Nahrung aufgenommen werden müssen (Bender, 2003). Die Funktionen der verschiedenen Vitamine lassen sich in fünf Gruppen zusammenfassen. Sie wirken als Antioxidantien, als Elemente bei der Transkriptionsregulation, im Redoxsystem, als Hormone sowie als Co-Faktoren von Enzymen (Combs, 2007). Trotz ihrer Divergenz lassen sich Vitamine in zwei Gruppen einteilen - die wasser- und die fettlöslichen Vitamine (Bellows und Moore, 2012).

1.2.2 Vitamin B6

Wie alle Vitamine der B-Gruppe, ist auch Vitamin B6 wasserlöslich. Neben dem Vitamin B6 (Pyridoxin) gehören noch B1 (Thiamin), B2 (Riboflavin), B3 (Nikotinsäure), B5 (Pantothensäure), B7 (Biotin), B9 (Folsäure) sowie das Vitamin B12 (Cobalamin) zur Gruppe der B-Vitamine (Bellows und Moore, 2012). Das Pyridoxin besteht aus einem Pyridinring, welcher mit einer Methylgruppe und einem primären sowie zwei sekundären Alkoholen verbunden ist (Abbildung 4a). Neben Pyridoxin werden noch das Pyridoxamin und das Pyridoxal, sowie jeweils die phosphorylierten Formen, zum Vitamin B6 gezählt (Abbildung 4). Die metabolisch aktive Form der Vitamin B6-Derivate ist jedoch nur das Pyridoxal-5-Phosphat (PLP), welches als Co-Faktor von Enzymen an diversen Stoffwechselreaktionen beteiligt ist. PLP ist beispielsweise in nahezu allen Reaktionen im Stoffwechsel von Aminosäuren involviert. Es spielt eine Rolle bei der Glukoneogenese, dem Fettstoffwechsel, der Synthese von Hämoglobin sowie Neurotransmittern und im Immunsystem (Combs, 2008).

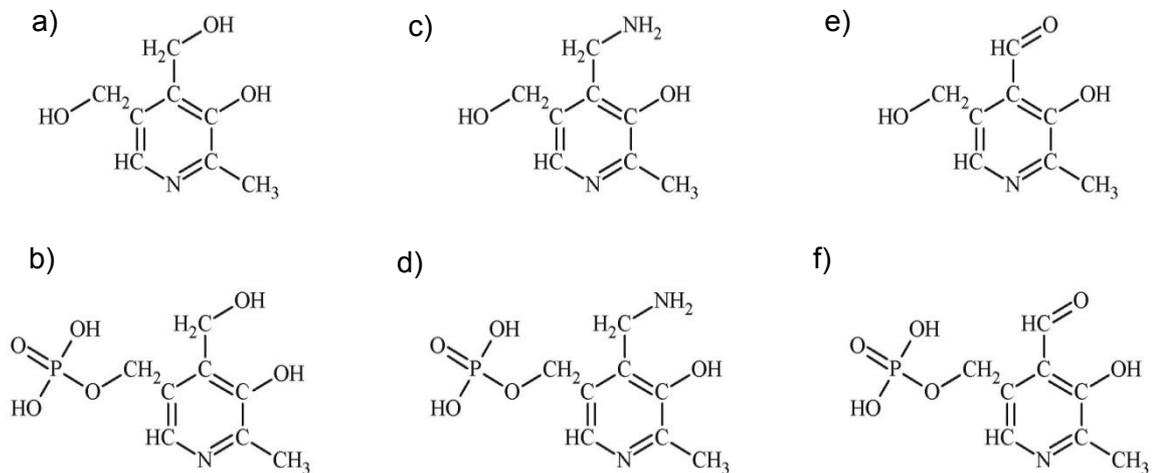


Abb. 4 Strukturformeln von Pyridoxin und den Derivaten. **a)** Pyridoxin **b)** phosphorylierte Form von Pyridoxin Pyridoxin-5-Phosphat; **c)** Pyridoxamin **d)** Pyridoxamin-5-Phosphat; **e)** Pyridoxal und **f)** zeigt PLP (Pyridoxal-5-Phosphat) die phosphorylierte Form von Pyridoxal (Mooney und Hellmann 2010).

Der Mensch muss Vitamin B6 mit der Nahrung, vorwiegend über Fleisch, Fisch, und stärkehaltiges Gemüse wie z.B. Kartoffeln, aufnehmen (Institute of Medicine, 1998). Im Körper werden die Derivate dann ineinander umgewandelt. In den Zellen wird das Pyridoxal von einer Kinase zur aktiven Form PLP phosphoryliert, welches dann als Co-Faktor an einer Vielzahl von Enzymreaktionen beteiligt ist (di Salvo *et al.*, 2012). PLP-abhängige Enzyme finden sich in fünf der sechs, von der „Enzyme Commission“ (EC; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>) klassifizierten, Enzymgruppen. Die meisten PLP-abhängigen Enzyme lassen sich in der Gruppe der Transferasen, aber auch bei den Lyasen, Isomerasen, Hydrolasen sowie Oxidoreduktasen, finden (Percudani und Peracchi, 2003).

1.2.2 Biosynthese von Vitamin B6

Bisher sind zwei unterschiedliche Wege zur Synthese von PLP bekannt. In *E. coli* und einigen anderen Eubakterien kommt der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP)-abhängige Weg vor (Mooney *et al.*, 2009), bei dem Erythrose-4-Phosphat (aus Fruktose-6-Phosphat gebildet) über mehrere Schritte zu 4-Phospho-Hydroxyl-L-Threonin umgewandelt und anschließend mit DXP, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, durch die Enzyme PdxA und PdxJ, zu Pyridoxin-5-Phosphat (PNP) vereint wird (Yang *et al.*, 1998). Im letzten Schritt katalysiert die PdxH die Umformung von PNP zu PLP (Zhao und Winkler, 1995). Ein zweiter Weg wurde zunächst bei *Cercospora nicotinae* während der Suche nach Resistenzmechanismen gegenüber Singulett Sauerstoff und anderen ROS identifiziert (Ehrenschaft *et al.*, 1999 und 2001).

Auch *P. falciparum* kann PLP selbst herstellen (Wrenger *et al.*, 2005; Gengenbacher *et al.*, 2006). Dies geschieht, wie ebenfalls für Toxoplasma (Knöckel *et al.*, 2007), Bakterien (Mittenhuber, 2001), Pilzen (Ehrenschaft *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2004) und Pflanzen (Tambasco-Studart *et al.*, 2005) beschrieben, über den DXP-unabhängigen Weg. Wie Kristallstrukturen der Enzymkomplexe zur PLP-Herstellung von *B. subtilis* und *T. maritima* zeigen (Zein *et al.*, 2006; Strohmeier *et al.*, 2006), besteht die PLP-Synthase aus 12 Pdx1 Molekülen, wobei sich jeweils zwei gebildete Hexamere-Ringe übereinander lagern. Ebenfalls 12 Pdx2-Proteine lagern sich anschließend außen an das Dodekamer an (Müller *et al.*, 2008). Pdx2 fungiert, nach Bindung an ein Pdx1-Protein, als Glutaminase (Kondo *et al.*, 2004; Neuwirth *et al.*, 2007; Derrer *et al.*, 2010). Durch die Spaltung von Glutamin zu Glutamat liefert Pdx2 ein Ammonium-Ion über einen transienten Tunnel an Pdx1 (Bauer *et al.*, 2004; Guédez *et al.*, 2012). Dieses wird von Pdx1 zur Herstellung von PLP aus Ribose-5-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat verwendet (Müller *et al.*, 2008). Als alternative Triose bzw. Pentose können auch die Substrate Dihydroxyacetonphosphat und D-Ribulose-5-Phosphat von Pdx1 verstoffwechselt werden (Gengenbacher *et al.*, 2006). Der Ablauf und die Zusammenhänge der DXP-unabhängigen PLP-Synthese sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Neben der *de novo* Synthese können Plasmodien durch das Enzym Pyridoxin/Pyridoxalkinase (PdxK) ebenfalls PLP bilden (Wrenger *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2009).

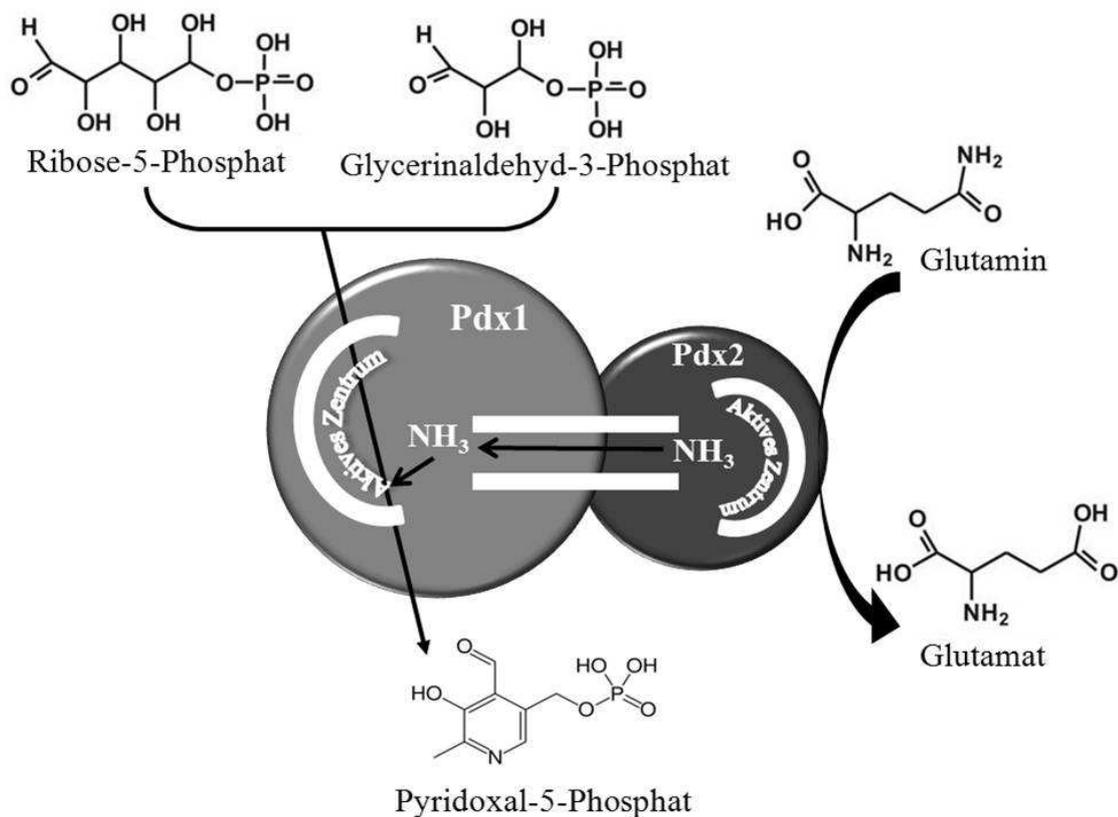


Abb. 5 Schema der DXP-unabhängigen PLP-Synthese (nach Müller *et al.*, 2008).

Ob die *de novo* Biosynthese von PLP für *P. falciparum* essentiell ist, ist noch nicht geklärt. Die Kultivierung von *P. falciparum* in pyridoxinfreiem Medium hatte jedoch keinen Effekt auf das Wachstum der Parasiten (Divo *et al.*, 1985; Müller *et al.*, 2010).

In den Erythrozyten ist PLP, neben den PLP-abhängigen Enzymen, größtenteils an das N-terminale Valin der β -Kette des Hämoglobins gebunden. Es wird in Form von Pyridoxal aus dem Plasma in die Erythrozyten transportiert, wo es von einer PdxK phosphoryliert wird (Gropper und Smith, 2012). Da bisher kein Transporter für die Aufnahme von Vitamin B6 über die Parasitenmembran beschrieben wurde, ist noch nicht bekannt, ob das PLP aus der Wirtszelle für den Parasiten zugänglich ist (Gengenbacher *et al.*, 2006).

1.3 „Downstream“-Effekte von PLP

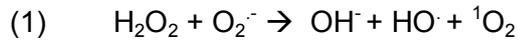
Die Vielzahl an bereits erwähnten PLP-abhängigen Reaktionen bedingt diverse „downstream“-Effekte. Deutlich werden diese durch einen, bei normaler Ernährung extrem seltenen, Vitamin B6-Mangel. Die gestörte Aminosäure- und Proteinsynthese führen zu Wachstumsstörungen, Hauterosionen sowie Muskelatrophien. Außerdem treten Anämien auf, welche durch die Hemmung der Hämbiosynthese auf Ebene der δ -Aminolävulinsäuresynthetase zu erklären sind. PLP-abhängige Enzyme sind außerdem an der Synthese von Neurotransmittern wie Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) beteiligt (Combs, 2008), wodurch ein Mangel an PLP, Erkrankungen des peripheren Nervensystems bedingen kann. Durch die Bindung von PLP an Steroidrezeptoren wird die Wirkung der Steroidhormone (z.B. Östrogen und Testosteron) gehemmt. Ein Mangel an PLP könnte demzufolge auch eine Rolle bei Brust- und Prostata- Krebs spielen (Spinneker *et al.*, 2007).

Die Analyse eines PLP-Mangels bei *P. falciparum* ist bisher nicht möglich gewesen, jedoch konnte durch Verwendung von PLP-Analoga das Wachstum von *P. falciparum* gehemmt werden. Die Überexpression der PfPdxK in den Parasiten führte zur Akkumulierung der PLP-Analoga, welche wiederum die Parasiten durch Hemmung PLP-abhängiger Reaktionen töteten (Müller *et al.*, 2009).

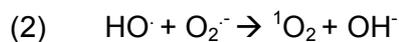
1.3.1 PLP als Antioxidans

Während ihres Lebenszyklus sind Plasmodien ständig oxidativem Stress ausgesetzt. Einerseits wird der Parasit von den Immunzellen des Wirtes ständig durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) angegriffen, andererseits verursachen Plasmodien durch ihre rapide Vermehrung und die dadurch bedingte hohe Stoffwechselaktivität den größten Teil der ROS selbst. Hierbei verursacht der Abbau von Hämoglobin, welches die Hauptquelle an Aminosäuren für den Parasiten darstellt, die Bildung von ROS und somit von oxidativem Stress. Dabei kommt es nicht nur zur Bildung von toxischem Häm, Hydrogenperoxiden (H_2O_2), Hydroxylradikalen (OH^\cdot) und Superoxid-Anionen ($O_2^\cdot^-$), sondern der Hämoglobinabbau führt ebenso zur Bildung von stark reaktivem Singulett Sauerstoff (Freinbichler *et al.*, 2011). Eine mögliche Entstehungsweise von 1O_2 in einem Fenton-ähnlichen Prozess wurde von

Kellogg und Fridovich (1975) beschrieben und ist in der Gleichung (1) veranschaulicht.



Außerdem kann ein ${}^1\text{O}_2$ -Molekül bei der Reaktion eines Hydroxylradikals mit einem Superoxid-Anion, oder zwei Superoxid-Anionen und zwei Hydrogen-Ionen entstehen (Khan *et al.*, 1994). Die entsprechenden Gleichungen sind in (2) und (3) dargestellt.



Plasmodien haben verschiedenste Antioxidationssysteme entwickelt, um sich vor den ROS zu schützen. Das Glutathionsystem, das Thioredoxinsystem, welches Peroxiredoxin beinhaltet, sowie zwei Superoxiddismutasen wurden bereits identifiziert (Kehr *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2003; Liebau *et al.*, 2002; Becker *et al.*, a 2003; Becker *et al.*, b 2003; Dive *et al.*, 2003; Sienkiewicz *et al.*, 2004). Des Weiteren sind die antioxidativen Vitamine C (Ascorbinsäure) und E (Tocopherol) in Plasmodien vorhanden, um das Redoxgleichgewicht zu gewährleisten (Stocker *et al.*, 2003). Keines der bereits genannten Systeme kann jedoch ${}^1\text{O}_2$ unschädlich machen. In Pilzen und Pflanzen konnte indes gezeigt werden, dass Vitamin B6 ${}^1\text{O}_2$ bekämpfen kann (Ehrenshaft *et al.*, 1999; Bilski *et al.*, 2000; Havaux *et al.*, 2009).

Bei *Plasmodium falciparum* konnte bereits gezeigt werden, dass die Transkription der für die PLP-Synthase kodierenden Gene (*pdx1* und *pdx2*), unter ROS-auslösenden Substanzen wie Metylenblau (Ehrlich und Guttman, 1891) und Cercosporin (Daub und Hangarter, 1983) erhöht vorlag (Wrenger *et al.*, 2005; Knöckel *et al.*, 2012). Zudem konnte durch Überexpression der beiden PLP-Synthase-Gene im Parasiten eine höhere Toleranz gegenüber Cercosporin-induziertem Singulett Sauerstoff erzielt werden (Knöckel *et al.*, 2012). Cercosporin (Abbildung 6) wird von verschiedenen phytopathogenen *Cercospora*-Arten als Pathogenitätsfaktor produziert, da es mit molekularem Sauerstoff unter der Bildung von reaktivem Singulett Sauerstoff (${}^1\text{O}_2$) reagiert

und dadurch beispielsweise Wirtszellwände geschädigt werden (Daub und Ehrenshaft, 2000).

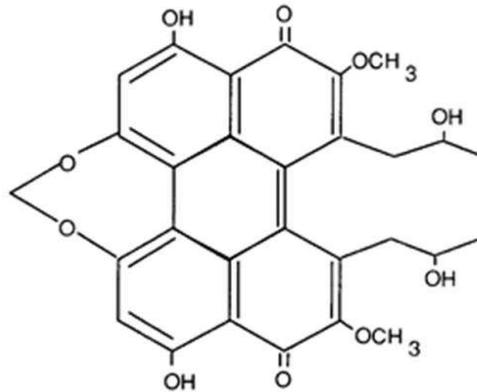


Abb. 6 Strukturformel von Cercosporin (Zón *et al.*, 1999).

1.3.2 PLP als Co-Faktor

1.3.2.1 Allgemeiner Reaktionsmechanismus

Ist kein Substrat vorhanden, bildet die Aldehydgruppe des PLP im aktiven Zentrum des Enzyms mit der ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes eine Schiffbase und somit ein inneres Aldimid aus. Zusätzlich ist PLP über viele nicht kovalente Bindungen fest gebunden und liegt bei den meisten Enzymen demnach als prosthetische Gruppe vor (Horton, 2008). Das Prinzip aller PLP-abhängigen Reaktionen beruht auf der Bildung einer Schiff'schen Base zwischen der Aldehydgruppe des PLPs und dem primären Amin der Aminosäure (externes Aldimin). Das Reaktionsschema der ablaufenden Reaktion ist in Abbildung 7 dargestellt. Infolge der elektronenanziehenden Wirkung des PLP-Stickstoffs werden die Bindungen am C α -Atom der Aminosäure geschwächt. Je nach Apo-Enzym werden dadurch unterschiedliche Reaktionen ermöglicht (Löffler, 2004). Durch eine Schwächung der Bindung zwischen dem C α -Atom und der Aminogruppe wird eine Transaminierung, bei der PLP eine Aminosäure deaminiert und die Aminogruppe auf eine Ketosäure überträgt, ermöglicht. Neben Transaminierungsreaktionen sind PLP-abhängige Enzyme an Decarboxylierungen, Razemisierungen β -, γ -Eliminierungen und Substitutionsreaktionen beteiligt (Christen und Jaussi, 2004).

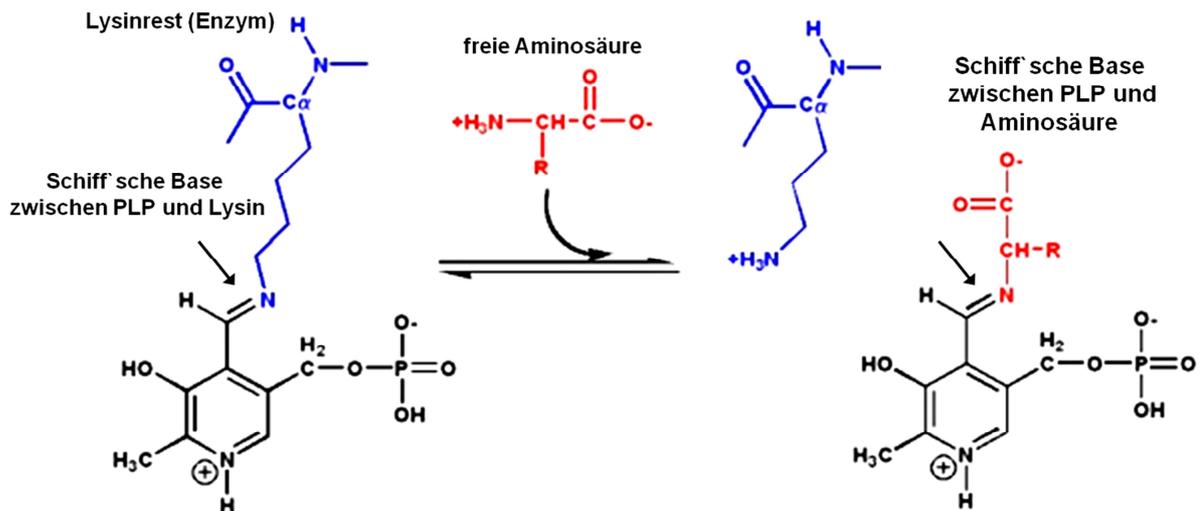


Abb. 7 Grundprinzip der Reaktion von PLP. Zunächst werden der Lysinrest des Enzyms und der Stickstoff von PLP über eine Schiff'sche Base verbunden (internes Aldimin). Anschließend verbindet sich der PLP-Stickstoff mit einer freien Aminosäure ebenfalls über eine Schiffbase (externes Aldimin). (<http://mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture33/Lecture33.htm>)

1.3.2.2 PLP-abhängige Reaktionen in *P. falciparum*

Von den über 160 beschriebenen Reaktionen, welche PLP abhängig sind (di Salvo *et al.*, 2012), wurden in *P. falciparum* bisher 14 beschrieben, von denen sehr viele essentiell sind. Beispielsweise führt die Inaktivierung der PfODC zum Tod der Parasiten (Müller *et al.*, 2008). In Tabelle 1 sind die bei *P. falciparum* bekannten PLP-abhängigen Enzyme zusammengefasst.

Tab. 1 PLP-abhängige Enzyme und deren Funktionen im Stoffwechsel von Plasmodien (nach Müller *et al.*, 2010; priweb.cc.huji.ac.il/malaria).

EC	Enzym	PlasmoDB Version 9.3	Funktion	Ref.
2.1.2.1	Glycinhydroxymethyl Transferase	PF3D7_1235600	Folat-Metabolismus, Aminosäurestoffwechsel	(Alfadhl <i>et al.</i> , 2000)
2.3.1.37	5-Aminolevulinsäure Synthase	PF3D7_1246100	Porphyrinmetabolismus Aminosäurestoffwechsel	(Wilson <i>et al.</i> , 1996)
2.3.1.50	Serin C-Palmitoyl-transferase	PF3D7_1415700	Sphingolipid-metabolismus, putativ	-
2.6.1.1	Aspartat Aminotransferase	PF3D7_0204500	Aminosäurestoffwechsel	(Berger <i>et al.</i> , 2001)

2.6.1.13	Ornithin Aminotransferase	PF3D7_0608800	Arginin und Prolin Stoffwechsel	(Gafan <i>et al.</i> , 2001)
2.6.1.42	Branched-Chain- Aminosäure- Aminotransferase	PF3D7_1458400	Pantothenat und CoA Biosynthese, Aminosäurestoffwechse, putativ	-
2.6.1.57	Aromatik Aminosäure Transaminase	PF3D7_0204500	Aminosäurestoffwechsel	(Berger <i>et al.</i> , 2001)
2.8.1.7	Cystein Desulfurase	PF3D7_0716600 PF3D7_0727200	Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese	(Ellis <i>et al.</i> , 2001)
4.1.1.17	Ornithin Decarboxylase	PF3D7_1033100	Polyaminbiosynthese	(Müller <i>et al.</i> , 2000)
4.1.1.18	Lysin Decarboxylase	PF3D7_0405700	Polyaminmetabolismus	(Müller <i>et al.</i> , 2008)
4.1.1.65	Phosphatidylserin Decarboxylase	PF3D7_0927900	Glycerophospholipid- metabolismus	(Baunaur <i>et al.</i> , 2004)
4.1.3.38	p-Aminobenzosäure Synthase	PF3D7_0922400	Folatbiosynthese	(Triglia <i>et al.</i> , 1999)
5.1.1.1	Alanin Razemase	PF3D7_0919700	Razematisierung von Alanin, putativ	priweb.cc. huji.ac.il/ malaria

1.4 Energie- und Kohlenhydratstoffwechsel

1.4.1 Energiegewinnung

Die Energiebereitstellung erfolgt durch Dissimilation, wobei energiereiche Stoffe in energieärmere Stoffe abgebaut werden. Diese katabolischen Reaktionen können grundsätzlich aerob oder anaerob ablaufen, wobei bei der anaeroben Atmung die Glucose unvollständig zu Laktat oxidiert wird und somit die Energieausbeute mit zwei Molekülen ATP wesentlich geringer ausfällt als bei der Übertragung der Elektronen über eine Atmungskette auf Sauerstoff. Wie in Abbildung 8 veranschaulicht, wird die phosphorylierte Glucose als erstes in der Glykolyse im Zytosol zu Pyruvat reduziert, wobei zunächst zwei Moleküle ATP verbraucht werden. Während des Abbaus von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat und im letzten Schritt der Glykolyse, bei der Umsetzung von

Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat durch die Pyruvatkinase, werden jedoch vier ATP-Moleküle pro Glucose bildet und somit zwei ATP gewonnen.

Daraufhin wird das Pyruvat im Pyruvatdehydrogenase-Komplex oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert, welches anschließend in den Citratzyklus (TCA) übergeht und vollständig zu zwei Molekülen CO_2 oxidiert wird. Bei Eukaryonten läuft der Citratzyklus in der Matrix der Mitochondrien ab. Aus dem Citratzyklus gehen letztendlich die energiereichen Moleküle $\text{NADH}+\text{H}^+$ sowie FADH_2 sowie ein GTP hervor.

Deren Elektronen werden in der Redoxkette der inneren Mitochondrienmembran an fünf Multienzymkomplexen (Atmungskette) über verschiedene Redoxpaare letztendlich auf den Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen. Dabei werden Protonen durch die Komplexe I, III und IV in den Intermembranraum transportiert. An die Elektronentransportkette ist durch den gebildeten Protonengradienten eine oxidative Phosphorylierung gekoppelt, welche durch die ATP-Synthase (Komplex V) katalysiert wird. Pro $\text{NADH}+\text{H}^+$ können drei ATP- und durch FADH_2 zwei ATP-Moleküle durch oxidative Phosphorylierung gebildet werden, sodass in der Atmungskette 26 ATP-Moleküle entstehen (Stryer, 1995).

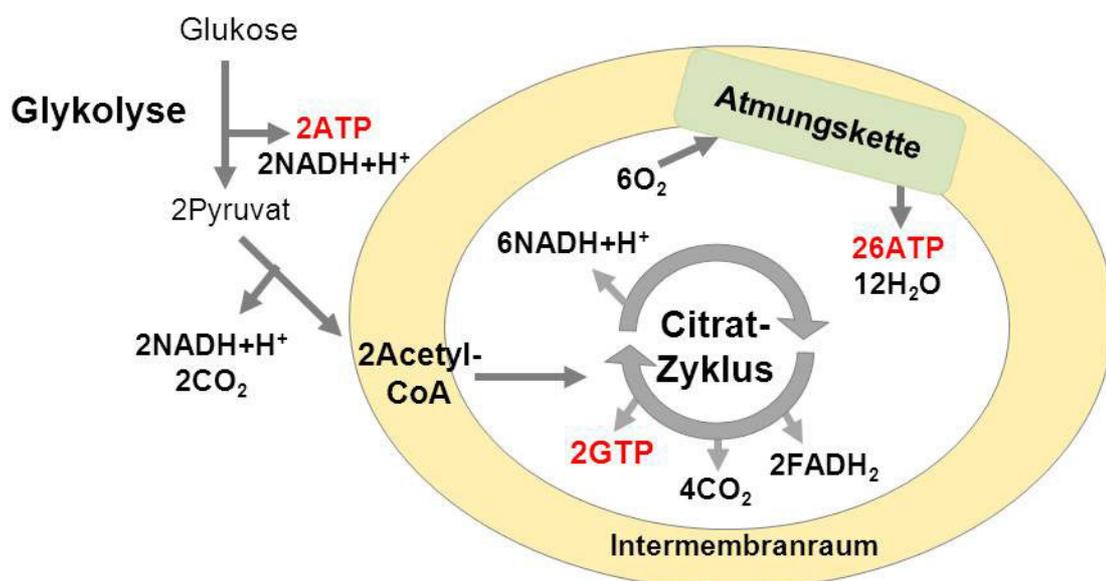


Abb. 8 Allgemeines Schema der Energiebereitstellung durch aerobe Dissimilation.

1.4.2 Energiegewinnung bei *P. falciparum*

Während der asexuellen Lebensweise der Plasmodien im menschlichen Blut läuft die Energieherstellung größtenteils über die Glykolyse ab, welche von Glucose abhängt, wobei auch Fructose ein kontinuierliches Wachstum gewährleisten kann (Olszewski und Llinas, 2011). Der Glucoseverbrauch im infizierten Erythrozyten ist während des Trophozoiten- bzw. Schizonten-Stadiums bis zu 100mal höher (Roth *et al.*, 1990). Der größte Teil (60 bis 70 %) der Glucose wird jedoch unvollständig zu Laktat oxidiert, welches ausgeschieden wird und somit zur Laktatazidose sowie Hypoglykämie im Patienten führt (Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2008). Nur geringe Mengen der Glucose werden komplett zu CO₂ abgebaut, wodurch der O₂ Verbrauch möglichst niedrig gehalten wird (Olszewski und Llinas, 2011). Das während der Glykolyse gebildete Phosphoenolpyruvat (PEP) stellt ein Ausgangsprodukt für die Acetyl-CoA Produktion im Apikoplasten dar (Abbildung 9). Dieses wird in Plasmodien durch den Pyruvatdehydrogenasekomplex ermöglicht, welcher sich bei diesen Organismen im Apikoplasten befindet und demnach, bedingt durch die räumliche Trennung, nicht die Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus darstellt. Vielmehr liefert er im Apikoplasten Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese (Foth *et al.*, 2005).

Der Citratzyklus ist bei Plasmodien größtenteils von der Glykolyse getrennt. Außerdem weist er keine zyklische Form auf, sondern besteht aus einem oxidativen und einem reduktiven Weg. Die Hauptkohlenstoffquellen sind Glutamin und Glutamat, welches zu α -Ketoglutarat desaminiert und oxidiert wird sowie über ein Malat/ α -Ketoglutarat-Transporter-Homolog (PF3D7_0823900) in das Mitochondrium gelangt (Olszewski *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu anderen Eukaryonten besitzen Plasmodien keine mitochondriale Malatdehydrogenase (Tripathi *et al.*, 2004), wobei Malat das Endprodukt beider Zweige des Citratstoffwechsels ist. Malat kann in den Mitochondrien einerseits durch die plasmodiale Malatquinonoxido-reduktase (PF3D7_0616800, putativ) zu Oxalacetat oxidiert werden, wobei es als Elektronendonator für die Atmungskette (Komplex III) fungieren kann (Wrenger *et al.*, 2012a). Andererseits kann es über den Malat/ α -Ketoglutarat-Transporter ins Zytosol transportiert und dort von der zytosolischen MDH wiederum zu Oxalacetat oxidiert werden. Oxalacetat dient mit Glutamat in der Rückreaktion der Aspartat Aminotransferase als Substrat und es können α -Ketoglutarat und Aspartat gebildet werden. Ein Schema, der

entsprechenden Stoffwechselwege und deren Zusammenhänge ist in Abbildung 9 dargestellt.

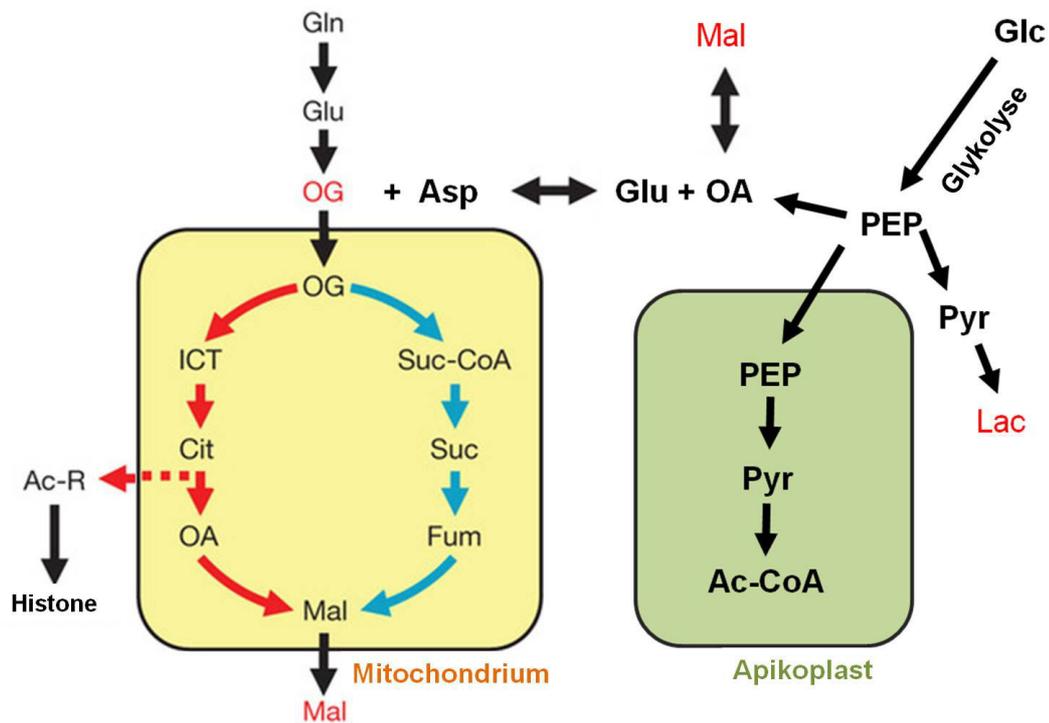


Abb. 9 Schema des Energie- und Kohlenhydratstoffwechsels in *P. falciparum*. Gln Glutamin, Glu Glutamat, OG α -Ketoglutarat, Asp Aspartat, OA Oxalacetat, Mal Malat, PEP Phosphoenolpyruvat, Glc Glucose, Pyr Pyruvat, Lac Laktat, Ac-CoA Acetyl-CoenzymA, Suc-CoA Succinyl-CoenzymA, Suc Succinat, Cit Citrat, ICT Isocitrat. (Nach Olszewski *et al.*, 2010).

1.4.3 Kohlenhydratmetabolismus

Die Kohlenstoffgerüste stammen von Zwischenprodukten der Glykolyse, des Pentosephosphatweges oder des Citratzyklus (Stryer, 1995).

Bei Pflanzen und Bakterien dient Aspartat als Kohlenstoffgerüst für die Bildung der Aminosäuren Threonin, Asparagin, Methionin, Isoleucin und Lysin, welche demzufolge der Aspartat-Familie zugeordnet werden (Abbildung 10).

Unter ATP-Verbrauch und der Aufnahme einer weiteren Aminogruppe wird aus Aspartat Asparagin gebildet, was durch die Fixierung eines Ammoniumions, oder durch die Übernahme einer Aminogruppe vom Glutamin entstehen kann. Aus Aspartat wird über mehrere Zwischenreaktionen außerdem L-Homoserin, welches ein Intermediärprodukt bei der Synthese von einerseits Threonin und Isoleucin und andererseits Methionin darstellt.

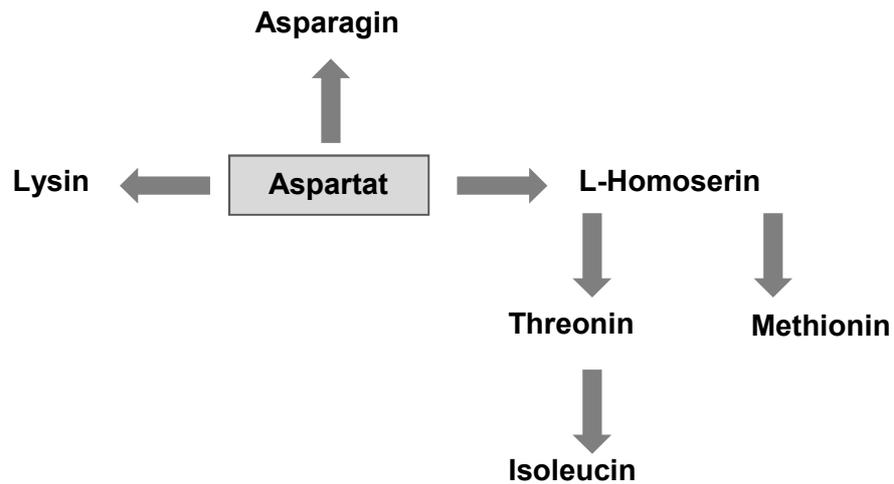


Abb. 10 Schematische Darstellung der Zusammenhänge der Aminosäuren der Aspartatfamilie und deren Synthese aus Aspartat.

1.4.4 Die plasmodiale Aspartat-Aminotransferase (AspAT)

Die Aspartat-Aminotransferase (EC-Nummer 2.6.1.1) katalysiert die Übertragung der α -Aminogruppe des Aspartats auf α -Ketoglutarat, wobei Oxalacetat und Glutamat gebildet werden (Abbildung 11). Als prosthetische Gruppe besitzt die AspAT, wie alle anderen Aminotransferasen auch, PLP.

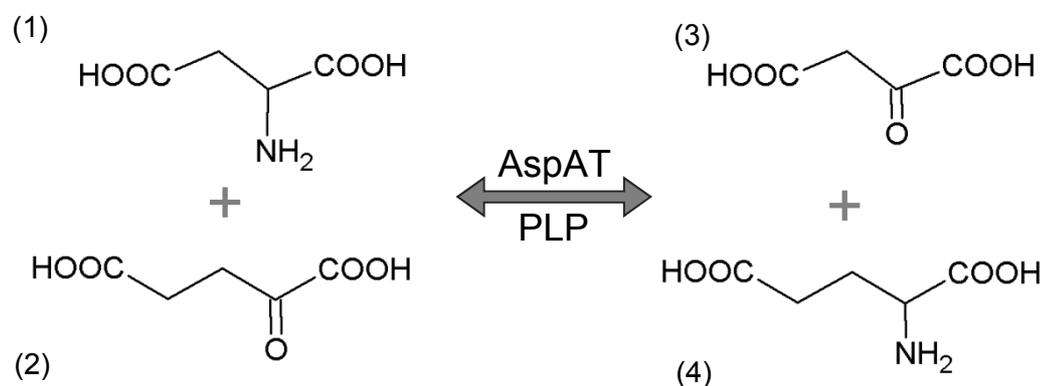


Abb. 11 Reversible Reaktion der AspAT. (1) Aspartat, (2) α -Ketoglutarat, (3) Oxalacetat, (4) Glutamat. Co-Faktor PLP.

Die plasmodiale AspAT (PF3D7_0204500) ist auf Chromosom 2 der Parasiten kodiert und liegt in ihrem physiologischen Zustand als Dimer mit einer molekularen Masse von 94 kDa vor. Lokalisationsanalysen als GFP-Fusionsprotein zeigen, dass die *Pf*AspAT im Zytosol der Parasiten zu finden ist (Wrenger *et al.*, 2011). Durch Homologieanalysen lässt sich die *Pf*AspAT in die Subfamilie Ia einordnen, wobei das plasmodiale Enzym große Abweichungen zu den anderen Mitgliedern der Ia-Subfamilie aufweist. Außerdem ist die plasmodiale AspAT die erste Aminotransferase bei der die hoch konservierte Aminosäure G197 in Serin mutiert ist (Berger *et al.*, 2001). Bei den bisher publizierten AspAT-Strukturen zeigt sich eine hohe Homologie zwischen den aktiven Zentren der Enzyme. Auch die *Pf*AspAT wurde bereits kristallisiert (Jain *et al.*, 2010) und es zeigt sich, dass auch die Faltung der *Pf*AspAT ähnlich der bisher bekannten Proteine ist, jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Strukturen im N-terminalen Bereich besteht (Wrenger *et al.*, 2011). In Abbildung 12 ist die Struktur des Homodimers der *Pf*AspAT dargestellt.

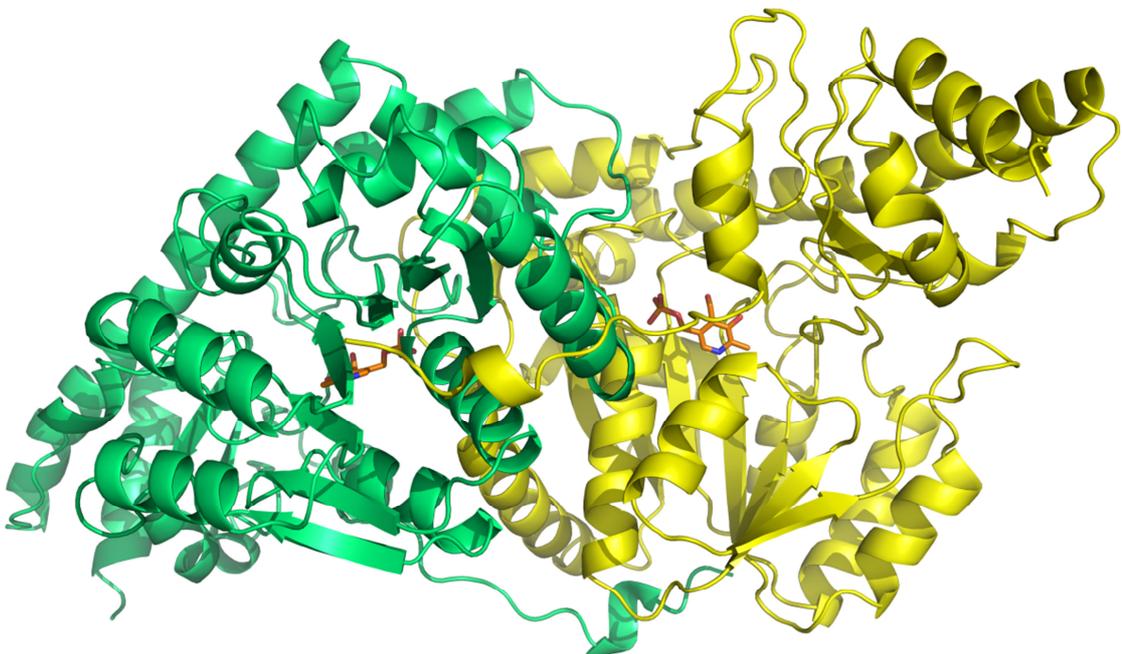


Abb. 12 Homodimere Struktur der *Pf*AspAT (PDB ID: 3K7Y). Gelb bzw. grün ist jeweils ein Monomer des Enzyms dargestellt. In orange ist der im aktiven Zentrum gebundene Co-Faktor PLP gezeigt.

1.4.5 Die plasmodiale Malatdehydrogenase (MDH)

Dehydrogenasen gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen. Allgemein versteht man unter Dehydrogenasen Enzyme, die ihr Substrat durch die Abspaltung von Wasserstoff oxidieren. Der Wasserstoff und die Elektronen werden anschließend auf die entsprechenden Co-Substrate NAD^+ oder FAD übertragen. Bei reversiblen Reaktionen wird demzufolge auch die Reduktion durch die Dehydrogenase katalysiert. Je nach Substrat werden verschiedene Dehydrogenasen unterschieden.

Die Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) katalysiert die reversible Reaktion von Malat zu Oxalacetat. Das von der sekundären Hydroxylgruppe des Malats abgespaltene Proton wird auf NAD^+ übertragen (Abbildung 13). Die MDH ist demzufolge unverzichtbar im Citratzyklus, im Aspartatzyklus und beim Transport von Energieäquivalenten über das Malat-Aspartat-Shuttle.

In nahezu allen Eukaryonten lassen sich zwei Isoenzyme der Malatdehydrogenase finden – ein Isoenzym in der Matrix der Mitochondrien und eins im Zytosol der Organismen, wobei sie jeweils die gleiche Reaktion katalysieren. Eine dritte Form wurde in den Glyoxysomen von Hefe entdeckt, wo sie das aus Glyoxylat gebildete Malat weiter verarbeitet (Minarik *et al.*, 2002).

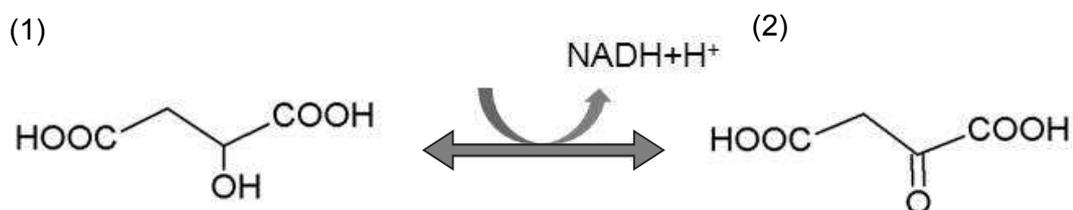


Abb. 13 Reversible Reaktion der Malatdehydrogenase, welche die Oxidation von L-Malat (1) zu Oxalacetat (2) katalysiert. Als Co-Substrat dient dabei NAD^+ welches gleichzeitig zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert wird.

Das Genom von Plasmodien beinhaltet nur ein MDH-Gen (PF3D7_0618500) auf Chromosom 6, welches keine Introns aufweist und für nur eine Isoform der MDH kodiert. Diese besteht aus 313 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 34 kDa (Tripathi *et al.*, 2004). Rekombinat hergestellte plasmodiale MDH weist eine tetramere Struktur auf, wobei sie auch als Dimer eine vergleichbare Aktivität zeigt (Pradhan *et al.*, 2009). Andere eukaryontische zytosolische MDHs liegen

als Dimere vor, wobei die MDHs von α -Proteobakterien meistens als Tetramer vorkommen (Björk *et al.*, 2003; Minarik *et al.*, 2002). Warum die *Pf*MDH demzufolge nicht wie bei allen Eukaryonten als Dimer sondern als Tetramer vorliegt ist noch nicht geklärt.

1.5 Zielsetzung

Es wurde bereits gezeigt, dass Plasmodien über eine *de novo* Vitamin B6-Biosynthese verfügen, welche einen möglichen Angriffspunkt für einen Antimalariawirkstoff liefert, da der Mensch Vitamin B6 nicht selber herstellen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle von PLP einerseits bei der Bekämpfung von Singulett Sauerstoff und andererseits als Co-Faktor in Plasmodien zu untersuchen. Die antioxidative Wirkung von PLP gegenüber $^1\text{O}_2$ soll mittels inaktiver PLP-Synthase, durch Überexpression einer dominant-negativen Mutante *in vivo* analysiert werden. Hierfür soll mittels Site-directed-Mutagenese-PCR ein inaktives Pdx1-Enzym generiert und anschließend in Plasmodien überexprimiert werden. Um die Aktivität der PLP-Synthase in Plasmodium zu reduzieren, soll die inaktive Pdx1 mit einer inaktiven Pdx2 co-transfiziert werden. Anschließend wird das Wachstumsverhalten der transgenen Zelllinien unter erhöhten $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen, durch Cercosporin generiert, verglichen. Außerdem soll mittels des Farbstoffs APF die $^1\text{O}_2$ -Konzentration im Parasiten bestimmt und eine Methode zur Quantifizierung von $^1\text{O}_2$ mittels APF für *Plasmodium falciparum* etabliert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die PLP-abhängige AspAT und ihre Funktion *in vivo* im Aspartatstoffwechsel dar. Durch Site-directed-Mutagenese-PCR sollen verschiedene Mutationen in die AspAT eingefügt werden. Die mutierten Proteine sollen anschließend rekombinant exprimiert und ihre Aktivität, im Vergleich zur AspAT-WT, analysiert werden. Static light scattering (SLS)-Analysen sollen außerdem Aussagen über den oligomeren Status der mutierten Proteine liefern. Über Co-Expressions- sowie Co-Aufreinigungsexperimente soll die Bindungsfähigkeit und die Inaktivierung des *Pf*AspAT-WT durch die Mutanten untersucht werden.

Außerdem soll die im Stoffwechsel eng mit der AspAT zusammenwirkende MDH bezüglich ihrer Aktivität untersucht werden. Es sollen ebenfalls inaktive MDH-Mutanten generiert und *in vitro* hinsichtlich ihrer Aktivität, des oligomeren Status und ihrer Bindungsfähigkeit an die Wildtyp-MDH charakterisiert werden. Mittels eines GFP-Fusionskonstruktes soll die MDH *in vivo* lokalisiert werden. Nach der Charakterisierung der AspAT- und MDH-Mutanten sollen Überexpressionskonstrukte generiert und in Plasmodien transfiziert werden. Die

Auswirkung für die Parasiten, bedingt durch die Inaktivierung der AspAT und MDH einzeln sowie in co-transgenen Zelllinien, soll *in vivo* untersucht und somit die Bedeutung und das Zusammenspiel der Enzyme analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bezugsquellen von Chemikalien und Kits

5Prime

Real Master Mix SYBR ROX 2,5x AppliChem

RPMI 1640-Hepes-Medium

Becton Dickinson

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

Biochrom

Zellkultur Flaschen 150cm²

Biomol

Albumin bovine (BSA) Fraction V, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glycin, Lysozym, IPTG

Biorad

Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Elektroporationsküvetten
GenePulser Cuvette 0,2cm, Filterpapiere

Boehringer Mannheim GmbH

α-Ketoglutarat

Eurogentec

Agarose

Fermentas

dNTPs, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, High Fidelity PCR Enzym-Mix, 6x Loading Dye

Fluka

Lysozym

Gerbu

NaCl, Tris-HCL, TEMED

Institut für Bioanalytik (IBA)

AHT, 10x Puffer E Desthiobiotin, Strep-Tactin-Sepharose, Strep-MAB Classic

Invitek

Invisorb Spin Plasmid Mini Two

Invitrogen

GFP-Antikörper rabbit serum (polyklonal), mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate-Antikörper (monoklonal), PureLink™ PCR-Purification Kit, PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, PureLink™ Plasmid Mini-prep Kit, RNaseA, PCR-Super Mix, Super Script III One-Step RT-PCR, TOPO TA Cloning® Kit, Albumax II, Hoechst 33342, MitoTracker Red CMX-ROS, RNase A, RNase OUT, Random Primers, 100 mM dNTP Set, Super Script III reverse Transcriptase

Jacobus Pharmaceuticals

WR 99210

Merck

Ammoniumpersulfat (APS), Calciumchlorid, D-(+)-Glucose-Monohydrat, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Natriumhydroxid, β -Mercaptoethanol, Chloroform, Coomassie Brilliant Blue G-250, Isopropanol, Kaliumchlorid, Tetramethyldiamin (TEMED), L-Asparaginsäure, Oxalacetat

New England Biolabs

Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase

Nunc

Cryo Tube™ Vials, Zellkulturschalen Nunclon Surface

Promega

Pfu-Polymerase, RQ1 RNase-free DNase

Qiagen

Qiagen Plasmid Maxi Kit, Ni-NTA Agarose

Roche

GFP-Antikörper rabbit polyklonal, Expand High Fidelity PCR System

Roth

40% Acrylamid-Lösung, Ampicillin-Natriumsalz, Milchpulver, Essigsäure, Ethanol, Gentamycinsulfat, Glycerin, Glycin, Methanol, Tween 20, Tris Ultra Qualität, Oxalacetat

Serva

Saponin, Sodiumdodecylsulfat (SDS), Coomassie Brilliant Blue R-250, L-Äpfelsäure

Sigma-Aldrich

Oligonukleotide, Sorbitol, Ethidiumbromid, Hypoxanthin, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Proteinase K, Blastocidin S, APAD, HABA, PMSF, L-Glutaminsäure, L-Glutamin,

Thermo Scientific

Pierce ECL Western Blotting Substrate

Whatman

Nitrozellulose-Transfermembran

2.1.2 Verwendete Geräte

AGFA	Curix 60
Amersham Pharmacia Biotech AB	Gelkammer SDS-PAGE
Beckman Coulter	Avanti J-26 XP
Biometra	Professional Thermocycler
Biorad	Electrophoresis Supply PowerPac Basic, Mini-Transilluminator, Gene Pulser Xcell Electroporatio System
Branson	Sonifier 250
Clean Air Techniek B.V.	Clean Air (Clean Bench)
Corbett Research	Rotor-Gene RG-3000
Daewoo	Mikrowelle Kor 102M
Denver Instruments	Laborwaage
Eppendorf	Centrifuge 5415 D (Rotor: F45-24-11); Thermomixer 5436
GFL	Schüttelwasserbad GFL 1092, Brutschrank GFL 3033
Grant-bio	PMP-30
Hamamatsu	C4742-95 Digital-Kamera
Hanna Instruments	Microprocessor pH Meter (211)
Heidolph	UNIMAX 1010 Schütteltisch; MR Hei-Standard
Heraeus	Megafuge 1.0R (Rotor: Heraeus Sepatech 2705) Minifuge RT (Rotor: BS 4402/A Heraeus Sepatech)
Janke und Kunkel	Vibrofix VF1 Vortexer

memmert-electronik	Brutschrank 37°C
Scaltec	SBA 32 Feinwaage
Stuart	rotator SB3
Sorvall	Zentrifuge Sorvall Evolution RC
Pharmacia Biotech	FPLC-System (Pump P-500, Controller LCC-501 Plus, Optical Unit-1, Frac 100)
Uvicon	Spektrophotometer 932
Zeiss	Axioskop 20, Axioskop 2 plus

2.1.3 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer und Lösung

TE	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7.5
Ampicillin	50 mg/ ml in 50 % Ethanol

SDS-PAGE und Western Blot

Trenngelbuffer	1,5 M Tris-HCl in 100 ml dH ₂ O; pH 8.9
Sammelgelbuffer	0,5 M Tris-HCl in 100 ml dH ₂ O; pH 6.7
5% Sammelgel	Sammelpuffer 1 ml; dH ₂ O 3 ml; 30 % Acrylamid/Bis 667 µl; 10 % SDS 80 µl; 10 % APS 80 µl; Temed 10 µl
10% Trenngel	Trenngelbuffer 1,5 ml; dH ₂ O 2,5 ml; 30 % Acrylamid/Bis 2,0 ml; 10 % SDS 60 µl; 10 % APS 60 µl; Temed 10 µl
Laufpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 10 % SDS
Transferpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % Methanol

PBS-Puffer	10 mM Na ₂ HPO* 2 H ₂ O; 1,8 mM KH ₂ PO* 2 H ₂ O 2,6 mM KCl; 136,9 mM NaCl; pH 7.4
Western-Strip-Lösung	50 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; pH 2.5
Coomassie-Färbelösung	1 g Coomassie Brilliant Blue 250; 500 ml Methanol; 100 ml Eisessig; 400 ml dH ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	100 ml Eisessig; 200 ml Ethanol

Agarose-Gelelektrophorese

10 x TBE	900 mM Tris; 900 mM Borat; 20 mM EDTA; pH 8.0
Ethidiumbromid	10 mg/ ml in dH ₂ O
Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 1 mM EDTA, 50 % Glycerin

Proteinexpression

AHT	Arbeitslösung: 2 mg/ ml in DMF
IPTG	Arbeitslösung: 1 M

Proteinaufreinigung

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

Strep-Aufreinigung

Puffer W	100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8.0
Elutionspuffer (10x)	1 M Tris-HCl; 1.5 M NaCl; 10 mM EDTA; 25 mM desthiobiotin; pH 8.0
HABA	1 mM HABA in Puffer W

His-Aufreinigung

Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8.0
Waschpuffer Q	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8.0
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8.0

Ni-NTA Regeneration

Regenerationspuffer	6 M Guanidiniumhydrochlorid; 0,1 M Essigsäure
EDTA Puffer	100 mM EDTA; pH 8.0
NiSO ₄ Puffer	100 mM NiSO ₄
SDS Puffer	2 % SDS

Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz	0,01 % Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7 % Ethanol; 8,5 % H ₃ PO ₄
------------------	---

gDNA Isolierung

Lysispuffer	50 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 2 % SDS; pH 8.0
Proteinase K	10 mg/ ml
Natriumacetat	3 M NaAc pH 4.6

***Plasmodium falciparum*-Kultur**

HT-PBS	16 mM Na ₂ HPO ₄ ; 4 mM NaH ₂ PO ₄ ; 126,6 mM NaCl; pH 7.2
Stabilate	30 % Glycerin in HT-PBS
Auftauen	5 % und 27 % Sorbitol in HT-PBS

Parasitenisolation	1 % Saponin in HT-PBS
Selektion	<u>WR-99210</u> Stammlösung: 20 mM in DMSO Arbeitslösung: 5 µM in RPMI-Medium <u>BSD</u> Arbeitslösung: 1 mg/ ml in dH ₂ O
Elektroporation	<u>Cytomix</u> : 10 mM KH ₂ PO ₄ ; 120 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,15 mM CaCl ₂ ; 25 mM HEPES; 2 mM EDTA; pH 7.6
Färbung der Zellkultur	Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung 1:10 verdünnt in H ₂ O
Fluoreszenzmikroskopie	<u>Zellkernfärbung</u> : Hoechst 33342 (10 mg/ ml in DMSO) Stocklösung: 10 µg/ ml in 50 % Ethanol

2.1.4 Medien für *E. coli*- und *Plasmodien*- Kulturen

LB-Agar	1,0 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto-Yeast-Extract; 1,0 % NaCl; 1,5 % Agar in dH ₂ O
LB-Medium	1,0 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto-Yeast-Extract; 1,0 % NaCl in dH ₂ O
RPMI-Medium (1 L)	15,9 g RPMI 1640, 1 g Natriumbicarbonat, 2 g D-(+)-Glucose in 800 ml dH ₂ O; 5 g Albumax II in 100 ml dH ₂ O und 27,2 mg Hypoxanthin in 2 ml 1N NaOH bei 37°C lösen; 20 mg Gentamycinsulfat; pH 7.4 ad 1 L dH ₂ O

2.1.5 Bakterien- und Plasmodien- Stämme und Vektoren

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL-10-Gold-Zellen	Agilent Technologies
----------------------------------	----------------------

<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen
<i>E. coli</i> BLR (DE3)	Novagen

Plasmodienstamm

<i>Plasmodium falciparum</i>	Wildtyp 3D7 -Wellcome Trust, Dundee
------------------------------	-------------------------------------

Plasmidvektoren

pARL1a ⁻ (Transfektion)	Crabb <i>et al.</i> , 2004
Topo-Vektor	TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)
pASK-IBA3plus	IBA, Göttingen
pACYC184	NEB
pJC40	Clos und Brandau, 1994

2.1.6 Verwendete Restriktionsenzyme

Tab. 2 Verwendete Restriktionsenzyme (NEB)

Restriktionsenzym	Units/ml
Acc65 I	10000
Avr II	4000
BamH I	20000
Bgl II	10000
BsaI-HF	20000
EcoR I	20000
Nhe I	10000
Xho I	20000
Xba I	20000
Hind III	20000
Cla I	5000
Eag I	10000
Kpn I-HF	20000
Xma I	10000

Sac II	20000
Nco I-HF	20000
Nde I	20000

2.1.7 Verwendete Software und Datenbanken

Corel Photopaint 8	Version 8.369, Eastman Kodak Company 1995-1997
Gene Runner	Version 3.05, Hastings Software Inc., 1994
Finch TV	Version 1.4.0, Geospiza Inc., 2004-2006
Openlab 5	Improvisation, Image Processing & Vision Company Limited, 2006
PyMOL	Version 0.99rc6, 2006 DeLano Scientific LLC, USA
pDRAW	Version 32 1.1.113; ACACLONE software
Roto-Gene	Run On Software Version 6.1.81; Corbett Research
Primer3Plus	Version 2.3.5; Andreas Untergasser und Harm Nijveen
NCBI-Blast	National Center for Biotechnology Information- Basic Local Alignment Search Tool http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
PlasmoDB	Version 9.3; http://plasmodb.org/plasmo/
“Malaria Parasite Metabolic Pathways”	http://priweb.cc.huji.ac.il/malaria/

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR bietet die Möglichkeit DNA *in vitro* zu vervielfältigen oder zu mutieren. Die Reaktion setzt sich aus drei Schritten zusammen, die mehrfach wiederholt werden. Zunächst wurde die DNA bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Schritte 95°C 30 sek, 46°C 1 min und 68°C für X min (je nach der zu amplifizierenden Fragmentlänge) 30mal wiederholt. Die PCRs wurden unter Verwendung der *Taq*-Polymerase in Form des PCR-Supermixes (Invitrogen), nach den Angaben des Herstellers, im Professional Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

2.2.2 Overlap-PCR (Ho *et al.*, 1989)

Hierbei handelt es sich um eine besondere Form der PCR, die es ermöglicht, größere Insertionen oder Deletionen in der DNA zu mutieren. In zwei separaten Reaktionen wurden zunächst Fragmente erzeugt, die einmal sense und in der parallelen Reaktion antisense die gewünschte Mutation enthielten (95°C 5 min, 33mal: 95°C 30 sek, 42°C 1 min und 62°C 2 min). Das eingesetzte Template wurde anschließend für eine Stunde mit *Dpn* I verdaut und nach Reinigung der PCR-Produkte mit dem PureLink™ PCR-Purification Kit (Abschnitt 2.2.5) eine weitere PCR, die jeweils 1 µl der zuvor erzeugten Teilfragmente als Template enthielt, mit den flankierenden Primern durchgeführt (62°C 2 min, 35mal: 95°C 30 sek, 42°C 1 min, 62°C 3 min). Für die Overlap-PCR wurde die *Taq*-Polymerase in Form des PCR-Supermix eingesetzt.

2.2.3 „Site-directed“-Mutagenese-PCR

Mit der „Site-directed“-Mutagenese-PCR lassen sich gezielt einzelne Basen austauschen, deletieren oder hinzufügen. Die gewünschte Mutation befindet sich sowohl im sense als auch im antisense Primer und wird mittels PCR in das Plasmid eingefügt. Für die Site-directed Mutagenese PCR wurde die *Pfu*-Polymerase nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurde die DNA bei 94°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Schritte 94°C

30 sek, 55°C 1,5 min und 68°C für X min (je nach zu mutierendem Template) 17mal wiederholt.

2.2.4 RT-PCR

Für die Reverse Transkriptase-PCR wurde die SuperScript III-One-Step RT-PCR von Invitrogen verwendet. Für die Reaktion wurden 25 µl Reaktions Mix, 1 µl s Primer (30 µM), 1 µl as Primer (30 µM), 1 µg gesamtRNA aus Plasmodien und 1 µl Enzym Mix, in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt. Die cDNA wurde nach folgendem Programm synthetisiert: 45°C 30 min, 95°C 2 min und 35mal 95°C 30 sek, 46°C 1 min, 62°C 3 min.

2.2.5 *DpnI*-Verdau und Reinigung des PCR-Produkts

Zu dem PCR-Produkt wurde 1 µl *DpnI* pipettiert und der Ansatz für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µl des verdauten Produktes direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Siehe Transformation Abschnitt 2.2.13). Die Reinigung der Produkte erfolgte mit dem PureLink™ PCR-Purification Kit von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 50 µl dH₂O eluiert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer molaren Masse. Aufgrund der negativen Nettoladung der DNA läuft diese im Agarose-Gel zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit wird dabei von der DNA-Konformation, der Feldstärke und der eingesetzten Agarose-Konzentration bestimmt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, ist es möglich diese durch Anregung mit UV-Licht sichtbar zu machen. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese zunächst mit einem Ladepuffer versehen. Die zurückgelegte Laufstrecke wurde mittels des im Ladepuffer enthaltenen Bromphenolblaus und des Xylencyanolblaus verfolgt. Zur Auftrennung der DNA wurde ein 1%iges Agarosegel in 1x TBE angesetzt. Die Elektrophorese wurde für eine Stunde bei 120 V durchgeführt.

2.2.7 Isolierung von DNA aus einem Agarose-Gel

Die Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel wurde mit dem PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) durchgeführt. Die DNA-Fragmente (PCR oder Verdau-Produkte) wurden in einem 1%igem Agarose-Gel per Elektrophorese für eine Stunde bei 120 V aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde aus dem Gel herausgeschnitten und nach den Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA in 50 µl warmen dH₂O eluiert.

2.2.8 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, um die zuvor generierten Fragmente in den entsprechenden Vektor zu klonieren oder zuvor klonierte Plasmide zu kontrollieren. Der Verdau erfolgte mit den im Abschnitt 2.1.6 in Tabelle 2 aufgelisteten Enzymen (NEB), nach Angaben des Herstellers, unter Verwendung des jeweiligen Puffers. Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Ein analytischer Verdau wurde in einem Volumen von 20 µl angesetzt und zur Klonierung wurde das gereinigte PCR-Produkt in 50 µl und der Vektor in 100 µl verdaut.

2.2.9 Ligation

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Diese bestand aus 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 13 µl zuvor verdaulichem PCR-Produkt (Insert), 4 µl ebenso verdaulichem Vektor und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 000 U/ ml). Bei 14°C wurden das Insert und der Vektor über Nacht ligiert. Anschließend wurden die Plasmide in *E. coli* transformiert.

2.2.10 Transformation

100-200 µl kompetente *E. coli*-Zellen (Abschnitt 2.1.5) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die gesamte Ligation (20 µl) bzw. 10 µl des PCR-Ansatzes dazu pipettiert. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für eine Minute und eine anschließende Abkühlung für eine Minute auf Eis. Anschließend wurden 700 µl LB-Medium dazu gegeben und

die Zellen bei 37°C schüttelnd für 45 min inkubiert. Der Ansatz wurde für eine Minute bei 10000 rpm (Eppendorfzentrifuge 5415 D) zentrifugiert, das Medium bis auf ein Pelletvolumen abgenommen und die Zellen im restlichen LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf einem LB-Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden 3 ml Kulturen zur Plasmidisolierung (siehe Plasmidisolierung Abschnitt 2.2.13) angeimpft.

2.2.11 Kolonie-PCR

Zur Identifikation möglichst vieler korrekter Klone wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Kolonien direkt von der Agar-Platte gepickt und in je 100 µl LB-Medium resuspendiert. Diese Ansätze wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Je 2 µl pro Ansatz wurden für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurden drei Kolonien pro PCR-Ansatz, wie unter 2.2.1 beschrieben, analysiert. Wenn das gewünschte Fragment mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Agarose-Gelelektrophorese Abschnitt 2.2.6) identifiziert werden konnte, wurden von jedem der drei Ausgangsansätze jeweils eine 3 ml Kultur zur Plasmidisolierung angeimpft und wie unter 2.2.15 beschrieben untersucht.

2.2.12 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Von einer *E. coli*-Kolonie wurde eine Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in LB-Medium überimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 bis 0,7 angezogen. Die Bakterienkultur wurde für 15 min in Eiswasser abgekühlt. Alle darauf folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Kultur wurde für 15 min bei 3000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) pelletiert. Die Überstände wurden vollständig entfernt und die Pellets in je 10 ml 80 mM CaCl₂ gelöst. Nach 40-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension wiederum für 15 min bei 3000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) pelletiert. Die Überstände wurden entfernt und die Pellets in je 2 ml 80 mM, 20% Glycerin gelöst. Daraufhin wurden je 200 µl der Zellen in vorgekühlten 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.13 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung wurde aus 2 ml Übernacht-Kultur mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (peqlab) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl dH₂O eluiert. Zur Plasmidisolierung aus einer 500 ml Übernacht-Kultur wurde das Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Zur Transfektion von *Plasmodien* wurde die erhaltene DNA in 120 µg Aliquots aufgeteilt, mit 2,5 Vol absolutem Ethanol und 0,01 Vol 3 M NaAc gefällt und bei -20°C eingefroren.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen (Sanger *et al.*, 1977) der isolierten Plasmide wurde bei der Firma SeqLab durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 7 µl befanden sich stets 650 ng DNA und 20 pmol Primer.

2.2.15 Präparation genomischer DNA aus *P. falciparum*

Zunächst wurde ein mit Saponin isoliertes Pellet von *P. falciparum* (Abschnitt 2.4.8) mit 700 µl Lysispuffer versehen und die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren aufgeschlossen. Die lysierten Zellen wurden mit 7 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) bei 37°C über Nacht behandelt. Nach anschließender Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Suspension mit 0,3 Vol gesättigter NaCl-Lösung vermischt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die so gefällten Zelltrümmer wurden für 15 min bei 4600 rpm (Eppendorfszentrifuge 5415 D) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 20 µg/ml RNase A versetzt. Daraufhin wurde der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA mit 1 Vol Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1). Nach invertieren, wurde der Ansatz für eine Minute bei 14000 rpm (Eppendorfszentrifuge 5415 D) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Phenol mit 1 Vol Chloroform entfernt. Nach einer Zentrifugation für eine Minute bei 14000 rpm (Eppendorfszentrifuge 5415 D), wurde die DNA (obere Phase) in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, mit 2,5 Vol eiskaltem absolutem Ethanol versetzt und anschließend für 30 min bei -20°C gelagert. Die dadurch gefällte DNA wurde

durch eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14000 rpm (Eppendorfszentrifuge 5415 D) pelletiert und das DNA-Pellet anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets, wurde die DNA in 50 µl warmem TE-Puffer gelöst und die Konzentration, wie unter 2.2.18 beschrieben, bestimmt.

2.2.16 Isolation von gesamtRNA aus *P. falciparum*

Parasiten einer *Plasmodien*-Kultur wurden zunächst, wie in 2.4.6 beschrieben, mittels Saponin isoliert und das Zellpellet in 1ml Trizol resuspendiert. Der Ansatz wurde daraufhin mit 200 µl Chloroform versehen und die Suspension für 30 min bei 10000 rpm (Eppendorf 5415 D) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Durch Inkubation der Probe für zwei Stunden auf Eis wurde die RNA ausgefällt und mit 10000 rpm (Eppendorf 5415 D) bei 4°C für 30 min abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 10 µl Formamid bei 60°C für 10 min gelöst. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration mit dem Spektrophotometer bei 260 nm bestimmt und die Probe bei -80°C gelagert.

2.2.17 DNaseI-Verdau

Um DNA-freie RNA zu generieren, welche anschließend für die cDNA-Synthese verwendet werden kann, wurde die RNA mit dem RQ1 RNase-free DNase Kit (Promega) nach den Angaben des Herstellers behandelt und daraufhin die RNA-Konzentration bestimmt (Abschnitt 2.2.18).

2.2.18 Bestimmung der DNA- oder RNA- Konzentration und Reinheit

Die Konzentrationen der DNA- bzw. RNA- Proben von Plasmidisolierungen (2.2.13) oder isolierter DNA (2.2.15) bzw. RNA (2.2.16) wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophotometer bestimmt. Die Probe wurde 1:100 mit dH₂O verdünnt und gegen dH₂O als Referenz in Quarzküvetten gemessen. Die Konzentration wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

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

c = DNA- bzw. RNA- Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
 ϵ = Extinktionskoeffizient ($\epsilon = 50$ dsDNA; 40 RNA)
f = Verdünnungsfaktor

Die Reinheit der Proben errechnet sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm durch die Absorption bei 280 nm. Bei einem Wert von $A_{260/280}$ gleich 1,8 gilt die DNA als rein. Der $A_{260/280}$ -Wert für reine RNA liegt bei 2,0.

2.2.19 Reverse Transkription für quantitative PCR

Zunächst wurde 1 μg RNA mit 1 μl Random Primer (300 ng/ μl ; Invitrogen) und 1 μl dNTPs (10 mM; Invitrogen) zu einem Gesamtvolumen von 13 μl mit RNase-freiem dH_2O aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Daraufhin wurde der RT-Mix, bestehend aus 4 μl RT-Puffer (5x), 1 μl DTT (100 mM), 1 μl RNase-Out (40 U/ μl) und 1 μl SuperScript III (200 U/ μl) bzw. RNase-freies dH_2O zu den oben beschriebenen Ansätzen pipettiert. Dabei wurde je ein RNA-Ansatz mit SuperScript III und einer ohne das Enzym angesetzt, um sicherzustellen, dass keine DNA in den cDNA-Proben enthalten ist. Die cDNA-Synthese wurde für zwei Stunden bei 42°C durchgeführt und die Proben anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.20 Quantitative real-time PCR

Bei dieser PCR-Methode handelt es sich um eine äußerst sensitive Möglichkeit zum Nachweis von Nukleinsäuren, mit der sich minimale Änderungen in der Genexpression detektieren lassen. Hierbei wird der Farbstoff SYBR Green verwendet, welcher durch Anregung mit ultraviolettem Licht, nur nach Einlagerung in die DNA, fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität korreliert demzufolge direkt mit der vorhandenen Menge an doppelsträngiger DNA.

Um das gewünschte Fragment zu amplifizieren wurden 2 μl genspezifischer sense Primer (5 pmol/ μl) und 2 μl genspezifischer antisense Primer (5 pmol/ μl) mit 9 μl 2,5x Real Master Mix SYBR (20x; 5Prime) und 6 μl RNase-freiem dH_2O zusammen pipettiert. Anschließend wurde 1 μl cDNA (50 ng/ μl) zugesetzt. Die

verwendeten Primer mit entsprechender Sequenz, Schmelztemperatur und Fragmentgröße sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Vervielfältigung der DNA und der Einbau des SYBR Green erfolgten im Thermocycler (Corbett Cycler) durch einmalige 2 min bei 95°C und 35-maliger Wiederholung von 95°C 15 sek, 49°C 20 sek, 69°C 20 sek und dem abschließenden Schritt 95°C 2 min.

Um die Reinheit der Proben zu überprüfen, wurde für jede RNA eine negativ Kontrolle angesetzt, welche keine SuperScript III während der cDNA-Synthese enthielt und somit in der quantitativen real-time PCR kein Signal angezeigt werden darf. Zur Normalisierung der Daten, wurde die Aldolase verwendet, welche während der Blutphase der Plasmodien nicht reguliert wird. Als Kalibrator wurde die jeweilige Mock-Zelllinie eingesetzt.

Tab. 3 Sequenzen, Schmelztemperatur sowie Funktion und Fragmentgröße der Oligonukleotide für die quantitativen RT-PCRs. Die verwendeten Primer-Sequenzen wurden mit der Software Primer3Plus 2.3.5 generiert.

Name	Sequenz (5' - 3')	Tm (°C)	Funktion/ Fragmentgröße
qPCR-Aldolase-s	TGTACCACCAGCCTTACCAG	62,6	Normalisator
qPCR-Aldolase-as	TTCCTTGCCATGTGTTCAAT	62,9	167 bp
qPCR-AspAT-s	CGCCTTTTCGGTATGTCAATCC	68,2	Goi
qPCR-AspAT-as	AGTTGGCATAGAATACGATTCGT	62,5	183 bp
qPCR-MDH-s	CCCAGCTGCTGCTATTACAA	62,9	Goi
qPCR-MDH-as	CTGGATGTGCCCCCTTATTA	63,5	152 bp

Zur Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes, mit der Software Rotor-Gene Version 6.1, wurde die $\Delta\Delta CT$ -Methode angewandt (Livak und Schmittgen, 2001), bei der die Expression eines Zielgens (Goi) auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (Normalisator) bezogen und aus den ΔCT -Werten beider Gruppen anschließend der $\Delta\Delta CT$ -Wert nach folgender Formel berechnet wird:

$$2^{-[(\text{Goi CT} - \text{Normalisator CT}) - (\text{Goi CT} - \text{Normalisator CT})]}$$

ΔCT Experimentelle Zelllinie ΔCT Kalibrator Zelllinie (Mock)

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Rekombinante Expression

Für die Expression der verschiedenen Konstrukte wurden diese in *E. coli* BLR-DE3 transformiert und eine Einzelkolonie in Ampicillin-haltiges LB-Medium (50 µg/ ml) überführt. Diese wurde über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Mit 5 ml der Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 500 ml LB-AMP-Medium angeimpft und bis zu einer A_{600} von 0,5 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur mit AHT (2 mg/ ml) 1/10000 induziert und für weitere vier Stunden bei 37°C wachsen gelassen. Durch Abzentrifugieren der Expressionskulturen für 10 min bei 8000x g wurde die Expression beendet. Das erhaltene Pellet wurde, je nach Affinitäts-Tag, in 30 ml Lysepuffer (His-Tag) oder 30 ml Puffer W (Strep-Tag) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.3.2 Co-Expression

Um eine Co-Expression in *E. coli* durchführen zu können, ist ein zweites Plasmid notwendig welches nicht wie der pASK-IBA3plus Vektor (Invitrogen) mit AHT sondern mit IPTG induziert und mit Chloramphenicol (CAM) und nicht AMP selektioniert wird. Damit beide Plasmide in der Zelle verbleiben und vervielfältigt werden, muss das Plasmid einen anderen Replikationsursprung besitzen. Dafür wurde der pBM1-Vektor generiert, dessen Klonierung in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben ist. Zunächst wurden expressionsfähige *E. coli*-Zellen, welche das Gen für die T7-Polymerase enthielten (BLR DE3), mit einem der Plasmide transformiert (Abschnitt 2.2.10) und anschließend kompetent gemacht (Abschnitt 2.2.12). Daraufhin wurde das zweite Konstrukt in die Zellen transformiert und eine Einzelkolonie, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, für die Expression verwendet. Das LB-Medium enthielt bei der Co-Expression jedoch sowohl Ampicillin (50 µg/ ml) also auch Chloramphenicol (20 µg/ ml) zur Selektion. Die optimalen Expressionbedingungen der jeweiligen Proteine wurden ausgetestet und durch Zugabe des jeweiligen Induktors, AHT (2 mg/ ml) bzw. IPTG (0,1 mM bis 1 mM), gestartet.

2.3.2.1 Klonierung des pBM1-Vektors für Co-Expressionen in *E. coli*

Um den pBM1 zu generieren, wurde die Expressionskassette des pJC40 in das pACYC184-Plasmid (NEB) kloniert. Der pACYC184-Vektor besitzt einen p15A-ori, welcher es ermöglicht mit Plasmiden mit einem ColE1-ori (pASK-IBA3plus) in einer Zelle zu co-existieren. Außerdem wird das Plasmid mittels Chloramphenicol selektioniert. Die Expressionskassette des pJC40 beinhaltet einen T7-Promotor, welcher einer T7-RNA Polymerase unterliegt, die durch IPTG induziert wird. Die Expressionskassette mit dem N-terminalen His-Tag und der anschließenden MCS wurden mit den Primern ClaI-T7Primer-sense (5' GCGCATCGATTAATACGACTCACTATAGGG 3') und EagI-pJC40-as (5' GCGCCGGCCGGTTAGCAGCCGGATCAGTTAGC 3') von pJC40 amplifiziert und über die jeweiligen Restriktionsenzyme (ClaI und EagI) in den ebenso geschnittenen pACYC184 kloniert. In Abbildung 14 ist das generierte Plasmid pBM1 schematisch dargestellt.

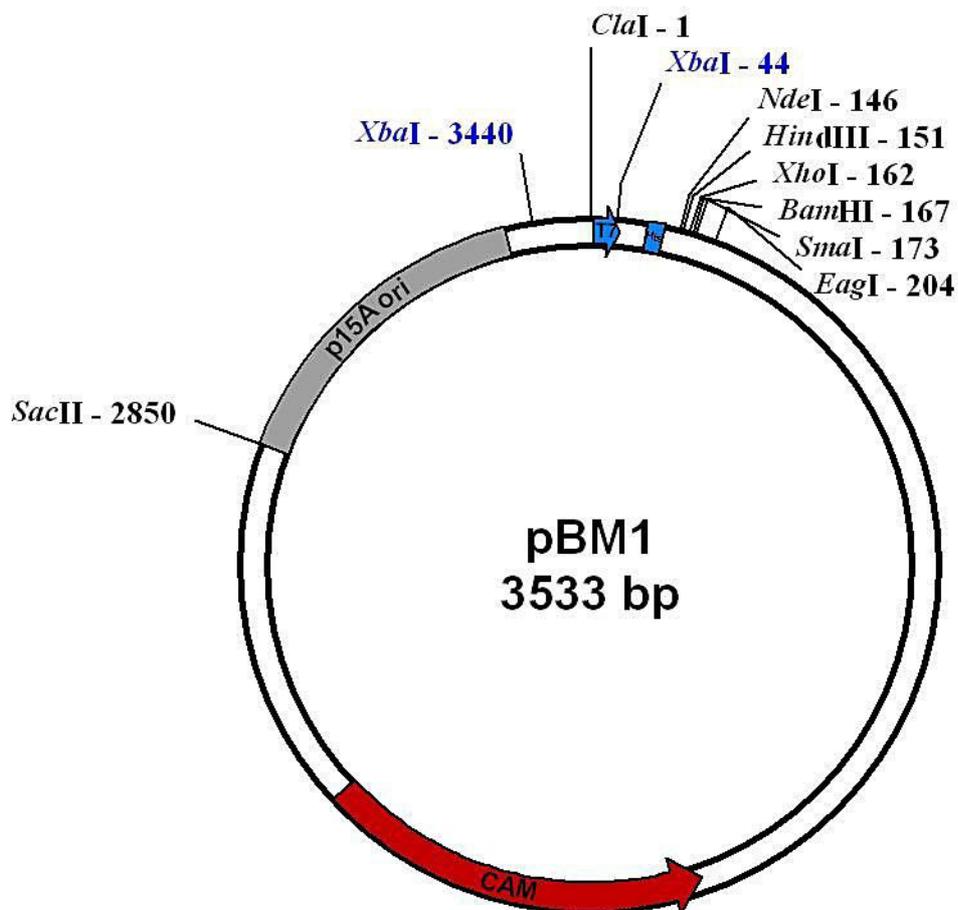


Abb. 14 Schematische Darstellung des pBM1-Vektors. Die Vektorkarte wurde mit dem Programm pDraw32 erstellt. p15A ori: (Origin of Replication) Replikationsursprung mit einer Kopienzahl von 10 bis 12. CAM: Chloramphenicol-Resistenzkassette. T7: T7-Promotor

2.3.3 Bakterienaufschluss zur Proteinisolation

Das zuvor eingefrorene Bakterienpellet wird zunächst in einem Wasserbad bei RT aufgetaut und anschließend mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt. Nach 10-minütigem, rollendem Inkubieren bei RT, wird der Proteinaseinhibitor PMSF (0,1 M) in einem Volumen von 1/1000 dazugegeben. Durch beschallen der Bakterien in einem Banson Sonifier bei 40 kHz werden die Bakterien aufgeschlossen und anschließend bei 50000x g für eine Stunde und 4°C zentrifugiert (Avanti, Beckman). Der erhaltene Überstand wird daraufhin je nach Affinitäts-Tag aufgereinigt.

2.3.4 Proteinaufreinigung über einen His-Tag

Um Proteine über einen His-Tag aufzureinigen, wurde eine Ni-NTA Agarose in eine Leersäule pipettiert. Diese wurde vor Zugabe des Überstandes des Bakterienlysates mit Lyse-Puffer equilibriert. Der Überstand wurde anschließend bis zu dreimal über die Matrix gegeben. Zum Waschen der Matrix wurde diese dreimal mit Waschpuffer (Puffer Q) versetzt. Die Proteine wurden daraufhin mit dem Elutionspuffer E eluiert.

2.3.4.1 Regeneration der Ni-NTA

Um die Nickel-Matrix erneut verwenden zu können, wird diese der Reihe nach in verschiedenen Lösungen aufgenommen, jeweils kurz gewaschen und anschließend bei 1000x g für 2 min bei 4°C zentrifugiert. Der jeweilige Überstand wird verworfen. Ausschließlich im NiSO₄-Puffer wird die Matrix für 30 min inkubiert. In Tabelle 4 sind die verschiedenen Lösungen und die zu verwendenden Volumina aufgeführt.

Tab. 4 Lösungen und Volumina zur Regeneration der Ni-NTA-Matrix

Lösung	Matrix-Volumen
H ₂ O	5
SDS Puffer	3
25 % EtOH	1
50 % EtOH	1

75 % EtOH	1
100 % EtOH	5
75 % EtOH	1
50 % EtOH	1
25 % EtOH	1
H ₂ O	1
EDTA Puffer	5
H ₂ O	2
NiSO ₄ Puffer	2
H ₂ O	2
Regenerations Puffer	2
H ₂ O	1
30 % EtOH	1

2.3.5 Proteinaufreinigung über einen Strep-Tag

Für die Proteinaufreinigung über einen Strep-Tag wurde 1 ml Strep-Tactin-Sepharose (50% Suspension) auf eine Leersäule gegeben und mit einem Säulenvolumen Puffer W equilibriert. Daraufhin wurde der Überstand des Bakterienlysates bis zu dreimal über die Säule gegeben und anschließend der Durchlauf verworfen. Die Matrix wurde mit 3x je einem Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Zuletzt wurden die Proteine mit 2 ml Puffer E, welcher Desthiobiotin enthält, von der Matrix eluiert.

2.3.6 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Protein-Konzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet an die basischen Aminosäuren, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt und die Proteinkonzentration anhand einer Eichung mit Rinderserumalbumin (BSA) photometrisch am Spektrophotometer ermittelt werden konnte.

2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Aufgrund ihrer Ladung lassen sich Proteine im Polyacrylamid-Gel in einem elektrischen Feld der Masse nach auftrennen. Es wurden 20-30 µg Protein mit SDS-Probenpuffer versehen und für 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge 5415 D) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine bei einer Stromstärke von 35 mA getrennt. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel.

2.3.8 Coomassie-Gel-Färbung

Die Proteinbanden im Polyacrylamid-Gel können mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt werden. Hierzu wurde das Polyacrylamid-Gel für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff mittels Entfärbelösung ausgewaschen.

2.3.9 Western-Blot-Analyse

Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurde dieses für 90 min bei 35 mA auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman, Protran), mittels Semi-Dry-Verfahren, geblottet. Anschließend wurde die Membran entweder über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei RT in PBS mit 5 % BSA geblockt. Die Membran wurde mit dem 1. Antikörper bei RT für eine Stunde inkubiert (in PBS mit 0,03 % Tween 20; 1 % BSA, 1:5000 bis 1:10000 verdünnt). Nach dreimaligem Waschen der Membran für fünf min in PBS und 0,3 % Tween 20, wurde die Membran für eine Stunde mit dem 2. Antikörper, 1:10000 verdünnt, inkubiert (in PBS mit 0,03 % Tween 20; 1 % BSA). Im Folgenden wurde der Blot wie oben beschrieben gewaschen. An den 2. Antikörper ist eine Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, die es ermöglicht, das Protein mittels Chemilumineszenz, unter Verwendung des ECL-Western Blotting Substrate Kit, nach Angaben des Herstellers, zu detektieren. Anschließend wurden die entsprechenden Signale 30 sek bis 30 min auf einem Röntgenfilm detektiert.

2.3.10 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Um einen Western-Blot erneut zu detektieren, müssen die Antikörper von der Nitrozellulosemembran entfernt werden. Hierfür eignen sich Säuren, da diese die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den Antikörpern zerstören, während die Bindungen der Proteine auf der Membran bestehen bleiben. Durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in 10 ml Western-Strip-Lösung für 5 min, werden die Antikörper von der Membran gelöst. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 40 µl 1 N NaOH gestoppt. Nach anschließendem Waschen der Membran für 10 min mit 0,3 % Tween 20 in PBS, wurde diese mit 3 % BSA geblockt und konnte, wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben, wieder neu beprobt werden.

2.3.11 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die Flüssigkeitschromatographie ermöglicht die Separierung von Proteinen unter Wechselwirkung mit verschiedenen Phasen (unpolare und polare Phase). Bei der FPLC werden die Proteine mit niedrigen Drücken und einer gepufferten mobilen Phase getrennt. Dies ermöglicht die Untersuchung des oligomeren Status von Proteinen und deren molekulare Masse. Es wurde jeweils ca. 1 mg Protein auf eine Superdex 75-Säule (HiLoad 16/ 60) von GE Healthcare geladen und in Puffer W in 2 ml Fraktionen getrennt. Die Proteinmenge der einzelnen Eluate wurde mit der Bradford-Methode (Abschnitt 2.3.6) gemessen und die entsprechenden Größen der Proteine über den Vergleich mit der in Abbildung 14 gezeigten Eichgeraden bestimmt.

Für die Eichgerade wurden 100 µl Protein-Eichstandard (BioRad) über die Superdex 75-Säule aufgetrennt und die Proteinmengen der Fraktionen mittels Bradford bestimmt (Abbildung 15; linke y-Achse). Anschließend wurden die Größen der verwendeten Standard-Proteine in dem in Abbildung 15 dargestellten Graphen, ausgerichtet an der rechten y-Achse mit logarithmischer Skalierung, gegen die Eluationsvolumina aufgetragen.

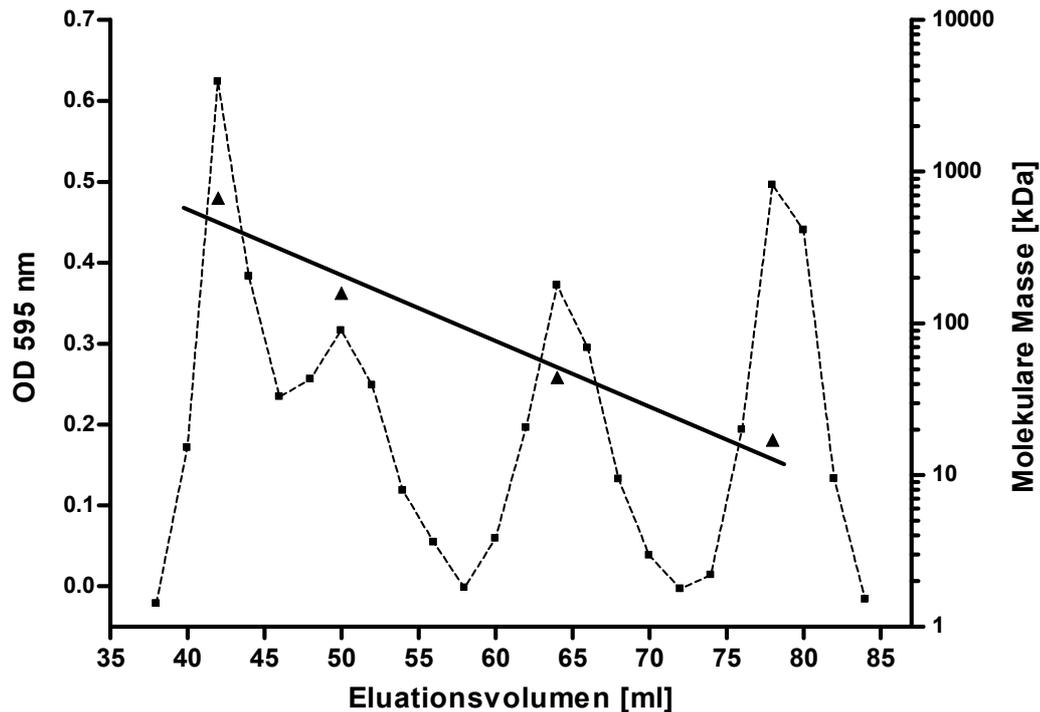


Abb. 15 Eichgerade der Superdex 75-Säule (HiLoad 16/ 60) mit den BioRad Standard-Komponenten. Quadrat: Absorption der Eluatfraktionen nach Proteinmessung mit Bradford (y-Achse links). Dreiecke: Molekulare Masse der Eichstandard-Proteine Thyroglobulin 670 kDa, γ -Globulin 158 kDa, Ovalbumin 44 kDa, Myoglobin 17 kDa (y-Achse rechts).

2.3.12 Static Light Scattering (SLS)

Bei dieser Methode wird die Streuintensität des Lichtes in Abhängigkeit vom Streuwinkel analysiert. Dies ermöglicht die Bestimmung der Molekularen Masse und Größe der Proteine. Die Proteine wurden über eine Superdex 200-Säule (GE Healthcare) aufgetrennt, welche mit einem 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl-Puffer (pH 8.0) im Voraus equilibriert wurde. Die SLS-Daten wurden mit einem miniDAWN Tristar (Wyatt Technologies, USA) aufgezeichnet und anschließend mit der Software ASTRA 5.3.4.11 analysiert.

2.4 Methoden der Zellbiologie

2.4.1 Zellkulturführung

Plasmodium falciparum Wildtyp-Zellen (3D7) wurden in 10 ml 90 mm Petrischalen (Nunc, Denmark) oder in 50-100 ml Kultur-Flaschen kontinuierlich in Kultur gehalten (Trager und Jensen, 1976). Die Parasiten wurden bei 4 % Hämatokrit in humanen Erythrozyten (Blutgruppe O⁺), in RPMI 1640 Medium ergänzt mit 25 mM HEPES, 20 mM Natriumbicarbonat und 0.5 % AlbuMAX II (Invitrogen, Germany) kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C unter einer Atmosphäre von 90 % N₂, 5 % O₂ und 5 % CO₂ inkubiert. Je nach Parasitämie wurden die Kulturen alle zwei Tage verdünnt. Bei einer Parasitämie um 1 % wurde nur ein Mediumwechsel durchgeführt. Zur Selektion der transgenen Zelllinien wurde entweder WR99210 in Konzentrationen von 5 nM bis 50 nM oder 1 µg/ ml bis 3 µg/ ml BSD zugegeben.

2.4.2 Zellausstriche zur Bestimmung der Parasitämie

Es wurden 10 µl der Zellsuspension auf Objektträgern ausgestrichen und nach Lufttrocknung für 10 sek mit Methanol fixiert. Die Färbung der Ausstriche erfolgte mit 1:10 verdünnter Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung für 20 bis 40 min. Anschließend wurden die Ausstriche am Mikroskop (Axioskop 20) ausgewertet.

2.4.3 Transfektion von *Plasmodium falciparum*

2.4.3.1 Transfektion von *Plasmodien* im Ringstadium

Die Elektroporation von *Plasmodien* im Ringstadium wurde nach der Methode von Crabb *et al.*, 2004 durchgeführt, wobei die Plasmid-DNA direkt in den Parasiten transfiziert wird. Hierfür wurden 120 µg DNA in 30 µl warmem TE-Puffer gelöst und mit 220 µl Cytomix versehen. Zu dem Ansatz wurden 220 µl *Plasmodien*-Kultur dazu pipettiert, welche im Voraus bei 4°C und 1000 rpm (Heraeus Minifuge RT) für 10 min pelletiert wurde. Nach Zugabe von 200 µl Erythrozyten wurde der Ansatz in GenePulser Küvetten überführt und die Elektroporation bei einer Spannung von 0,31 kV, 900 µF mittels Gene Pulser

Xcell (BioRad) elektroporiert. Die Zellen wurden nach der Elektroporation direkt in 15 ml vorgewärmtem RPMI-Medium resuspendiert und bei 37°C inkubiert. Nach ein bis vier Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Selektionsdroge wurde nach 24 Stunden dazugegeben. Das Medium wurde während der ersten sieben Tage täglich gewechselt und das Selektionsmittel dazugegeben. Danach erfolgte die Zellkulturführung alle zwei Tage bis transgene Zellen sichtbar wurden.

2.4.3.2 Elektroporation von Erythrozyten

Bei dieser Methode nach Deitsch *et al.*, (2001) wird die Fremd-DNA per Elektroporation in die Erythrozyten eingebracht von wo aus sie während der Invasion der Parasiten aufgenommen wird. Hierzu wurden frische Erythrozyten mit einem 10fachen Volumen an Cytomix versehen und für 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz bei 1000 rpm (Heraeus Minifuge RT) für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. 120 µg Plasmid-DNA wurden in 50 µl warmem TE-Puffer gelöst, mit 450 µl der mit Cytomix gewaschenen Erythrozyten vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 310 V und 900 µF mit dem Gene Pulser Xcell (BioRad). Gleich darauf wurde der Ansatz in Zellkulturschalen mit 15 ml warmem RPMI 1640-Medium resuspendiert. 50 µl einer zuvor bei 1000 rpm (Heraeus Minifuge RT) für 10 min pelletierten *Plasmodien*-Kultur, die vorwiegend reife Schizonten enthielt, wurde zu den transfizierten Erythrozyten gegeben. Nach zwei Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden, wie unter 2.4.3.1 beschrieben, weiterbehandelt.

2.4.4 Einfrieren von *Plasmodien*-Kulturen

Kulturen mit einer Parasitämie von rund 3 %, die vorwiegend Ringstadien enthalten, können eingefroren werden. Hierfür wurde die Kultur in ein 15 ml Falcontube überführt und bei RT für 10 min bei 1000 rpm (Heraeus Minifuge RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Pelletvolumen abgenommen und in 30 % Glycerin in HT-PBS resuspendiert, bis der gesamte Ansatz eine Konzentration von 15 % Glycerin aufwies. Je 0,5 ml der Suspension wurden in ein NUNC-Cryo-Röhrchen gegeben, für 10 min auf Eis gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4.5 Auftauen von *Plasmodien*-Stabilaten

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Stabilate wurden unter leichtem Schütteln im 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Daraufhin wurden die Zellen in ein 15 ml Falcontube überführt und tropfenweise, unter stetigem Schütteln, mit 2 Vol 27 % Sorbitol (4°C) versehen. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden 2 Vol 5 % Sorbitol (4°C) hinzugegeben und die Ansätze wiederum für 10 min auf Eis gestellt. Im Folgenden wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 1000 rpm (Heraeus Minifuge RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml RPMI-Medium komplett resuspendiert und in eine Petrischale überführt. Es wurden Erythrozyten dazu pipettiert, sodass sich ein 4%iger Hämatokrit ergab. Das Medium wurde nach einer Stunde gewechselt.

2.4.6 Synchronisation der Parasiten mittels Sorbitol

Eine Plasmodienkultur die hauptsächlich Ringstadien enthält wurde für 5 min bei 1500 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 5 Vol 5 % Sorbitol in HT-PBS resuspendiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C und 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet wiederum in RPMI-1640 resuspendiert und die Zellen, wie unter 2.4.1 beschrieben, normal kultiviert.

2.4.7 IC₅₀ Bestimmung über Einbau von radioaktivem Hypoxanthin

Bei dieser Methode wird sich zunutze gemacht, dass *P. falciparum* auf das Hypoxanthin im Kulturmedium angewiesen ist, da der Parasit keine *de novo*-Biosynthese für Purine besitzt. Somit korreliert die, durch Zugabe von radioaktiv markiertem [³H]-Hypoxanthin, in die Nukleinsäure eingebaute Radioaktivität mit dem Wachstum der Plasmodien. Bei Zugabe von Inhibitoren oder durch veränderte Wachstumsbedingungen, kann somit der Einfluss auf die Viabilität der Kultur über den Einbau von radioaktivem [³H]-Hypoxanthin gemessen werden.

Der Versuch wurde in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt und je 100 µl Hypoxanthin-freies RPMI Medium in alle Wells, außer in Reihe 12, vorgelegt. In

Reihe 3 wurden zusätzliche 100 µl Hypoxanthin-freies RPMI Medium pipettiert. und die zu testende Substanz in 3fach-Bestimmung dazu gegeben. Anschließend wurden die Ansätze mit der Achtkanal-Pipette gemischt und jeweils 100 µl in die benachbarte Reihe überführt und ebenfalls gemischt. So wurden jeweils acht 1/2-Verdünnungen der entsprechenden Substanz angesetzt. Daraufhin wurden 100 µl Zellkultur, welche vorher in Hypoxanthin-freiem Medium gewaschen wurde, in die Wells gegeben, wobei der Randbereich ausgelassen wurde. Die Zellkultur weist, je nachdem ob ein 48 h bzw. 96 h-Test durchgeführt wurde, eine 2 %- bzw. 1 %- Parasitämie und einen 4 %- bzw. 2 %- Hämatokrit auf. Nach Inkubation der Zellen für 24 h bzw. 72 h bei 37°C wurden zu jedem Ansatz 10 µl [³H]-Hypoxanthin gegeben und die Platte für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde daraufhin bei -20°C eingefroren und am nächsten Tag aufgetaut. Dadurch wurde eine Lyse der Zellen ermöglicht. Anschließend wurden die Zellen mit einem Inotech IH110 Cell Harvester über ein Vakuum auf eine Filtermatte transferiert, welche danach für 20 min bei 70°C getrocknet wurde. Das Filterpapier wurde in eine Plastiktüte eingeschweißt und mit 4 ml Betaplate Scint Szintillationsflüssigkeit luftblasenfrei befeuchtet.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels eines Trilux Liquid Scintillation Counters (Wallac).

2.4.8 Isolation von *Plasmodien* mittels Saponin-Lyse

Bei 1500 rpm (Heraeus Minifuge RT) und 4°C wurden die Zellen für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Erythrozyten wurden durch Zugabe von 0,05 % Saponin, welches vorher auf 37°C erwärmt wurde, lysiert und bei 2800 rpm (Heraeus Minifuge RT) bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Parasiten-Pellet in 500 µl HT-PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm (Eppendorfszentrifuge 5415 C) wurde der Überstand entfernt und das Pellet auf Eis gelagert. Für die anschließende Analyse der Plasmodien-Extrakte im Western-Blot wurde das Pellet in 1 Vol dH₂O resuspendiert und mit 4x SDS versehen und bei -20°C gelagert.

2.4.9 Isolation der Parasitenstadien mittels Percoll-Gradient

Der Gradient besteht aus vier Schichten Percoll in RPMI-1640, 0.9 % NaCl und 3 % L-Alanin (von unten nach oben: 90 % (8 ml), 80 % (5 ml), 70 % (5 ml) und 60 % (5 ml)), welche in einem 50 ml Falcontube geschichtet werden. Die Kultur wurde für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 0.9 % NaCl mit 3 % L-Alanin resuspendiert und im Anschluss vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Daraufhin wurde der Ansatz bei 4000 rpm für 20 min und RT zentrifugiert. Die Schicht zwischen den 60 % und 70 % Percollschichten enthält hauptsächlich Schizont, die Trophozoiten sind in der 80 %-Schicht zu finden und die Ringe sammeln sich oberhalb der 90 % Percollschicht. Vor dem resuspendieren der Zellen in normalem Kulturmedium, wurden diese noch dreimal mit 0,9 % NaCl gewaschen.

2.4.10 Fluoreszenzmikroskopie

Die transgenen Zelllinien wurden ab einer Parasitämie von 5 % fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es wurden jeweils 0,5 ml Kultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit Hoechst (10 ng/ ml) versehen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden 25 µl des jeweiligen Ansatzes auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Zellen wurden anschließend am Fluoreszenzmikroskop unter 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert.

2.4.11 Erstellen von Wachstumskurven

Zum Erstellen von Wachstumskurven wurden täglich Ausstriche der Kulturen angefertigt. Mindestens 500 Erythrozyten wurden blind gezählt und die Parasitämie als Prozentwert infizierter Erythrozyten bestimmt. Abhängig von der berechneten Parasitämie wurde entweder nur ein Mediumwechsel durchgeführt oder die Kultur 1:2 bzw. 1:5 verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wurde in die Berechnung der Parasitämie mit einbezogen. Das Wachstumsverhalten wurde, je nach Experiment, für mindestens sechs Tage verglichen. Zum Start einer Wachstumskurve, wurde von der zu analysierenden Plasmodienkultur zunächst ein Ausstrich angefertigt und die Parasitämie berechnet. Daraufhin wurde die

Kultur auf eine Parasitämie von ca. 0,5 % verdünnt und zwei identische Kulturschalen angesetzt. Anschließend wurde je nach Versuch eine Kultur entsprechend behandelt und die andere parallel als Kontrolle kultiviert.

2.5 Methoden zur Analyse des Zusammenhangs von PLP und $^{18}\text{O}_2$

2.5.1 Generierung des pARL-Pdx1-K83A-Strep Überexpressionskonstruktes

Das Überexpressionskonstrukt pARL-Pdx1K83A-Strep wurde mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Avr II und dem Template pASK-IBA3-Pdx1K83A-Strep (Knöckel *et al.*, 2012) generiert und anschließend in den pARL-1a⁻ Vektor kloniert. In Tabelle 5 sind die verwendeten Oligonukleotide gezeigt. Das fertige Plasmid (Abbildung 16) wurde anschließend in 3D7-Plasmodien transfiziert bzw. für die Co-Expression mit pARL-Pdx2E53Y-Myc in transgene 3D7-Pdx2E53Y-Myc Plasmodien transfiziert.

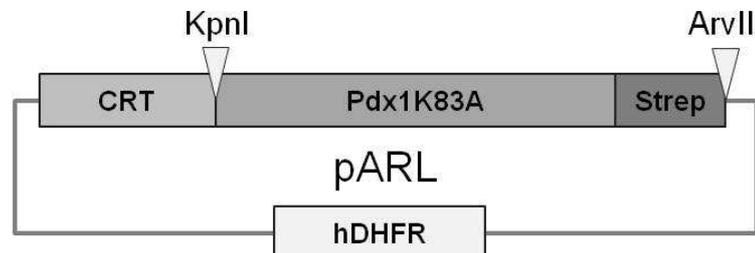


Abb. 16 Klonierschema des plasmidialen Überexpressionskonstruktes pARL-Pdx1K83A-Strep. CRT=Chloroquinresistenzpromotor; hDHFR Resistenzkassette der humanen Dehydrofolatreduktase.

Tab. 5 Für die Klonierung des pARL-Pdx1K83A-Strep Konstruktes verwendete Oligonukleotide. Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind fett markiert.

Name	Sequenz (5' - 3')
PfPdx1-pARL-Kpn-s	GAGAG GTACCAT GGAAAATCATAAAGATGATGC
IBA3-Strep-Avr-as	GAGAC CTAGG TATTATTTTTTCGAACTGCGGG

2.5.2 Methode der $^1\text{O}_2$ -Detektion im Parasiten

Mittels des Farbstoffes 3-(p-Aminophenyl) Fluoreszein (APF) ist es möglich Singulett Sauerstoff in den Parasiten nachzuweisen. Zur Quantifizierung von $^1\text{O}_2$ wurden definierte Mengen an Cercosporin für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln auf die Kultur gegeben, um die Fluoreszenzintensität der entsprechend induzierten $^1\text{O}_2$ Menge zu bestimmen. Die ebenfalls produzierten Hydroxyl-Radikale wurden durch die Zugabe von 1 % DMSO gequencht. Nach Zugabe von 20 μM APF zu den Zellen wurden die einzelnen Parasiten bei einer Belichtungsdauer von 1000 ms mit einem FITC Filter an dem Axioscope 2plus Mikroskop, mit dem Plan Apochromal 63x Objektiv (Zeiss, Germany) und der ORCA HR Kamera (Hamamatsu), Pixelgröße 5.9(H) μm x 5.9(V) μm und der Software Openlab 5.0.1(Improvision) fotografiert (Abbildung 17). Die jeweilige Fluoreszenzintensität der Parasiten wird in dem Sektor I (Abbildung 17. c) mit *Adobe Photoshop Version 9.0* gemessen und die Hintergrundfluoreszenz des Erythrozyten (Abbildung 17. c Sektor II) abgezogen.

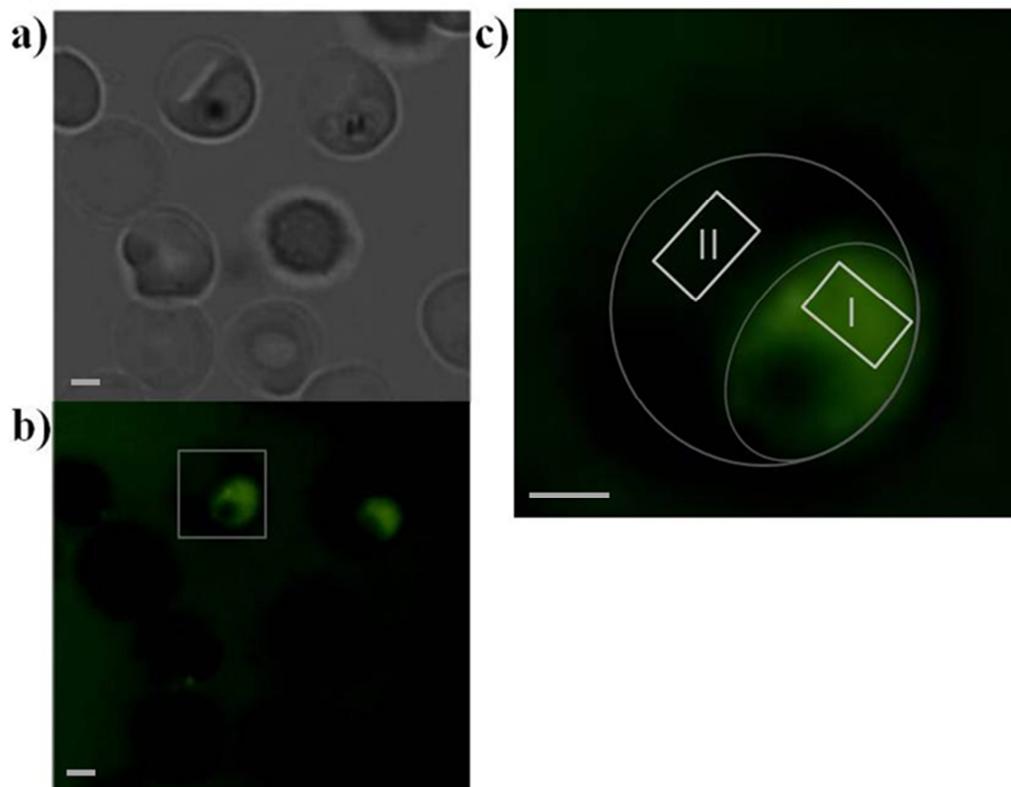


Abb. 17 Darstellung der Messung der Fluoreszenzintensitäten von APF **a)** Durchlicht **b)** APF **c)** schematische Darstellung der Messdurchführung, I= Fluoreszenz im Zytosol des Parasiten, II= Hintergrundfluoreszenz des Erythrozyten. Maßstab entspricht 2 μm .

2.7 Methoden zur Untersuchung der plasmodialen AspAT

2.7.1 AspAT- Enzymaktivität für Aspartat

3 µg Protein werden mit 10 mM L-Asparaginsäure, 20 mM α-Ketoglutarat und 25 µM Pyridoxal-5-Phosphat in einem Gesamtvolumen von 1 ml Tris-HCl (pH 8.0) angesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 5 min bei 95°C gekocht, um die Reaktion zu stoppen. Nach 2-minütigem Abkühlen auf Eis werden 10 µl einer 50 mM APAD-Lösung und 5 µl Glutamatdehydrogenase [7 U] zum Testansatz pipettiert und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion des Überstandes nach 1 min Zentrifugation bei 14.000 rpm wird bei einer Wellenlänge von 363 nm bestimmt und daraus die spezifische Aktivität mittels des Extinktionskoeffizienten für APADH von 8900 M⁻¹ cm⁻¹ berechnet.

2.7.2 AspAT- Enzymaktivität für Glutamat

Zur Untersuchung der Rückreaktion der AspAT, wurden jeweils 1,5 µg Protein mit entsprechender Konzentration L-Glutamat [Stock 100 mM] sowie Oxalacetat [Stock 100 mM] und 25 µM PLP in einem Gesamtvolumen von 1 ml Tris-HCl (pH 8.0) angesetzt. Die Substrate Glutamat und Oxalacetat wurden in steigenden Konzentrationen von 0,2 mM bis 7 mM eingesetzt und die Reaktionen für 0, 2, 5, 10 und 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend, durch 5-minütiges Kochen bei 95°C im Wasserbad, gestoppt.

Die durch die Aktivität der AspAT erzeugte Abnahme der Glutamat-Konzentration über die Zeit (ΔE ; Abbildung 35), wurde ebenfalls durch eine anschließende GDH-Reaktion, wie unter 2.7.1 beschrieben, bei 363 nm detektiert.

Der Umsatz der AspAT bei entsprechender Glutamat-Konzentration wurde daraufhin, mittels des Extinktionskoeffizienten für APADH von 8900 M⁻¹ cm⁻¹ nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{\Delta E}{E * t}$$

- c = Stoffmengenumsatz
- ΔE = Differenz der Absorption zwischen 2. und 10. min
- E = Extinktionskoeffizient für APADH von 8900 M⁻¹ cm⁻¹
- t = Zeit der abgelaufenen Reaktion in Minuten (8 min)

2.7.3 Mutation von AspAT

Zur Herstellung der Mutanten der plasmidialen AspAT wurden verschiedene Aminosäuren mittels Overlap-PCR (siehe Abschnitt 2.2.2) ausgetauscht. Als Template diente das Expressionskonstrukt pASK-IBA3-AspAT-WT-Strep (Wrenger *et al.*, 2011). Die verwendeten Oligonukleotide mit entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die generierten Fragmente wurden anschließend mittels Bsal-HF in den Expressionsvektor pASK-IBA3plus kloniert (Abbildung 18). Zum Klonieren des Konstruktes pASK-IBA3-AspAT-CoMutante-Strep, wurde auf dem Template pASK-IBA3-AspAT-R257A-Strep eine „Site-directed“-Mutagenese-PCR (Abschnitt 2.2.3) mit den Primern AspT-Y68A-s und AspT-Y68A-as (siehe Tabelle 6) durchgeführt.

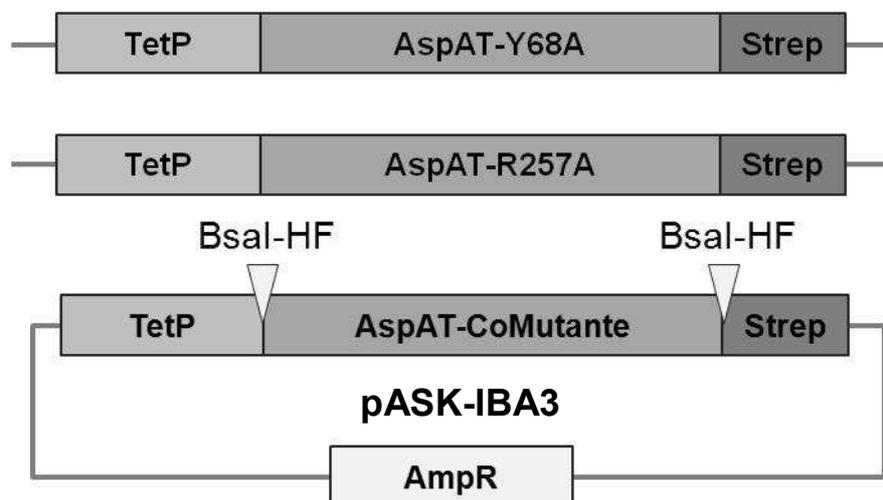


Abb. 18 Klonierschema für die Expressionskonstrukte pASK-IBA3-AspAT-Y68A-Strep, pASK-IBA3-AspAT-R257A-Strep und pASK-IBA3-AspAT-CoMutante-Strep. TetP= Tetrazyklinpromotor; AmpR= Resistenzkassette für Ampicillin.

Tab. 6 Sequenzen der Oligonukleotide für die Mutation von AspAT. Die jeweiligen Mutationsstellen sind unterstrichen. Restriktionsschnittstellen für Bsal-HF sind „fett“ markiert.

Name	Sequenz (5' - 3')
IBA3-AspT-s	GCGC GGTCTC CAATGGATAAGTTATTAAGCAGCTTAG
IBA3-AspT-as	GCGC GGTCTC TGCGCTTATTTGACTTAGCGAAAGAC
AspT-R257A-s	ATGTCGCTTTATGGAGA <u>GCAGC</u> AGGTGCTCTTCATA TTG

AspT-R257A-as	CAATATGAAGAGCACCT IGCT GGCTTCTCCATAAAGCGA CAT
AspT-Y68A-s	GAAAATTATAAAGAGAAACCAG CATT GTTAGGTAACG GTACAGAA
AspT-Y68A-as	TTCTGTACCGTTACCTAACAAT IGCT GGTTTCTCTTTAT AATTTTC

2.7.4 Co-Expression der AspAT-WT und AspAT-CoMutante

Um eine Co-Expression der AspAT-WT mit der AspAT-CoMutante durchführen zu können, wurde die AspAT-CoMutante über NdeI und XmaI in den pBM1-Vektor (Abschnitt 2.3.2.1) kloniert, sodass dieses Konstrukt einen N-terminalen His-Tag kodiert (Abbildung 19). Die verwendeten Oligonukleotide mit entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Zuvor kompetent gemachte BLR-DE3 Zellen, die bereits das Plasmid pASK-IBA3-AspAT-WT-Strep enthielten, wurden mit pBM1-AspAT-CoMutante-His transformiert und die Expression beider Proteine gleichzeitig bei A 600 nm von 0,5 mit 0,1 mM IPTG und 50 µM AHT induziert (Abschnitt 2.3.2).

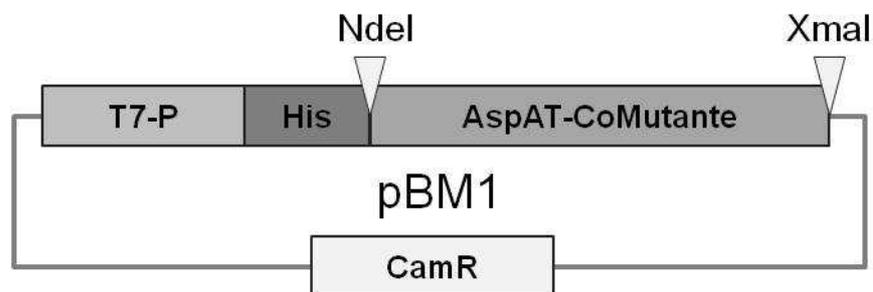


Abb. 19 Klonierschema des Expressionskonstrukt pBM1-AspAT-CoMutante-His für die Co-Expression. T7-P= T7-Promotor; CamR= Resistenzkassette für Chloramphenicol.

Tab. 7 Sequenzen der Oligonukleotide für die Klonierung der AspAT-CoMutante in pBM1. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind „fett“ markiert.

Name	Sequenz (5' - 3')
NdeI-AspT-sense	AGAG CATATG GATAAGTTATTAAGCAGCTTAG
XmaI-AspT-as	ATAT CCCGGG TCATATTTGACTTAGCGAAAGA

2.7.5 Klonierung des Überexpressionskonstruktes der AspAT-CoMutante

Das Überexpressionskonstrukt pARL-AspAT-CoMutante-Strep (Abbildung 20) wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI sowie dem Template pASK-IBA3-AspAT-CoMutante-Strep generiert und anschließend in den pARL-1a⁻ Vektor ligiert. In Tabelle 8 sind die verwendeten Oligonukleotide gezeigt.

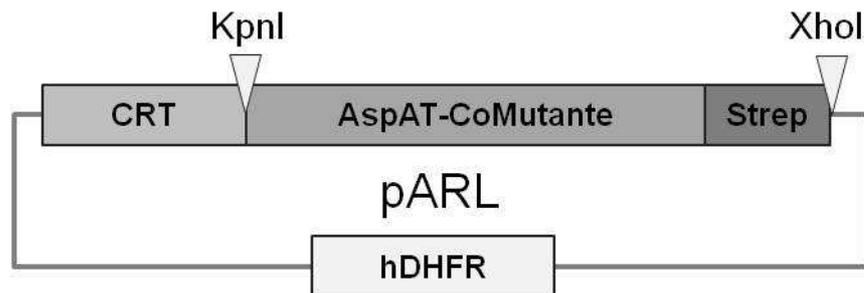


Abb. 20 Klonierschema des plasmidialen Überexpressionskonstruktes pARL-AspAT-CoMutante-Strep. CRT=Chloroquinresistenzpromotor; hDHFR Resistenzkassette der humanen Dehydrofolatreduktase.

Tab. 8 Sequenzen der Oligonukleotide für die Klonierung der AspAT-CoMutante-Strep in pARL-1a⁻. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind „fett“ markiert.

Name	Sequenz (5' - 3')
PfAspT-KpnI-s	GAGAG GTACCAT GGATAAGTTATTAAGCAGCTTAG
pARL-Strep-XhoI-as	GCGC CTCGAG TTATTATTTTTTCGAACTGCGGGTGGC

2.8 Methoden zur Untersuchung der plasmidialen MDH

2.8.1 MDH – Aktivitätstest

Für die Oxidation von L-Malat zu Oxalacetat werden 4 mM L-Malat in einem KP-Puffer (50 mM KH₂PO₄, 80 mM KCl, pH 7.4) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend die entsprechende Enzymmenge (1 µg – 3 µg) dazugegeben. Durch die direkte Zugabe von 2 mM NAD⁺ in die Küvette im Spektrophotometer und das anschließende Mischen mit einem Spatel wird die Reaktion gestartet und bei 340 nm für 3 min (alle 6 sek) die Zunahme des entstehenden NADH im Photometer gemessen.

Für die Reduktion von Oxalacetat werden 2 mM Oxalacetat in dem oben genannten KP-Puffer ebenfalls für 10 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss die Enzymmenge (0,5 µg – 3 µg) dazu pipettiert. Durch die direkte Zugabe von 200 µM NADH wird, wie oben bereits beschrieben, die Reaktion gestartet und die Abnahme von NADH bei 340 nm verfolgt. Die Reaktionen laufen in einem Gesamtvolumen von 1 ml ab. Die spezifischen Aktivitäten werden mittels Steigung der Geraden und entsprechendem Extinktionskoeffizienten für NADH von 6220 M⁻¹ cm⁻¹ berechnet.

2.8.2 Mutation der plasmodialen MDH

Zur Herstellung der Mutanten der MDH wurden verschiedene Aminosäuren mittels „Site-directed“-Mutagenese-PCR (siehe Abschnitt 2.2.3) ausgetauscht und somit die Konstrukte pASK-IBA3-MDH-Mutation-His (Abbildung 21) generiert. Als Template diente das Expressionskonstrukt pASK-IBA3-MDH-WT-His (Wrenger *et al.*, 2012b). Die verwendeten Oligonukleotide mit entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

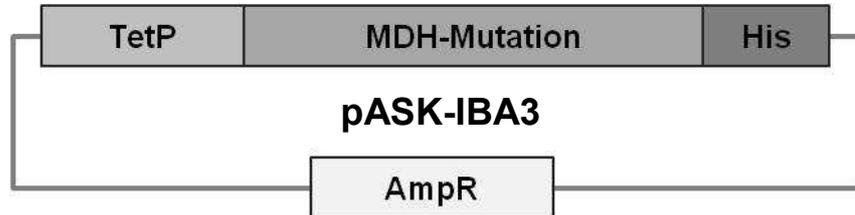


Abb. 21 Schema der pASK-IBA3-MDH-Mutation-His Expressionskonstrukte. TetP= Tetrazyklinpromotor; AmpR= Resistenzkassette für Ampicillin.

Tab. 9 Sequenzen der Oligonukleotide für die Mutationen von MDH. Die jeweiligen Mutationsstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5' - 3')
MDH-I220W-s	AGAAATATGGGTGCTGAAT <u>GG</u> GATTAACTAGCTAAAGCA
MDH-I220W-as	TGCTTTAGCTAGTTTAAT <u>CC</u> ATTCAGCACCCATATTTCT
MDH-V190W-s	GATATACATGCGGTAAAT <u>TGG</u> TTGGCCTTTATCTGAATTTGTC
MDH-V190W-as	GACAAATTCAGATAAAGG <u>CCA</u> ACCATTTACCGATGTATATC

MDH-E18Q-s	CAAATCGGAGCAATTGTTGGACAATTGTGTTTGCTGGAAAATC TTGG
MDH-E18Q-as	CCAAGATTTTCCAGCAAACACAATTGTCCAACAATTGCTCCGAT TTG

2.8.3 Co-Aufreinigung von MDH-WT und MDH-Mutanten

Um eine Co-Aufreinigung der Wildtyp MDH mit der pASK-IBA3-MDH-I220W-His bzw. pASK-IBA3-MDH-V190W-His zu ermöglichen wurde ein pASK-IBA3-MDH-WT-Strep Konstrukt generiert (Abbildung 22). Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 zusammengefasst und die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NcoI und SacII sind „fett“ hervor gehoben.

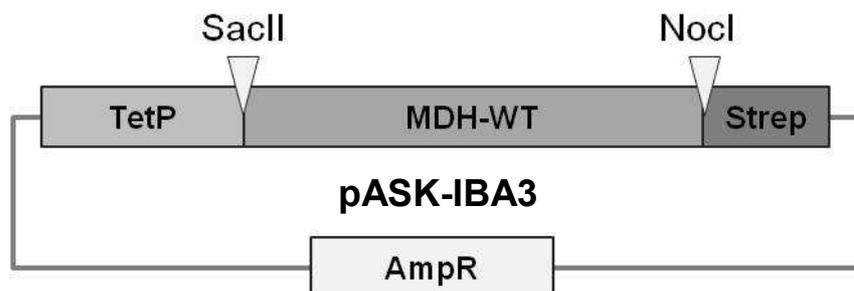


Abb. 22 Schema des pASK-IBA3-MDH-WT-Strep Konstruktes für die Co-Aufreinigung mit MDH-Mutanten-His. TetP= Tetrazyklinpromotor; AmpR= Resistentkassette für Ampicillin.

Tab. 10 Sequenzen der Oligonukleotide für die Klonierung von pASK-IBA3-MDH-WT-Strep. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind „fett“ markiert.

Name	Sequenz (5' - 3')
IBA3-SacII-MDH-s	ATAT CCGCGG GATGACTAAAATTGCCTTA
IBA3-NcoI-MDH-as	AGAG CCATGG CTTTTAATTAAGTCGAAAGC

Für die Co-Aufreinigung der MDH-WT-Strep mit MDH-I220W-His bzw. MDH-V190W-His über die Ni-NTA wurden die Überstände der beiden Expressionen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, nach dem Aufschluss durch

Ultraschall und anschließender Zentrifugation, vereinigt und für 2 h bei 4°C rollend inkubiert. Anschließend wurden die Proben, wie unter 2.3.4 bzw. 2.3.5 beschrieben, aufgereinigt.

2.8.4 Klonierung der Überexpressionskonstrukte der MDH

Die Überexpressionskonstrukte pARL-MDH-WT-His, pARL-MDH-I220W-His, pARL-MDH-V190W-His und pARL-MDH-E18Q-His wurden mit den Restriktionsenzymen XmaI und XhoI und dem Template des jeweiligen pASK-IBA3-MDH-Konstruktes generiert und anschließend in den pARL-BSD Vektor (Knöckel *et al.*, 2012) ligiert (Abbildung 23). Dieser trägt eine Resistenzkassette für Blasticidin S (BSD) und kann somit für Co-Transfektionen mit Plasmiden, welche eine hDHFR-Kassette tragen, verwendet werden. In Tabelle 11 sind die verwendeten Oligonukleotide gezeigt.

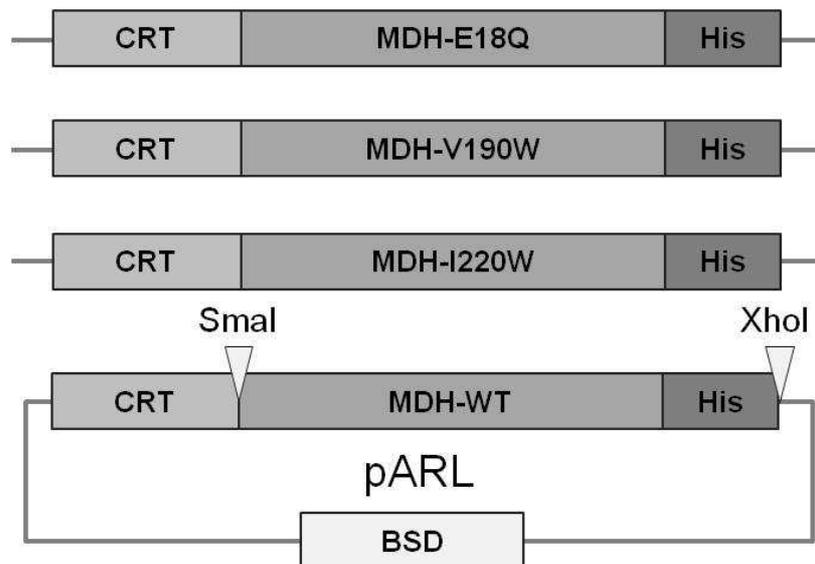


Abb. 23 Schema der plasmidialen Überexpressionskonstrukte für pARL-MDH-WT-His und pARL-MDH-I220W, V190W bzw. E18Q-His. CRT=Chloroquinresistenzpromotor; BSD= Resistenzkassette für Blasticidin S.

Tab. 11 Sequenzen der Oligonukleotide für die Klonierung der MDH-Mutanten in pARL-BSD. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind „fett“ markiert.

Name	Sequenz (5' - 3')
<i>P</i> MDH-pARL-SmaI-s	GAGAC CCGG GATGGTACCAGCTCGAGCCTAGGAT GACTAAAATTGCCTTAATAGG
pARL-His-XhoI-as	GAGAC TCGAG TTATTAATGATGATGATGATGATG

3. Ergebnisse

3.1 Vitamin B6 und Singulett Sauerstoff in *Plasmodium falciparum*

Um die biologische Bedeutung der *de novo* Synthese von PLP im Parasiten zu analysieren, wurden in vorangegangenen Studien die ORFs von *pdx1* und *pdx2* unter einem konstitutiven Promotor im Parasiten überexprimiert (Knöckel *et al.*, 2012).

3.1.1 PLP-Gehalt im Wildtyp und in dem *Pdx1/Pdx2*-Überexprimierer

Um die Funktionalität der Überexprimierer hinsichtlich der Herstellung von PLP zu überprüfen, wurden Plasmodien-Extrakte des Wildtypstammes 3D7 sowie der transgenen Plasmodien 3D7-*Pdx1/Pdx2* mittels HPLC analysiert (Labor Fenner, Hamburg). Bei dem 3D7-Extrakt wurde eine PLP-Konzentration von 12,5 μM und bei dem Co-Überexprimierer von 36,6 μM bestimmt (Abbildung 24).

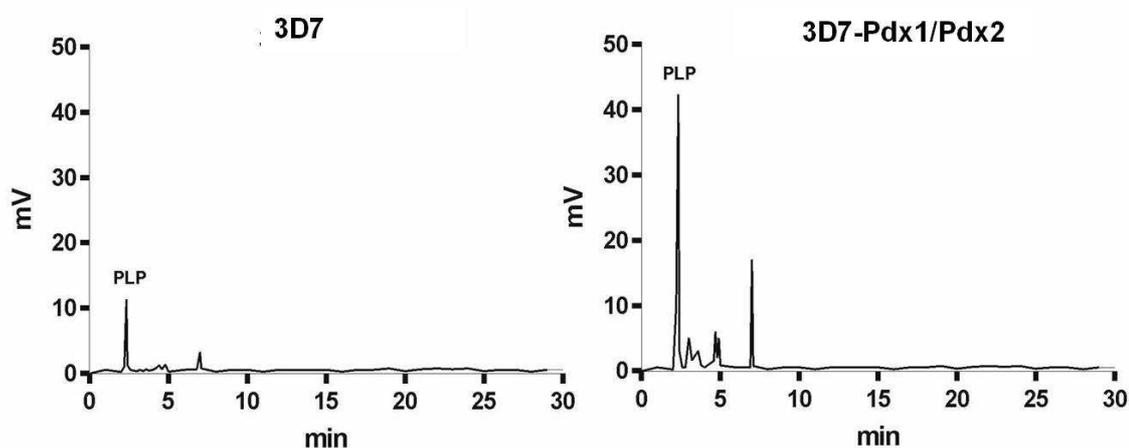


Abb. 24 Mittels HPLC-Analyse gemessene PLP-Konzentrationen des Wildtypstammes 3D7 und des 3D7-*Pdx1/Pdx2*-Überexprimierers im Vergleich. 3D7: 12,5 μM ; 3D7-*Pdx1/Pdx2*: 36,6 μM .

3.1.2 Expression einer dominant-negativen Mutante der PLP-Synthase im Parasiten

Um die „downstream“-Effekte von PLP zu analysieren, wurde eine Methode angewandt, bei welcher eine dominant-negative Mutante der PLP-Synthase in *P. falciparum* überexprimiert wurde. Durch Bindung der mutierten und inaktiven Pdx1- und Pdx2- Moleküle an die Wildtypproteine soll die PLP-Synthase in den Zellen inaktiviert werden und die Auswirkung für die Parasiten untersucht werden.

3.1.2.1 Herstellung der Zelllinien 3D7-Pdx1K83A-Strep und 3D7-Pdx1K83A-Strep/Pdx2E53Y-Myc

Es wurde ein Überexpressionskonstrukt für Plasmodien generiert, welches ein inaktives Pdx1-Enzym kodiert (pARL-Pdx1K83A-Strep; Abbildung 16). Das Konstrukt wurde anschließend in 3D7-Parasiten transfiziert sowie in die 3D7-Pdx2E53Y-Myc Zelllinie co-transfiziert (3D7-Pdx1K83A-Strep/Pdx2E53Y-Myc). Nach erfolgreicher Transfektion wurde die Expression der rekombinanten Proteine im Western-Blot (Abbildung 25) überprüft.

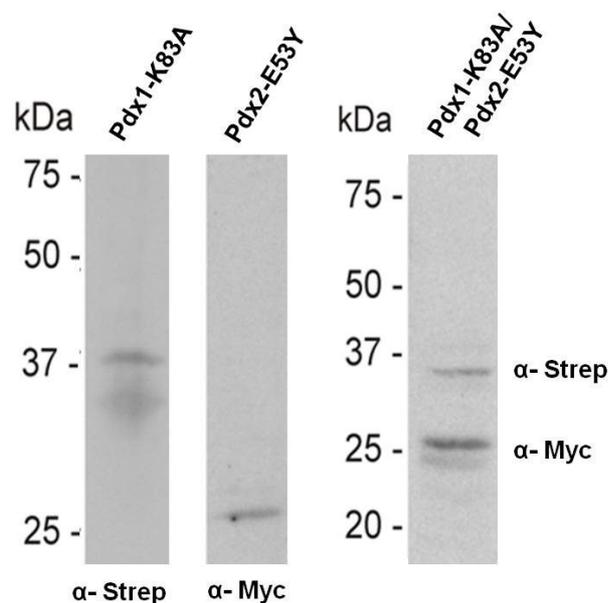
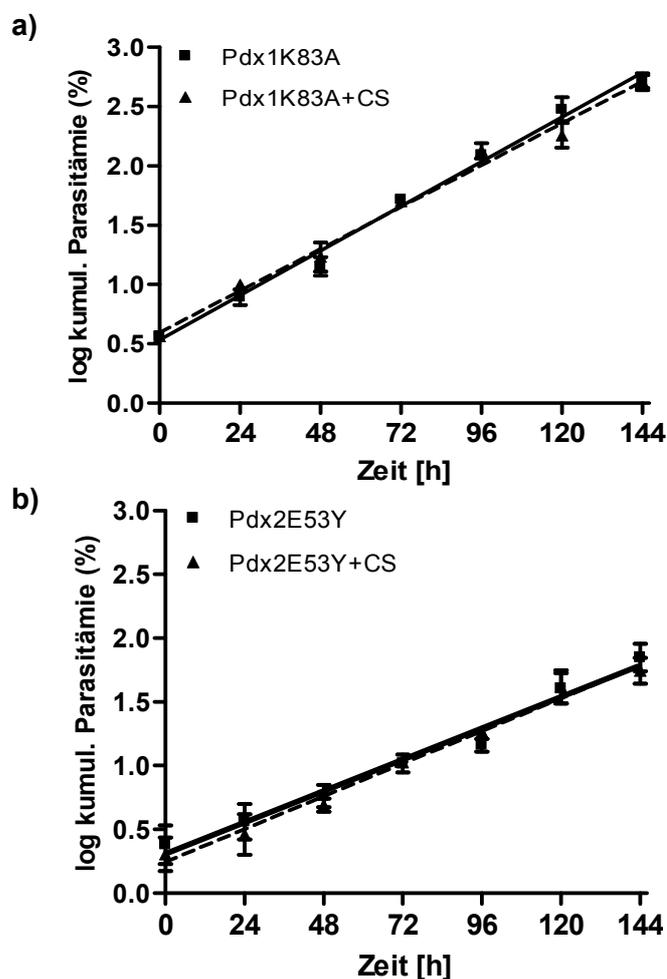


Abb. 25 Western-Blot mit Plasmodien-Extrakten der transgenen Zelllinien 3D7-Pdx1-K83A-Strep, 3D7-Pdx2-E53Y-Myc sowie der co-transgenen Zelllinie 3D7-Pdx1-K83A-Strep/Pdx2-E53Y-Myc. Zum Nachweis beider Proteine in den co-transgenen Parasiten wurde die Membran, nach der Detektion des Strep-Tags mittels Strep-Antikörper (1:5000), gestriipt und anschließend der Myc-Tag mittels spezifischem Myc-Antikörper (1:4000) detektiert.

3.1.2.2 Wachstumsstudien der transgenen Zelllinien unter Cercosporineinfluss

Um die mögliche Funktion von PLP in der Bekämpfung von $^1\text{O}_2$ zu überprüfen, wurden die transgenen Zellen mit dem $^1\text{O}_2$ produzierenden Toxin Cercosporin, aus dem pflanzenpathogenen *Cercospora*, behandelt.

Der Effekt der Überexpression der jeweiligen Enzyme einzeln (3D7-Pdx1K83A und 3D7-Pdx2E53Y) sowie deren gleichzeitige Expression (3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y) bei Behandlung mit 10 nM Cercosporin wurde über mehrere Tage verfolgt. In Abbildung 26 sind die Wachstumskurven der einzelnen Zelllinien über 144 h mit und ohne Behandlung durch Cercosporin vergleichend dargestellt. Es zeigt sich, dass unter 10 nM Cercosporin, die Überexprimierer der mutierten Pdx1- und Pdx2- Proteine alleine, auch nach 144 h, keinen Wachstumseinfluss zeigen. Die co-transgene Zelllinie mit beiden mutierten Enzymen 3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y zeigt, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, hingegen einen starken Cercosporin induzierten Wachstumseffekt, welcher bereits nach ca. 48 h deutlich zu erkennen ist.



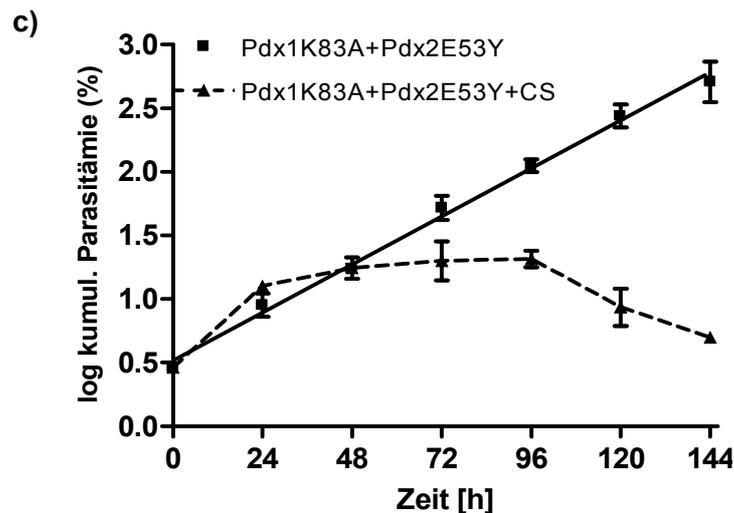


Abb. 26 Wachstumskurven der transgenen Zelllinien unter Cercosporineinwirkung (10 nM). Der Logarithmus der kumulativen Parasitämie in % wurde gegen die Zeit in h aufgetragen und jeweils die unehandelte Zelllinie (Quadrate) im Vergleich zu den, mit Cercosporin behandelten, Parasiten (Dreiecke) aufgetragen. **a)** 3D7-Pdx1K83A $R^2= 0,98$; 3D7-Pdx1K83A + Cercosporin $R^2= 0,97$; **b)** 3D7-Pdx2E53Y $R^2= 0,89$; 3D7-Pdx2E53Y + Cercosporin $R^2= 0,90$; **c)** 3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y $R^2= 0,97$; Mittelwerte \pm SEM, n = 4; CS = Cercosporin.

3.1.2.3 Detoxifikation von $^1\text{O}_2$ durch PLP

Um Unterschiede im $^1\text{O}_2$ -Gehalt der verschiedenen transgenen Parasiten detektieren zu können, wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff APF, welcher mit $^1\text{O}_2$ Molekülen zu Fluoreszein reagiert, behandelt und mikroskopisch ausgewertet (Abschnitt 2.5.2).

Hierzu wurden die Zelllinien 3D7-pARL-WR/BSD (CoMock), 3D7-Pdx1/Pdx2 und 3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y mit jeweils 80 nM Cercosporin für eine Stunde inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität von APF vergleichend analysiert. Wie der Abbildung 27 zu entnehmen ist, weist die 3D7-CoMock Zelllinie eine mittlere Fluoreszenzintensität von 2320 AU, der Wildtyp-Überexprimierer 3D7-Pdx1/Pdx2 von 1475 AU und die dominant-negative Zelllinie 3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y von 2730 AU, auf.

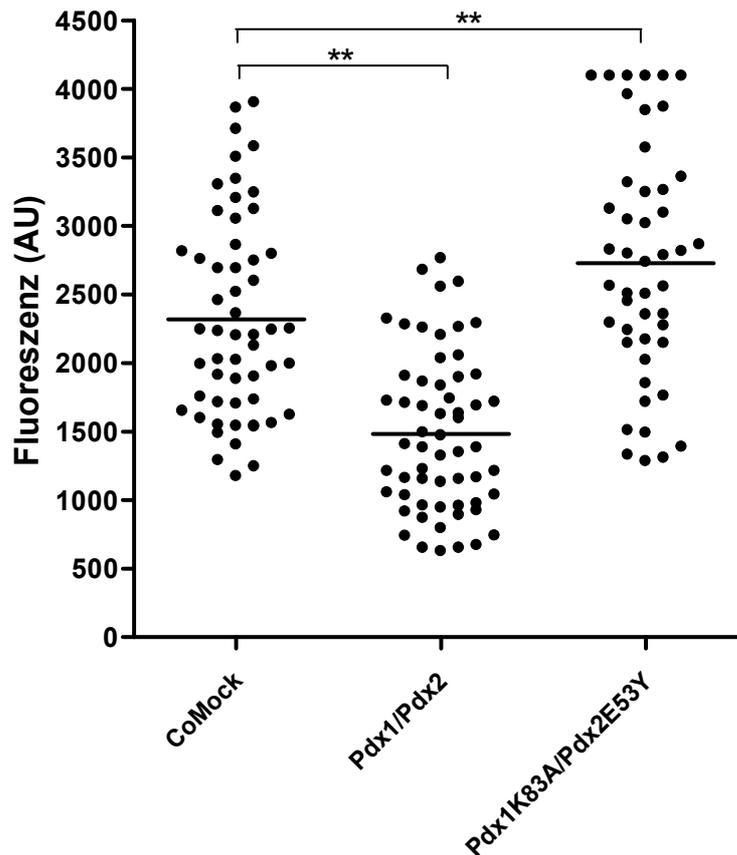


Abb. 27 Vergleich der APF-Fluoreszenzintensitäten 3D7-CoMock, 3D7-Pdx1/Pdx2 und 3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y. Inkubation der Zellen mit 80 nM Cercosporin für eine Stunde im Dunkeln. 20 μ M APF. Belichtungszeit 250 ms. Co-Mock: Mittelwert 2318 ± 98 AU, $n=55$; Pdx1/Pdx2: Mittelwert 1482 ± 75 AU, $n=59$; Pdx1K83A/Pdx2E53Y: Mittelwert 2730 ± 125 AU, $n=47$. ** Signifikanz: einfache ANOVA $p < 0,01$.

3.1.3 Methode zur Quantifizierung von Singulett Sauerstoff in *Plasmodium falciparum*

Im Folgenden wurde eine Methode zur Quantifizierung von endogenem $^1\text{O}_2$ in den einzelnen Entwicklungsstadien von *P. falciparum* etabliert. Hierfür wurde zuerst wiederum Cercosporin zur Produktion von $^1\text{O}_2$ eingesetzt. Die bekannte Quantenausbeute für Cercosporin von 0,84 bis 0,97 (Daub *et al.*, 2000), ermöglicht die Herstellung von definierten $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen im Parasiten und somit die Berechnung von $^1\text{O}_2$ mittels Eichgeraden.

3.1.3.1 Ermittlung des linearen Bereiches der $^1\text{O}_2$ -Eichkurve

Um eine optimale Belichtungsdauer bei den folgenden Experimenten zu ermitteln, wurde zunächst der Bereich bestimmt, indem die Belichtungszeit, die eingesetzte Cercosporin-Konzentration, sowie die induzierte Fluoreszenz linear zu einander sind. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, wurden Cercosporin-Konzentrationen von 1 nM, 5 nM und 10 nM zu Belichtungszeiten von 250 ms bis 2000 ms analysiert. Der so ermittelte lineare Bereich liegt zwischen einer Belichtungszeit von 250 ms bis 1000 ms. Da anschließend die endogene $^1\text{O}_2$ -Konzentration bei unbehandelten Parasiten gemessen werden soll, wurden die folgenden Experimente bei einer Belichtungszeit von 1000 ms durchgeführt.

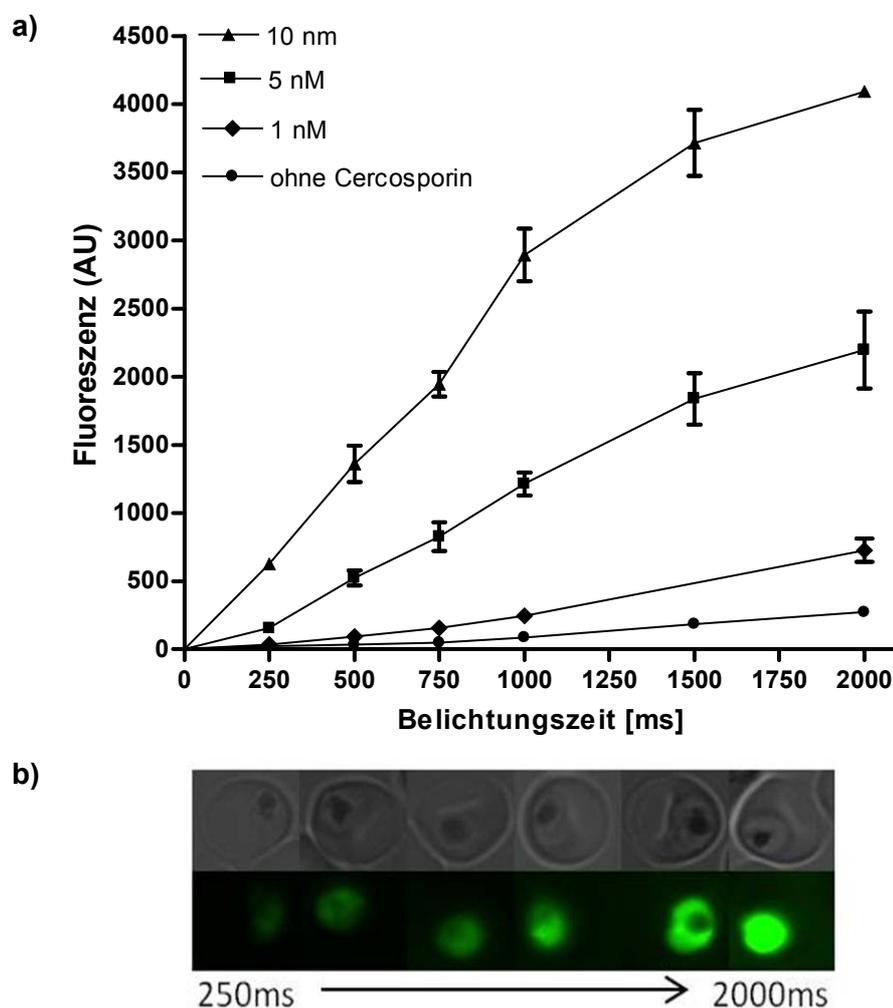


Abb. 28 Ermittlung des linearen Bereiches. **a)** Graph mit steigender Belichtungsdauer (250 ms, 500 ms, 1000 ms, 1500 ms und 2000 ms), steigender Cercosporin-Konzentrationen (0 nM, 1 nM, 5 nM sowie 10 nM) und die dabei induzierte Fluoreszenzintensität in AU. Geradengleichungen: 0 nM $f(x) = 0,15x$, $R^2 = 0,72$; 1 nM $f(x) = 0,41x$, $R^2 = 0,81$; 5 nM $f(x) = 1,2x$, $R^2 = 0,76$; 10 nM $f(x) = 2,03x$, $R^2 = 0,84$; **b)** Beispielhafte Darstellung der Zunahme der Fluoreszenz von Plasmodien im

Trophozoiten-Stadium bei Behandlung mit 10 nM Cercosporin und steigender Belichtungsdauer von 250 ms bis 2000 ms.

3.1.3.2 Sättigungskurve für APF

Um optimale Testbedingungen und Grenzen für die Messung von $^1\text{O}_2$ mittels APF zu ermitteln, wurde eine Sättigungskurve durch steigende Mengen an Cercosporin, bei konstanter Belichtungszeit von 1000 ms und 20 μM APF, generiert. Da zu erwarten ist, dass der Parasit je nach Stadium unterschiedliche Mengen an $^1\text{O}_2$ produziert, wurde für die Sättigungskurve eine synchronisierte Kultur im Ringstadium verwendet. Es wurden, wie unter 2.5.2 beschrieben, Konzentrationen von 1 nM bis 40 nM Cercosporin eingesetzt, für eine Stunde im Dunkeln inkubiert und anschließend gemessen. Die Kurve in Abbildung 29 veranschaulicht, dass bei einer Konzentration von 25 nM Cercosporin und einer Fluoreszenzintensität von 70 AU eine Sättigung des Systems erreicht ist. Bis zu einer Cercosporin-Konzentration von 5 nM ist eine Linearität zwischen induzierter Fluoreszenz und Cercosporin gewährleistet.

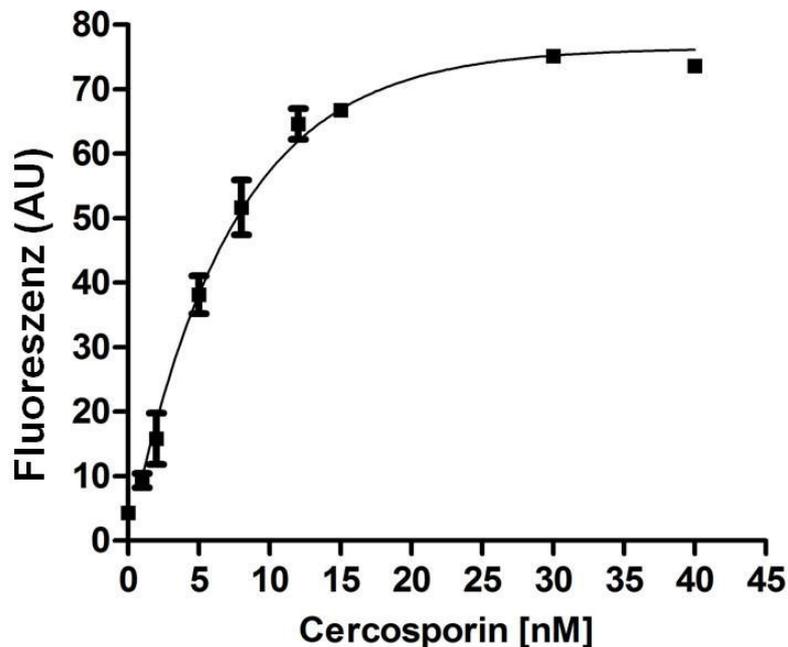


Abb. 29 Sättigungskurve für 20 μM APF unter steigender Cercosporin-Konzentration. von 1 nM bis 40 nM im Ringstadium. Geradengleichung $f(x) = 76,41(1 - e^{-0,1388x})$, $r^2 = 0,97$, $n = 3$;

3.1.3.3 Einteilung der Stadien nach Pixeln

Damit die $^1\text{O}_2$ Menge der einzelnen Plasmodien-Stadien unter gleichen Bedingungen zu messen ist, wurde eine asynchrone Kultur verwendet. Um die einzelnen Stadien in einer asynchronen Kultur voneinander unterscheiden zu können, wurden diese erst entsprechend ihrer Pixelanzahl eingeteilt. Hierzu wurde eine asynchrone 3D7-Kultur mittels Sorbitol synchronisiert und die daraus resultierende hoch synchrone Kultur über 48 h nach Synchronisierung in 8 h-Intervallen mikroskopisch betrachtet und fotografiert. Die Anzahl der Pixel von mindestens 20 Parasiten wurde für jedes 8 h-Intervall mit *Adobe Photoshop Version 9.0* bestimmt (Abbildung 30).

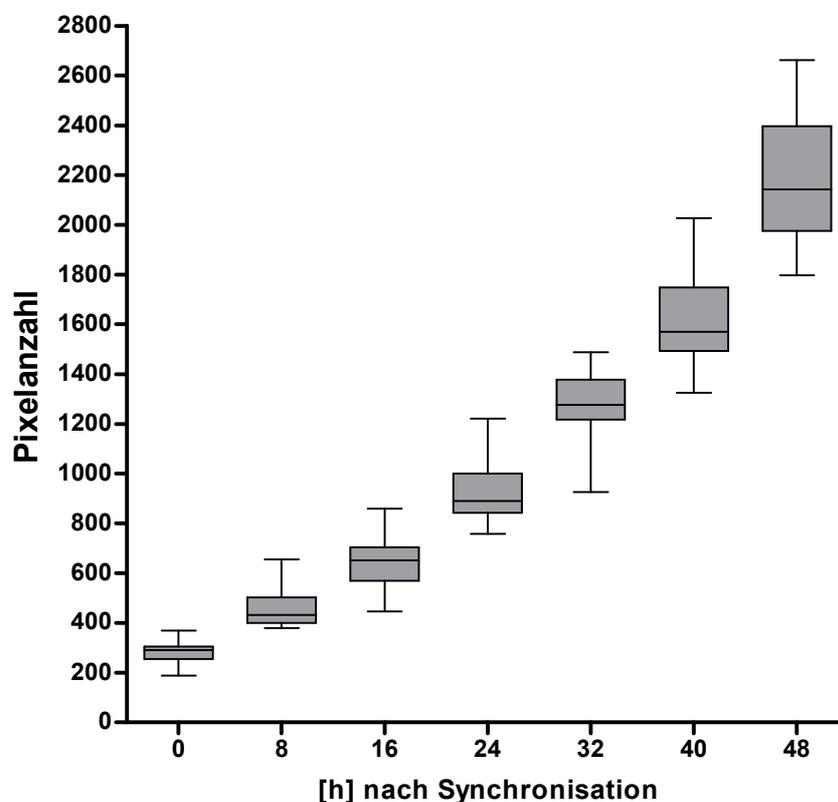


Abb. 30 Zunahme der Pixelanzahl der Plasmodien während der erythrozytären Entwicklung. Zeitpunkt 0 nach Invasion der Merozoiten in die Blutzelle. 0 h nach Synchronisation: n=20, Mittelwert 281 ± 10 ; 8 h: n=29, Mittelwert 454 ± 12 ; 16 h: n=37, Mittelwert 645 ± 17 ; 24 h: n=24, Mittelwert 928 ± 26 ; 32 h: n=28, Mittelwert 1264 ± 28 ; 40 h: n=27, Mittelwert 1625 ± 31 ; 48 h: n=20, Mittelwert 2186 ± 61 .

Entsprechend der Mittelwerte der Pixelanzahl zu definierten Zeitpunkten wurden die Parasiten in verschiedene Klassen eingeteilt und anschließend, für eine bessere Abgrenzung zwischen den Stadien, in drei Hauptstadien (Ringe,

Trophozoiten, Schizonten) zusammengefasst. Die daraus resultierenden Kategorien sind 200 bis 600 Pixel für Ringe, 700 bis 1200 Pixel für Trophozoiten und 1400 bis 2500 Pixel für Schizonten, wie in Abbildung 31 dargestellt. Die Signifikanz der Daten wurde mittels einer einfachen ANOVA durch GraphPad Prism 4.0 bestimmt.

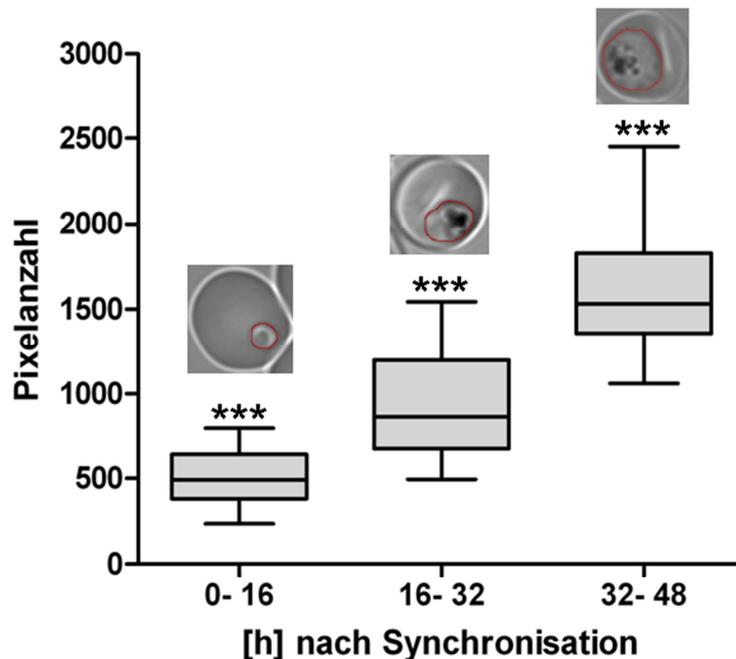


Abb. 31 Einteilung der Plasmodien in Ringe, Trophozoiten und Schizonten bezüglich der Pixelanzahl. Ringe 200 bis 600 Pixel; Trophozoiten 700 bis 1200 Pixel; Schizonten 1400 bis 2500 Pixel. Ringe 0-16 h nach Synchronisation, n=82, Mittelwert 494 ± 17 ; Trophozoiten 16-32 h, n=86, Mittelwert 921 ± 29 ; Schizonten 32-48 h, n=72, Mittelwert 1617 ± 39 . ***Signifikanz p-Wert < 0,0001 (einfache ANOVA). Exemplarische Darstellung der Pixelmessung oberhalb der Werte (rotmarkierter Bereich der Lichtmikroskopischen Aufnahme des Parasiten im jeweiligen Stadium).

3.1.3.4 Eichkurven

Zum Erstellen der Eichkurven (Abbildung 32) wurde daraufhin eine asynchrone Kultur mit steigender Cercosporin-Konzentration behandelt (0,2 nM bis 1 nM), die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Parasiten gemessen und die Parasiten anhand der in Abschnitt 3.1.3.3 ermittelten Pixelanzahl in Ringe, Trophozoiten und Schizonten eingeteilt. Durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz, die auch die endogene Fluoreszenz der unbehandelten Parasiten enthält, ist es daraufhin möglich die Fluoreszenzintensität zu ermitteln, welche durch die jeweilige Cercosporin-Konzentration erzeugt wurde.

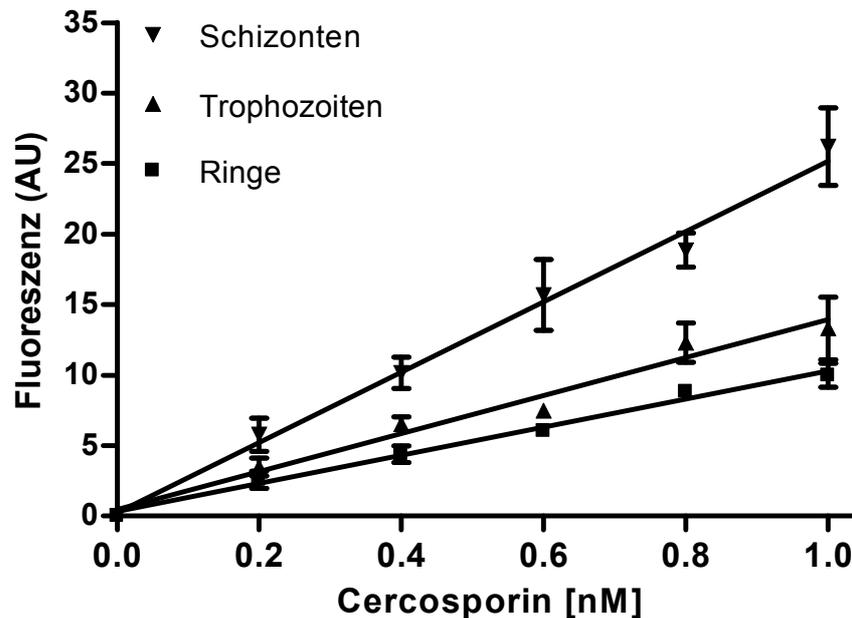


Abb. 32 Eichkurven für die Fluoreszenzintensitäten bei steigender Cercosporin-Konzentration. Cercosporin-Konzentrationen 0,2 nM bis 1 nM, Einteilung Ring-, Trophozoiten- und Schizonten- Stadium. Geradengleichungen: Ringe $f(x) = 9,99x$, $R^2 = 0,92$; Trophozoiten $f(x) = 13,48x$, $R^2 = 0,85$; Schizonten $f(x) = 24,93x$, $R^2 = 0,91$; Mittelwerte \pm SEM; $n = 4$ für jede Eichkurve.

3.1.3.5 Endogene Konzentrationen an Singulett Sauerstoff

Die jeweilige Fluoreszenz der Parasiten korreliert mit der von Cercosporin erzeugten Menge an 1O_2 . Mittels der bekannten Quantenausbeute für Cercosporin von 0,84 bis 0,97 lässt sich die induzierte intrazelluläre Konzentration von 1O_2 für die verschiedenen Stadien kalkulieren. Um die endogenen 1O_2 -Konzentrationen der einzelnen Blutstadien zu messen, wurde eine asynchrone Plasmodien-Kultur mit 20 μ M APF und 1 % DMSO behandelt, wie unter 2.5.2 beschrieben. Die APF-Fluoreszenz der nach Pixeln eingeteilten Parasiten wurde daraufhin gemessen und, wie in Abbildung 33 dargestellt, vergleichend analysiert. Mittels der Eichkurven wurden im Anschluss die Konzentrationen für Singulett Sauerstoff der erythrozytären Stadien errechnet. Für die Ringe ergibt sich eine Konzentration von 0,18 bis 0,21 nM 1O_2 , für die Trophozoiten liegt diese bei 0,31 bis 0,36 nM 1O_2 und für die Schizonten liegt diese im Bereich von 0,09 bis 0,11 nM 1O_2 .

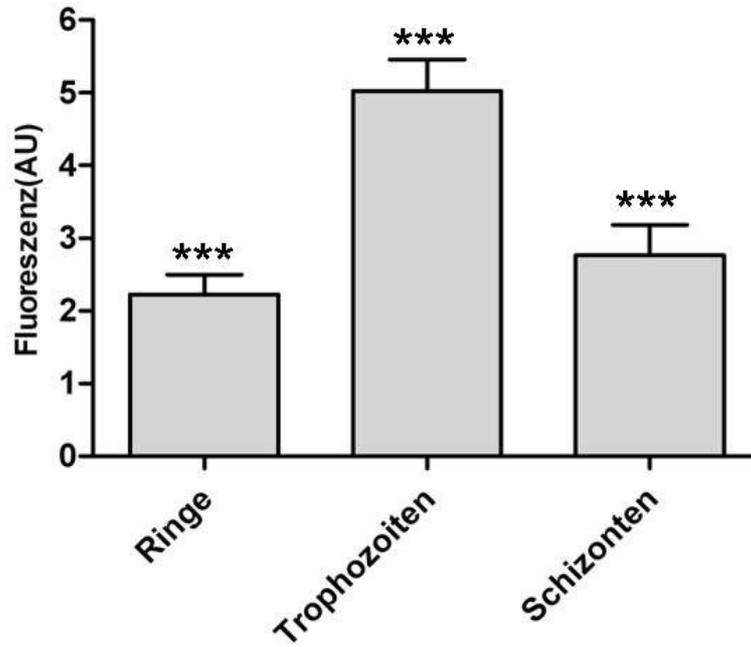


Abb. 33 Messung der Fluoreszenzintensität von APF einer unbehandelten Kultur. Fluoreszenzintensität von APF durch endogenen $^1\text{O}_2$ in Ringen, Trophozoiten und Schizonten. Ringe, n=31, Mittelwert $2,23 \pm 0,27$; Trophozoiten, n=43, Mittelwert $5,02 \pm 0,43$; Schizonten n=21, Mittelwert $2,76 \pm 0,42$. *** Signifikanz p-Wert $<0,0001$ (einfache ANOVA).

3.2 Die PLP-abhängige AspAT und die MDH

Auch im Energie- und Kohlenhydratstoffwechsel von Plasmodium kommen PLP-abhängige Enzyme vor. Hierzu zählt unter anderem die Aspartat Aminotransferase (AspAT), deren Bedeutung für den Parasiten im Folgenden analysiert wurde. Hierfür wurde wiederum die Methode der Überexpression einer dominant-negativen Mutante angewandt. Durch Bindung der Mutante an das Wildtyp Enzym sollte dieses *in vivo* inaktiviert und somit die AspAT-Aktivität in der Zelle depletiert werden. Des Weiteren wurde die Rolle der plasmodialen Malatdehydrogenase (MDH) analysiert, da diese die Verbindung zum Energiestoffwechsel bildet und mit der AspAT um Oxalacetat kompetiert.

3.2.1 Analysen der Aspartat Aminotransferase (AspAT)

3.2.1.1 Enzymkinetik der Rückreaktion

Da Aminotransferasen reversible Reaktionen durchführen, wurde an dieser Stelle die Rückreaktion der AspAT von Glutamat zu Aspartat genauer analysiert (Abbildung 34). Zur Bestimmung des K_M -Wertes der *Pf*AspAT für das Substrat L-Glutamat wurden, unter den in Abschnitt 2.7.2 beschriebenen Bedingungen, steigende Konzentrationen an Glutamat (0,2 – 7 mM) eingesetzt. In Abbildung 35 sind die Spektren nach 0 bis 15 min AspAT-Reaktion sowie für die Startkonzentration von 1 mM und 3 mM Glutamat exemplarisch dargestellt.

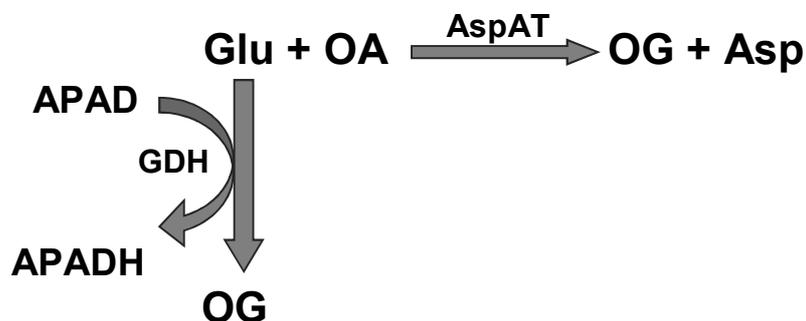


Abb. 34 Reaktionsschema des Enzymaktivitätstests der AspAT für Glutamat. Es wird die Absorption von APADH bei 363 nm gemessen. Glu: Glutamat; OA: Oxalacetat; OG: α -Ketoglutarat; Asp: Aspartat.

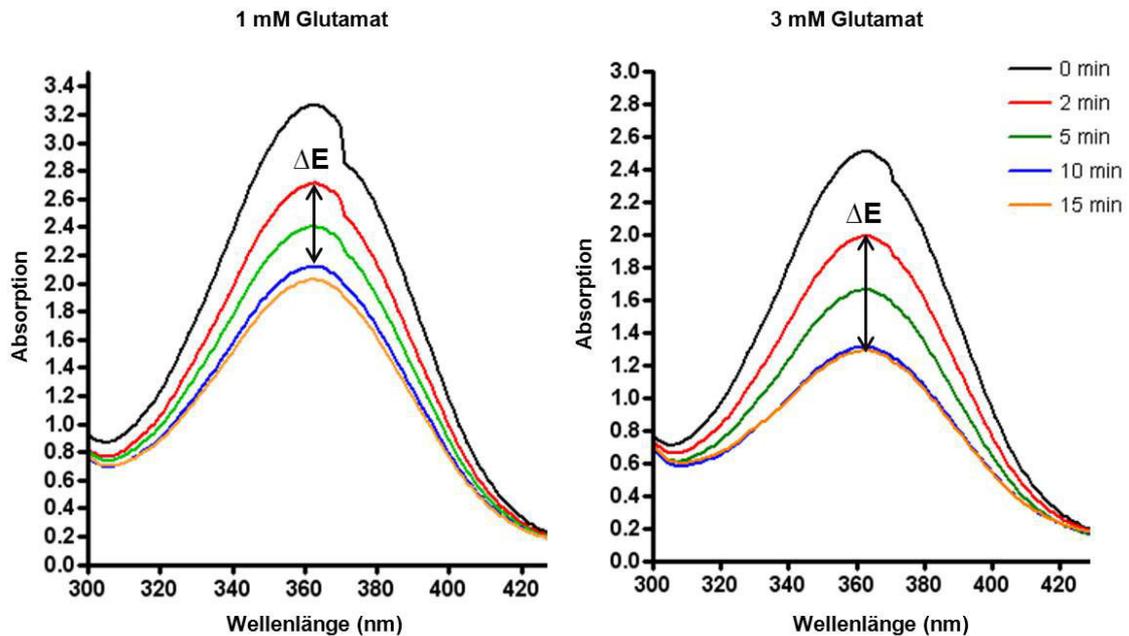


Abb. 35 Beispielhafte Darstellung der Absorptionsspektren von APADH nach der GDH-Reaktion bei unterschiedlichen Glutamat-Konzentrationen. Links sind die Spektren bei 1 mM Glutamat und rechts bei 3 mM Glutamat nach 0 bis 15 min AspAT-Reaktion gezeigt. Die Differenz der Absorptionen bei 363 nm zwischen der 2- und der 10-minütigen AspAT-Reaktion ist durch ΔE markiert.

Der ermittelte K_M -Wert liegt bei $0,46 \text{ mM} \pm 0,13 \text{ mM}$ (Abbildung 36). Die spezifische Aktivität beträgt $7,51 \pm 0,4 \text{ U/ mg}$ ($n = 3$).

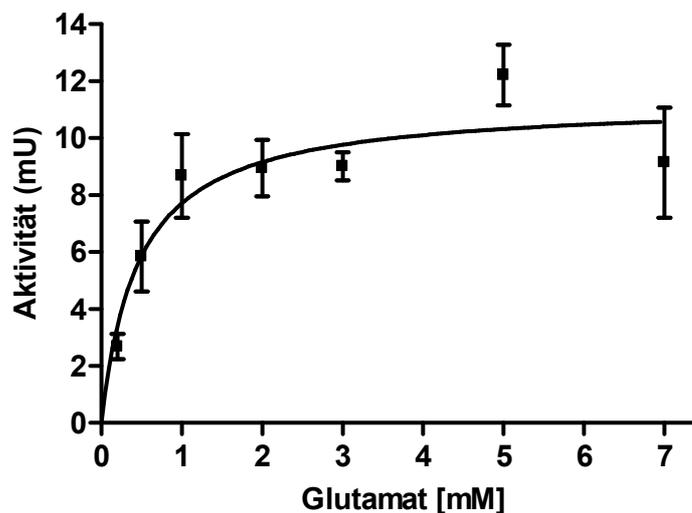


Abb. 36 Michaelis-Menten-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes der *PfAspAT* für L-Glutamat. Es ist der Umsatz in nmole/ min zu entsprechender Substratkonzentration gegen die L-Glutamatkonzentrationen von 0,2 mM bis 7 mM aufgetragen (Quadrate: Mittelwerte \pm SD, $n=3$). GraphPad Prism: $V_{\text{Max}} = 11,27 \text{ mU}$; $K_M = 0,46 \pm 0,13 \text{ mM}$.

3.2.1.2 Generierung und Charakterisierung inaktiver AspAT-Mutanten

Bereits durchgeführte Kristall- und Strukturanalysen der plasmodialen AspAT (Jain *et al.*, 2010) ermöglichten, in Kollaboration mit Matthew Groves (EMBL, Hamburg), die Identifizierung verschiedener Aminosäurereste, welche zur Funktionalität des aktiven Zentrums sowie zur Interaktion der Monomere zum Dimer beitragen. Mittels der mutierten AspAT soll die *Pf*AspAT *in vivo* weggefangen und somit inaktiviert werden. Um dies zu ermöglichen, wurde die AspAT an zwei Stellen mutiert, im aktiven Zentrum und an einer weiteren Stelle, welche nach Dimerisierung mit dem Wildtyp-Monomer dieses inaktiviert.

Das in Abbildung 37 dargestellte Strukturmodell der AspAT wurde mit der Software PyMol generiert und zeigt in 37. a das aktive Zentrum des einen Monomers (gelb) mit dem gebundenen Co-Faktor PLP (orange), die Aminosäure R257 desselben Monomers sowie die Aminosäure Y68 des zweiten Monomers (grün). In Abbildung 37. b ist das gleiche Strukturmodell nach Mutation der beiden Aminosäuren zu Alanin gezeigt.

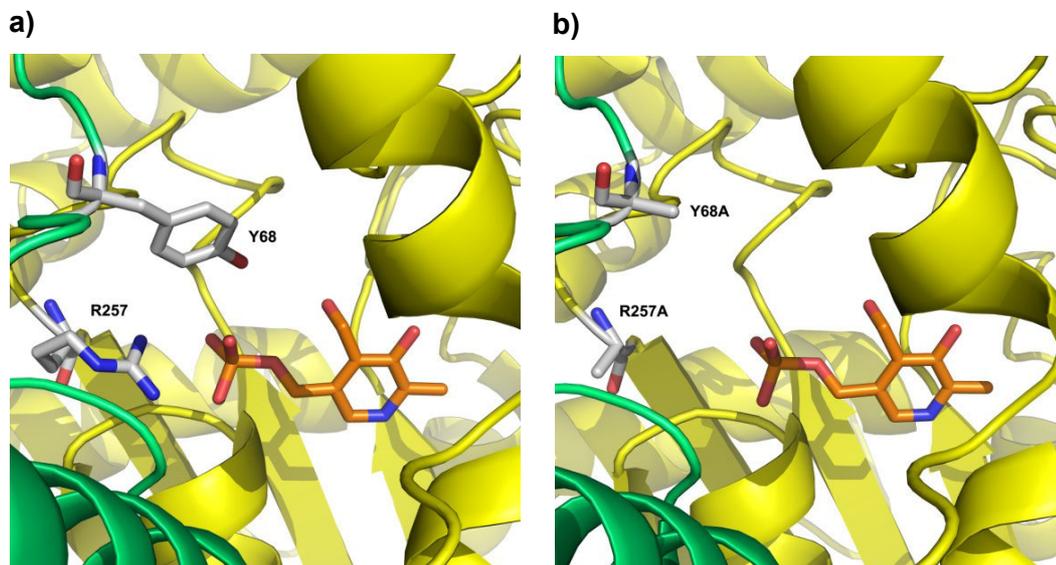


Abb. 37 Kristallstruktur eines aktiven Zentrums des Dimers der *Pf*AspAT (PDB ID: 3K7Y) mit gebundenem Co-Faktor PLP (orange). **a)** Interaktion des PLPs mit den Aminosäuren Y68 und R257. **b)** Strukturmodell nach Mutation der entsprechenden Aminosäuren zu Alanin. Das Modell wurde mit der Software PyMol generiert.

Zunächst wurden die ausgewählten Aminosäuren Y68 und R257 jeweils mittels „site-directed“-Mutagenese PCR (Abschnitt 2.2.3) zu Alanin mutiert. Anschließend wurden die entsprechenden Sequenzen in den pASK-IBA3plus-Vektor vor einen Strep-Tag kloniert und in *E. coli* rekombinant hergestellt. Die Proteine wurden über ihren Strep-Tag aufgereinigt und auf ihre Aktivität hin überprüft (Assay Abschnitt 2.7.1). Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, zeigt der AspAT-Wildtyp (AspAT-WT) eine spezifische Aktivität von 1,71 U/ mg wohingegen die beiden Einzelmutanten nicht aktiv sind. Um zu gewährleisten, dass durch die Bindung der Mutante auch der Wildtyp inaktiviert wird, musste das Konstrukt AspAT-Y68A/R257A generiert werden, welches beide Mutationen trägt und im Folgenden als AspAT-CoMutante bezeichnet wird. Das auch diese doppelt mutierte AspAT keine Aktivität mehr aufweist, wurde ebenfalls überprüft und ist in Abbildung 38 gezeigt.

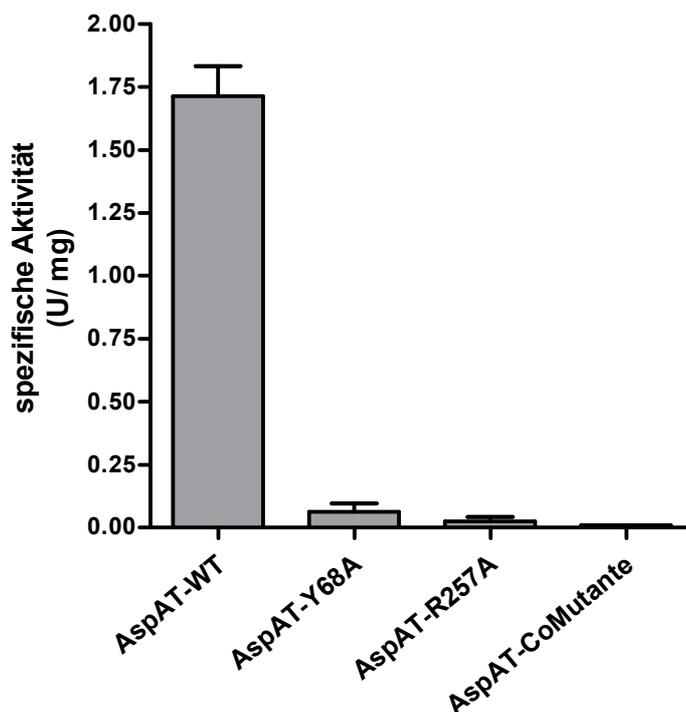


Abb. 38 Aktivitätstests der über Strep aufgereinigten AspAT-Proteine. AspAT-WT spezifische Aktivität: $1,71 \pm 0,12$ U/ mg ; AspAT-R257A spezifische Aktivität: $0,025 \pm 0,017$ U/ mg und AspAT-Y68A spezifische Aktivität $0,063 \pm 0,032$ U/ mg; AspAT-CoMutante spezifische Aktivität $0,01 \pm 0,0005$ U/ mg; n = 3.

Die erfolgreiche Expression sowie die Reinheit der aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 39).

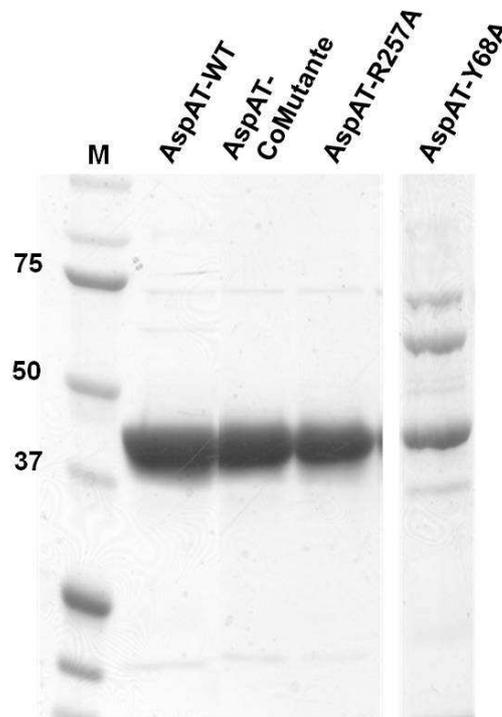


Abb. 39 SDS-PAGE der über den Strep-Tag aufgereinigten Proteine AspAT-WT, AspAT-CoMutante, AspAT-R257A und AspAT-Y68A.

Da die AspAT-CoMutante den Wildtyp *in vivo* binden und somit inaktivieren soll, muss diese in der Lage sein, mit dem AspAT-WT Dimere auszubilden. Ob die AspAT-CoMutante trotz doppelter Mutation die gleiche Konformation aufweist und somit wie die AspAT-WT Dimere ausbildet, wurde mittels FPLC und SLS überprüft.

Das AspAT-WT Protein eluiert bei einem Eluationsvolumen von 60 ml. Die Doppelmutante AspAT-CoMutante sowie die beiden AspAT-Proteine mit einzelnen Mutationen haben ihr Eluationsmaxima bei einem Volumen von 62 ml (Abbildung 40). Somit eluieren die mutierten AspAT-Proteine später als der Wildtyp.

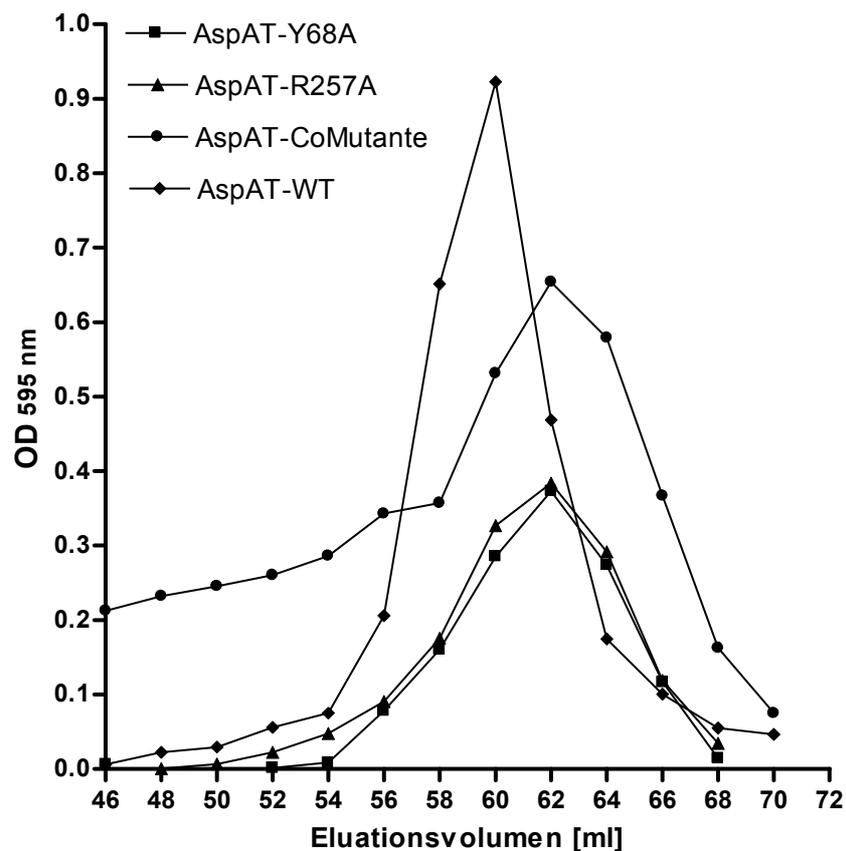


Abb. 40 FPLC-Analyse der einzelnen AspAT-Proteine. Es ist die jeweilige OD bei 595 nm gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Das Elutionsmaximum der AspAT-WT liegt bei einem Elutionsvolumen von 60 ml. Die Elutionsmaxima der Proteine AspAT-R257A, AspAT-Y68A und AspAT-CoMutante liegen bei einem Volumen von 62 ml.

Die FPLC-Analyse zeigt, dass die Mutanten später als der Wildtyp eluieren und somit eventuell nicht als Dimere vorliegen. Um dies zu überprüfen, wurden die Proteine zusätzlich mittels SLS analysiert. Die Abbildung 41 veranschaulicht, dass die AspATs mit Einzelmutationen die gleiche molekulare Masse von 94 kDa aufweisen und somit, wie die Wildtyp-AspAT, als Dimere vorliegen. Die beiden Mutanten weisen jedoch eine kompaktere Konformation als der Wildtyp auf, wodurch sie kleiner sind und somit etwas später eluieren.

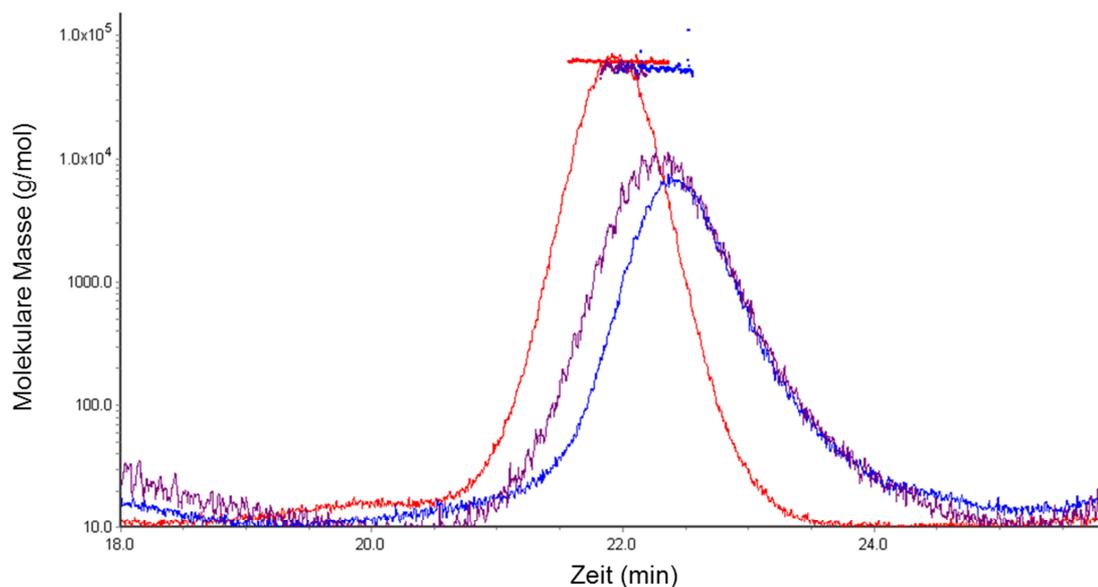


Abb. 41 SLS-Graf der unterschiedlichen AspAT-Proteine. rot:AspAT-WT; lila: AspAT-Y68A; blau: AspAT-R257A.

3.2.1.3 Co-Expression von pASK-IBA3-AspAT-WT-Strep und pBM1-AspAT-CoMutante-His

Im Folgenden sollte gezeigt werden, dass die AspAT-CoMutante den AspAT-WT binden und inaktivieren kann. Dafür wurde zunächst eine Co-Aufreinigung beider Proteine durchgeführt. Es war jedoch nicht möglich weder den WT über die AspAT-CoMutante noch die CoMutane über AspAT-WT mit aufzureinigen. Daraufhin wurde ein anderer Ansatz gewählt, bei dem beide Proteine direkt in *E. coli* co-exprimiert werden sollten. Die AspAT-CoMutante wurde dafür in den zuvor generierten pBM1-Vektor (Abschnitt 2.3.2.1) kloniert, über Chloramphenicol selektioniert und die Expression mittels IPTG induziert. Zuvor kompetent gemachte BLR-DE3 Zellen die bereits das Plasmid pASK-IBA3-AspAT-WT-Strep enthielten wurden mit pBM1-AspAT-CoMutante-His co-transformiert und die Expression beider Proteine gleichzeitig bei A 600 nm von 0,5 induziert. Es wurden zunächst verschiedene IPTG-Konzentrationen getestet (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM und 1,5 mM), wobei die Expression bei allen getesteten IPTG-Konzentrationen gleich effizient war. Im Anschluss wurde die optimale Expressionsbedingung für die gleichzeitige Expression beider Proteine getestet, welche im Western-Blot überprüft wurde (Abbildung 42).

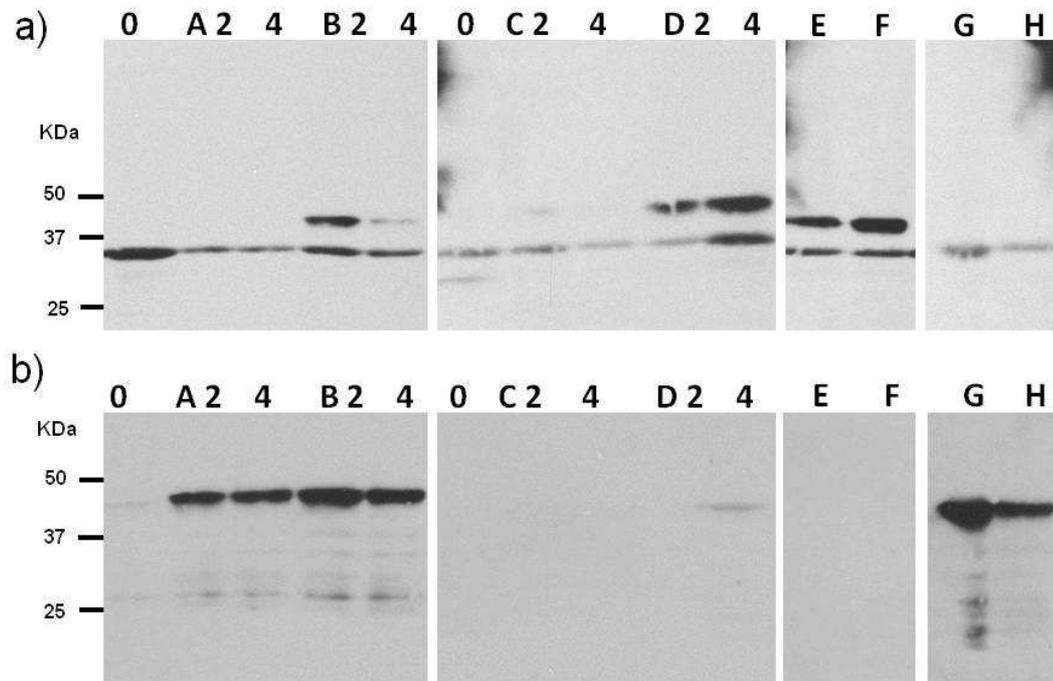


Abb. 42 Co-Expression von pASK-IBA3-AspAT-WT-Strep und pBM1-AspAT-CoMutante-His - Austesten der optimalen Expressionsbedingungen für beide Proteine **A-D**: Probenentnahme nach zwei und vier Stunden nach Induktion (2, 4); **A**: AHT und IPTG-Induktion gleichzeitig, 37°C; **B**: AHT und IPTG-Induktion gleichzeitig, 21°C; **C**: 1. AHT-Induktion, zwei Stunden später IPTG, 37°C; **D**: 1. AHT-Induktion, zwei Stunden später IPTG, 21°C Inkubation; **E-F**: Probenentnahmen jeweils nach 4 Stunden **E**: nur AHT, 37°C; **F**: nur AHT, 21°C; **G**: nur IPTG, 37°C; **H**: nur IPTG, 21°C. **a)** Nachweis der Expression von **pASK-IBA3-AspAT-WT-Strep** mittels **Strep-Antikörper** (Anti-Strep 1:4000) **b)** Nachweis der Expression von **pBM1-AspAT-CoMutante-His** mittels **His-Antikörper** (Anti-His 1:10000)

Die effektivste Expression beider Proteine fand bei gleichzeitiger Induktion von AHT (50 μ M) und IPTG (1 mM) und der anschließenden Inkubation bei 21°C für zwei Stunden statt (Abb.42 a und b; B2).

Bei der Aufreinigung stellte sich heraus, dass die gewählte IPTG-Konzentration von 1 mM dazu führt, dass die Proteine in „inclusion bodies“ und somit in der unlöslichen Fraktion, im Zellpellet, vorlagen. Durch die Verwendung von nur 0,1 mM IPTG zur Expression unter ansonsten identischen Bedingungen (gleichzeitige Induktion, 21°C, zwei Stunden) befanden sich die Proteine in der löslichen Fraktion und konnten somit aufgereinigt werden.

Um zu zeigen, dass die AspAT-CoMutante die Wildtyp AspAT binden kann, wurde nach der Co-Expression beider Proteine in *E. coli* eine Co-Aufreinigung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen von 3 L Kultur verwendet und die rekombinanten Proteine über den Strep-Tag der Wildtyp AspAT bzw. über den His-Tag der AspAT-CoMutante isoliert. Daraufhin wurden beide Eluate im Western-Blot analysiert (Abbildung 43. a, b). Der His-Antikörper zeigte sowohl im His-Eluat als auch im Strep-Eluat ein Signal bei 47 kDa an. Dies konnte ebenfalls mittels Strep-Antikörper in beiden Eluaten detektiert werden. Somit wurde gezeigt, dass die zweifach mutierte AspAT (AspAT-CoMutante-His) in der Lage ist, die AspAT-WT-Strep zu binden.

Anschließend wurde die Aktivität der Enzyme, sowohl des Strep-Eluats (AspAT-WT-Strep + gebundene AspAT-CoMutante-His) als auch des His-Eluats (AspAT-CoMutante-His + gebundene AspAT-WT-Strep), im Aktivitätstest (Abschnitt 2.7.1) analysiert. Wie der Abbildung 43. c zu entnehmen ist, weisen die Enzyme des Strep-Eluats eine spezifische Aktivität von $1,38 \pm 0,071$ U/mg auf. Die Enzyme des His-Eluats sind hingegen nicht aktiv.

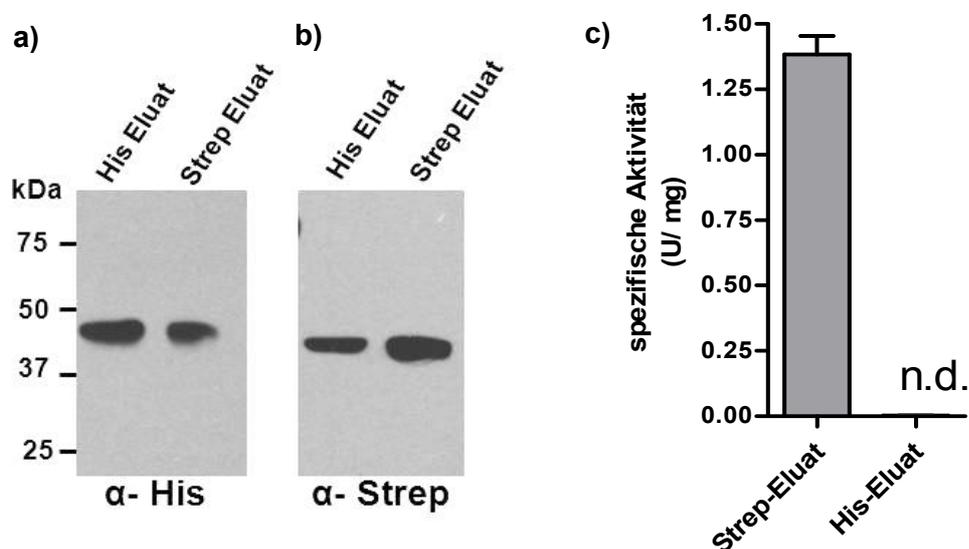


Abb. 43 a und b) Co-Aufreinigung der Co-Expression von AspAT-CoMutante-His + AspAT-WT-Strep in *E. coli*. Je einmal über Strep- bzw. His-Tag aufgereinigt. **a)** Nachweis von AspAT-CoMutante-His mittels His-Antikörper (Anti-His 1:10000); **b)** Nachweis von AspAT-WT-Strep mittels Strep-Antikörper (Anti-Strep 1:5000). **c)** Aktivitätstests mit Enzymen beider Eluate der Co-Aufreinigungen. Strep-Eluat: (AspAT-WT-Strep + AspAT-CoMutante-His) $1,38 \pm 0,071$ U/mg; His-Eluate: (AspAT-CoMutante-His + AspAT-WT-Strep) n.d. nicht detektierbar.

3.2.1.4 *in vivo* - 3D7-AspAT Überexprimierer

Dass die rekombinate AspAT-CoMutante von den transgenen Plasmodien exprimiert wird, wurde mittels des Plasmodien-Extrakts von 3D7-AspAT-CoMutante-Strep im Western-Blot im Vergleich zum Wildtypstamm 3D7 überprüft. Der Extrakt wurde mit dem Strep-Antikörper zum Nachweis den Strep-Tags des AspAT-CoMutante-Strep Proteins beprobt (Abbildung 44. a) Im Blot konnte bei den transgenen Parasiten eine Bande bei 47 kDa detektiert werden. Der 3D7-Extrakt zeigt keine Bande an.

Total mRNA von den transgenen 3D7-AspAT-WT und der 3D7-AspAT-CoMutante Plasmodien sowie 3D7-Mock wurde, wie unter Abschnitt 2.2.16 beschrieben, isoliert und in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.2.19). Die cDNAs wurden daraufhin als Templates für die quantitativen RT-PCRs (Abschnitt 2.2.20) eingesetzt und die Transkriptmengen bestimmt. Wie der Abbildung 44. b zu entnehmen ist, konnte für den 3D7-AspAT-WT eine 11fach erhöhte Transkriptmenge der AspAT und für 3D7-AspAT-CoMutante eine 13fach erhöhte AspAT-Transkriptmenge gegenüber 3D7-Mock ermittelt werden.

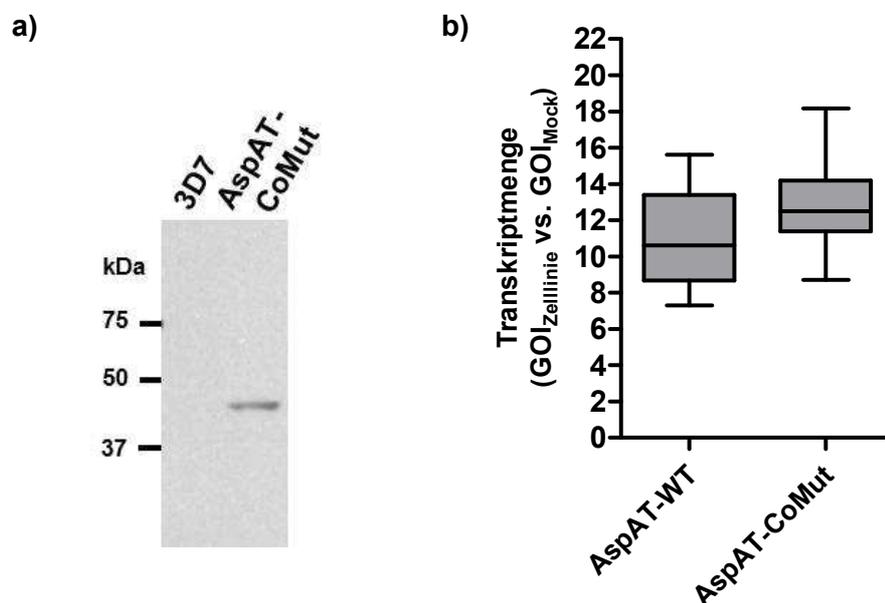
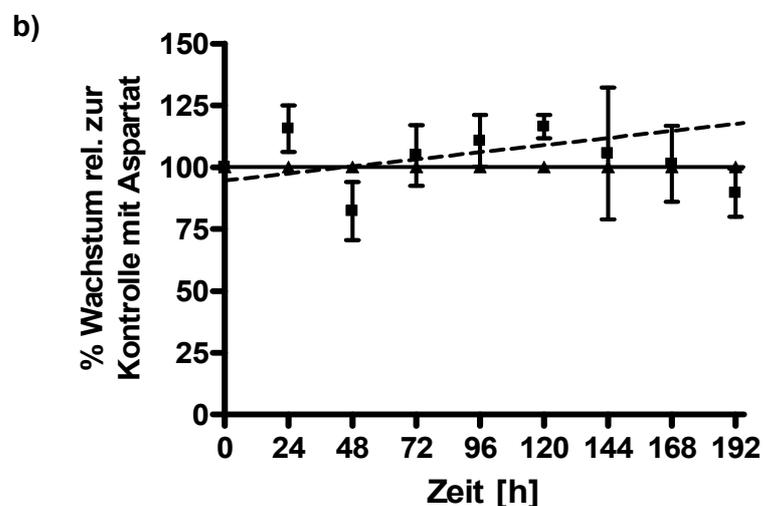
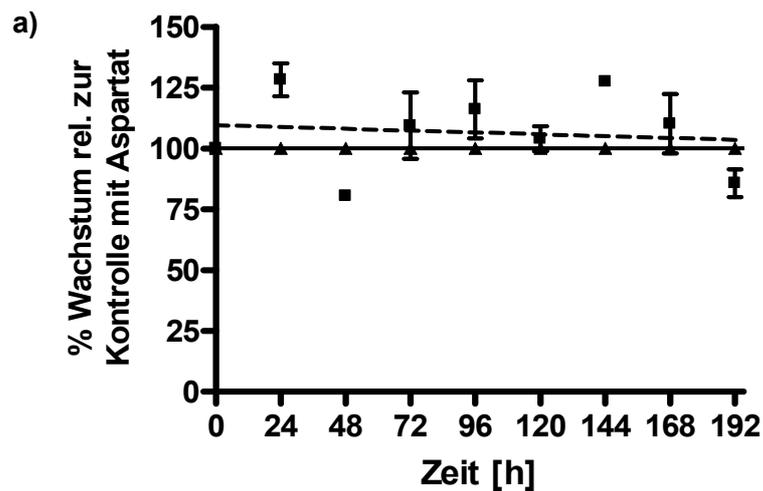


Abb. 44 a) Western-Blot mit Plasmodien-Extrakten des 3D7 Wildtyp-Stammes und des transgenen Stammes 3D7-AspAT-CoMutante-Strep. Detektion des Strep-Tags mittels Strep-Antikörper (1:5000). **b)** Quantitative RT-PCR Analyse der 3D7-AspAT-WT und 3D7-AspAT-CoMutante. Transkriptmenge der GOI-Zelllinie relativ zu GOI-Mock Zelllinie. 3D7-AspAT-WT: $11,04 \pm 1,73$; $n=4$. 3D7-AspAT-CoMutante: $12,87 \pm 0,99$; $n=8$.

3.2.1.5 Analyse transgener 3D7-AspAT Zelllinien unter Mangel an Aspartat

Um den möglichen Einfluss der Überexpression der inaktiven AspAT in *P. falciparum* zu analysieren, wurden die mit pARL-AspAT-CoMutante transfizierten Parasiten, im Vergleich zur 3D7-Mock und 3D7-AspAT-WT Zelllinie, mit und ohne Aspartat für 192 h kultiviert. Es wurden täglich Ausstriche angefertigt und ausgezählt (500 Erythrozyten). Es ließ sich kein Wachstumsunterschied der 3D7-Mock und der transgenen 3D7-AspAT-WT Zelllinie mit (20 mg/ml) und ohne Aspartat im Medium erkennen (Abbildungen 45. a und 45. b). Die mit pARL-AspAT-CoMutante transgenen 3D7-Plasmodien wiesen jedoch ohne Aspartat nach bereits 96 h ein schlechteres Wachstum im Vergleich zur Kontrolle mit Aspartat auf (Abbildung 45. c).



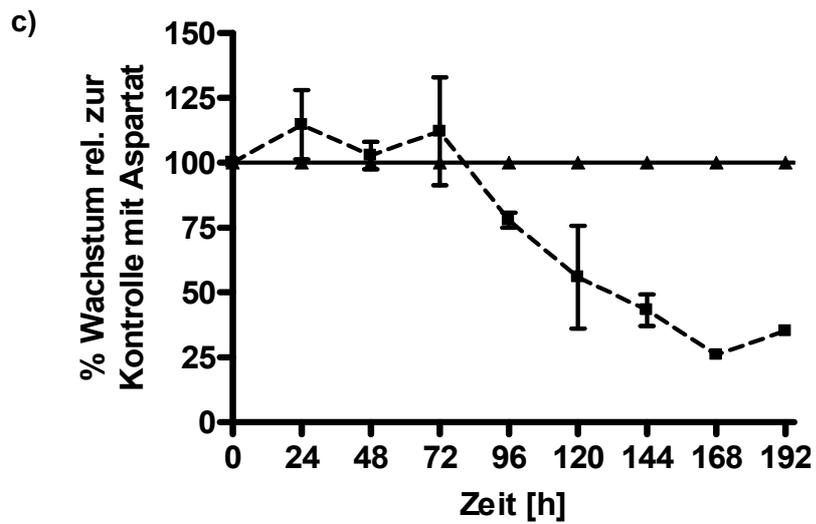


Abb. 45 Wachstum der transgenen Kulturen **a)** 3D7-Mock-WR, **b)** 3D7-AspAT-WT und **c)** 3D7-AspAT-CoMutante jeweils ohne Aspartat (Quadrate) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (mit Aspartat-Dreiecke) gegen Zeit in h. Die unbehandelte Kontrolle wurde zu jedem Datenpunkt auf 100% normalisiert.

3.2.2 Analysen der MDH

3.2.2.1 Bestimmung der kinetischen Konstante K_M für MDH

Zur Bestimmung des K_M -Wertes der rekombinanten MDH von *P. falciparum* für das Substrat Malat wurden, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, variierende Konzentrationen an L-Malat (0,1 mM bis 2 mM) eingesetzt und die Aktivität der MDH bei der jeweiligen Substratkonzentration berechnet und gegen die entsprechende Substratkonzentration in einer Michaelis-Menten Funktion aufgetragen. Der so ermittelte K_M -Wert für L-Malat liegt, wie der Abbildung 46 zu entnehmen ist, bei $0,54 \pm 0,12$ mM.

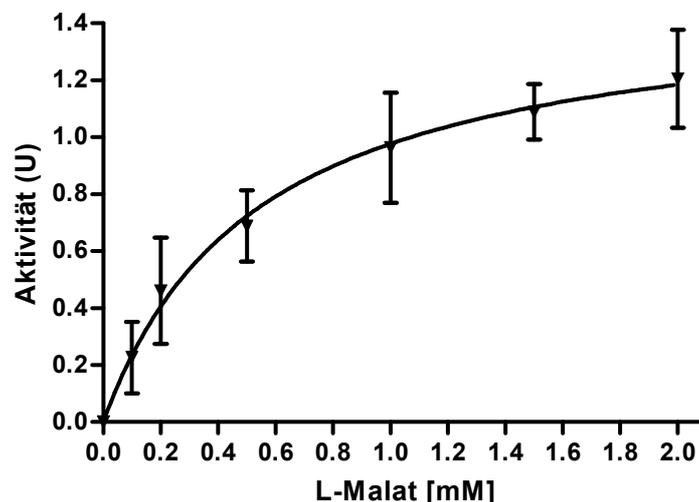


Abb. 46 Michaelis-Menten-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes der MDH für L-Malat. Es wurde die Aktivität in Units (U) bei entsprechender Substratkonzentration gegen die L-Malat Konzentrationen von 0,1 mM bis 2 mM aufgetragen (Quadrate: Mittelwerte \pm SD, $n=4$). GraphPad Prism 4.0: $V_{\max} = 1,2$ U; $K_M = 0,54 \pm 0,12$ mM.

Anschließend wurde der K_M -Wert der plasmodialen MDH für Oxalacetat, das Substrat der Rückreaktion, bestimmt. Es wurde wiederum die Aktivität der MDH bei entsprechenden Substratkonzentrationen gegen die Oxalacetat-Konzentrationen von 0,05 mM bis 1 mM aufgetragen (Abbildung 47). Da die Aktivität der MDH für Oxalacetat keinen Michaelis-Menten-Verlauf zeigte, konnte kein K_M -Wert für Oxalacetat bestimmt werden.

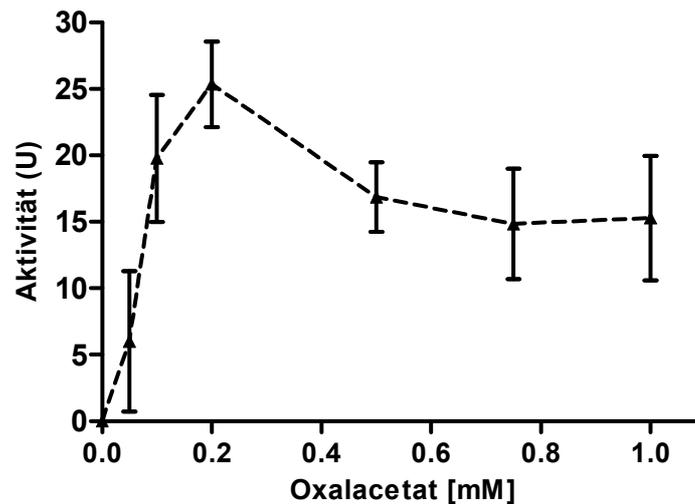


Abb. 47 Aktivität der MDH bei steigender Oxalacetat-Konzentration. Es wurde die Aktivität in Units (U) bei entsprechender Substratkonzentration gegen die Oxalacetat-Konzentrationen von 0,05 mM bis 1 mM aufgetragen (Quadrate: Mittelwert \pm SD, n=3).

3.2.2.2 Generierung und Charakterisierung inaktiver MDH-Mutanten

Für die weitere Analyse der AspAT-CoMutante in Plasmodium, wurden verschiedene inaktive MDH-Mutanten untersucht, welche zusammen mit der AspAT-CoMutante in Plasmodien überexprimiert werden sollen.

Bereits durchgeführte Kristall- und Strukturanalysen der plasmodialen MDH (Wrenger *et al.*, 2012b) ermöglichten, in Kollaboration mit Matthew Groves (EMBL, Hamburg), die Identifizierung verschiedener Aminosäurereste, welche zur Funktionalität des aktiven Zentrums, sowie zur Interaktion der Dimere beitragen könnten. Mittels der mutierten MDH soll ebenfalls die MDH *in vivo* weggefangen und somit inaktiviert werden. In Abbildung 48 ist das Modell des Tetramers der plasmodialen MDH dargestellt. Es zeigt die vier Monomere A (gelb), B (pink), C (blau) und D (grün). Die Dimere B und D lagern sich mit dem Dimer A und C zu einem Tetramer zusammen. Des Weiteren sind in Abbildung 48 Ausschnitte des MDH-Tetramers, mit den entsprechenden Positionen der zu mutierenden Aminosäuren, dargestellt.

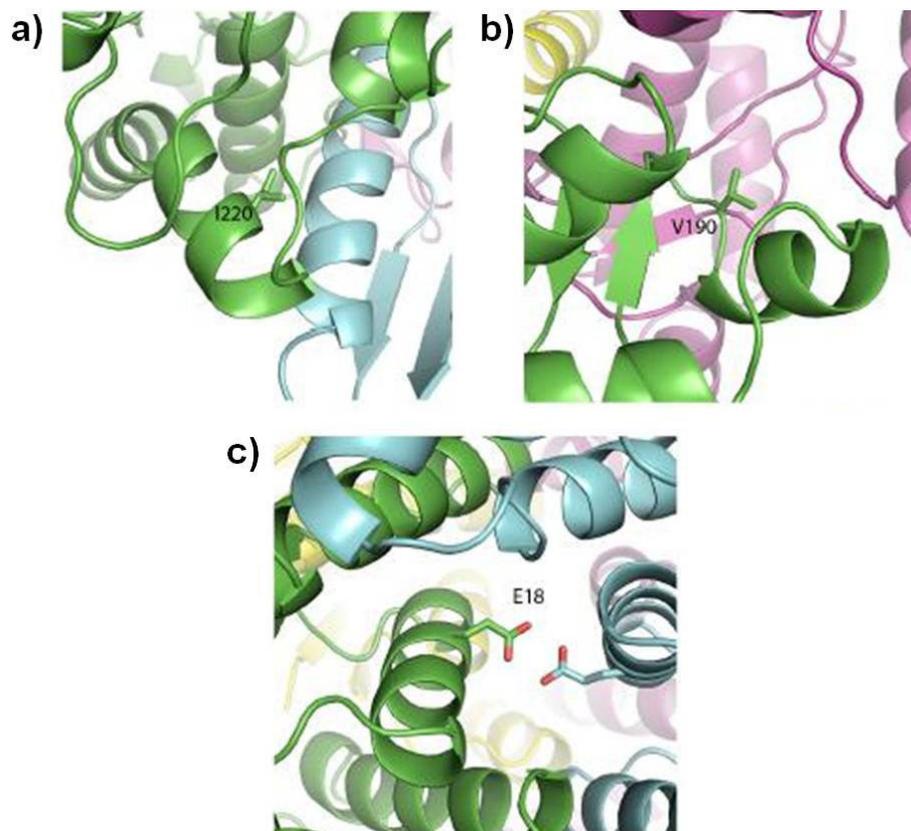
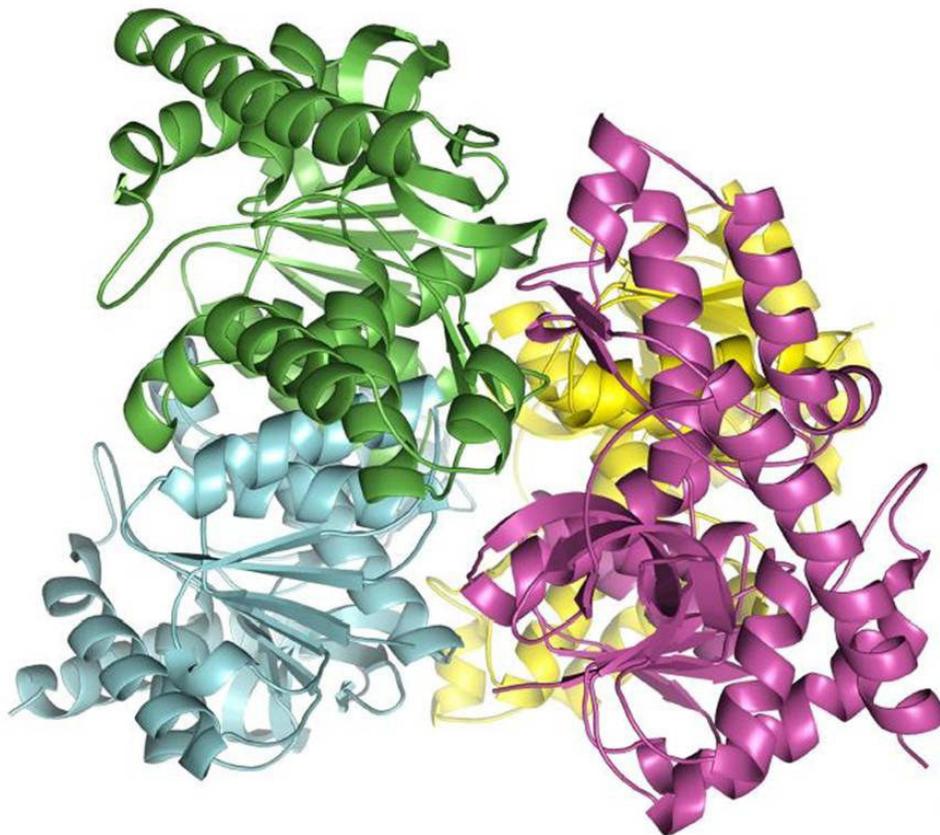


Abb. 48 Oben: Strukturmodell des MDH-Tetramers. Monomer A: gelb, Monomer B: pink, Monomer C: blau, Monomer D: grün; **Unten:** Ausschnitte des MDH-Modelles mit entsprechenden Mutationpositionen. **a)** I220, **b)** V190, **c)** E18; zur Verfügung gestellt von Dr. Matthew Groves.

Mittels „site-directed“-Mutagenese-PCR wurden die Aminosäuren I220, V190 zu Tryptophan und die Aminosäure E18 zu Glutamin (E18Q) mutiert. Die Proteine wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt und die Reinheit der aufgereinigten Proteine im SDS-Gel überprüft (Abbildung 49).

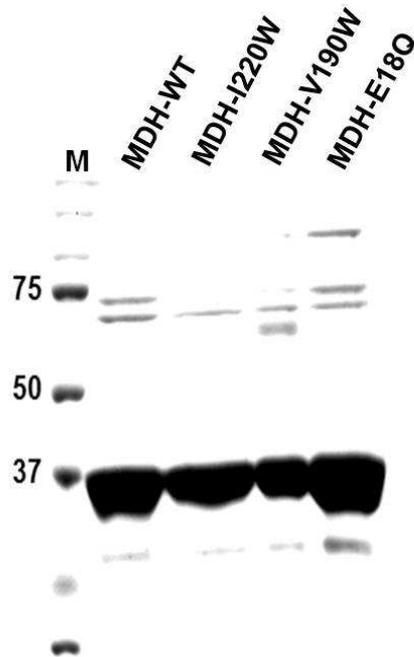
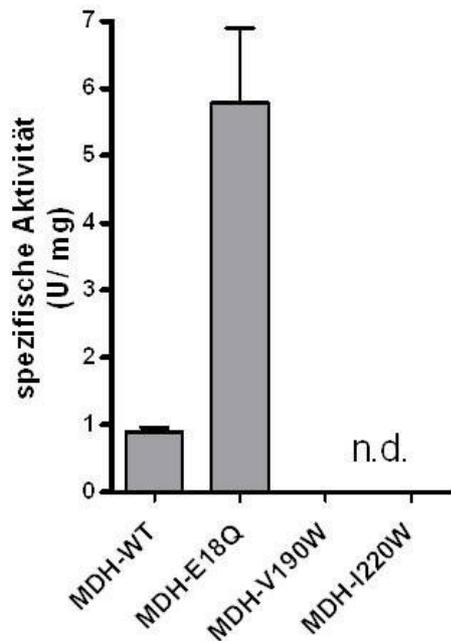
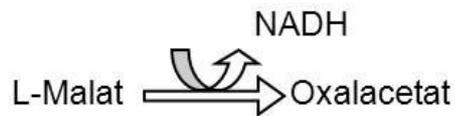


Abb. 49 SDS-PAGE der über einen His-Tag aufgereinigten Proteine MDH-WT, MDH-I220W, MDH-V190W und MDH-E18Q.

Wie der Abbildung 50 zu entnehmen ist, zeigt der MDH-Wildtyp (MDH-WT) eine spezifische Aktivität von 0,9 U/ mg für die Hin- und 25,2 U/ mg für die Rück-Reaktion. Die Mutanten MDH-I220W und MDH-V190W zeigen keine Aktivität. Für die Mutante MDH-E18Q konnte eine Aktivität von 5,8 U/ mg für die Hin- und 316,7 U/ mg für die Rück- Reaktion bestimmt werden. Im Vergleich zum rekombinanten MDH-WT ist dieses MDH-Enzym somit 6fach aktiver in der Hin- bzw. 15fach aktiver in der Rück-Reaktion.

a) Hinreaktion



b) Rückreaktion

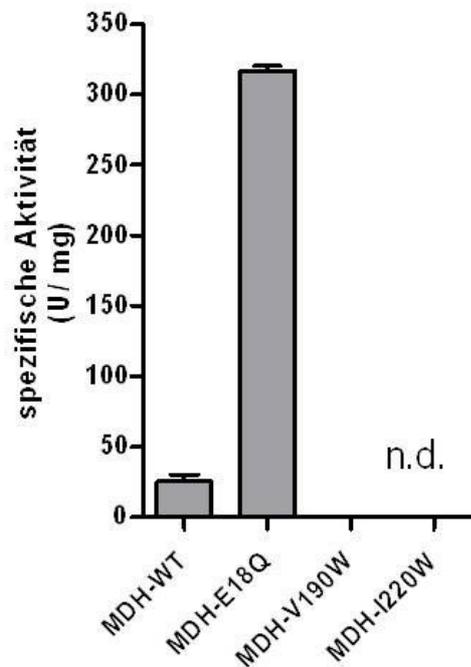
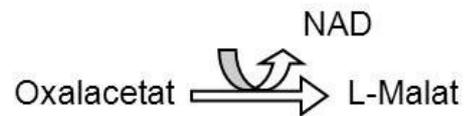


Abb. 50 Darstellung der spezifischen Aktivitäten der MDH-Proteine. **a)** Hinreaktionen: MDH-WT 0,9 U/ mg; MDH-E18Q 5,8 U/ mg; MDH-V190W n.d.; MDH-I220W n.d.; $n \geq 2$. **b)** Rückreaktionen: MDH-WT 25,2 U/ mg; MDH-E18Q 316,7 U/ mg; MDH-V190W n.d.; MDH-I220W n.d. nicht detektierbar; $n \geq 2$.

3.2.2.3 Bindung der Wildtyp-MDH durch die Mutanten

Um zu zeigen, dass die inaktiven Mutanten I220W und V190W in der Lage sind die Wildtyp-MDH zu binden, wurde eine Co-Aufreinigung, wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben, durchgeführt. Die Proteine wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen über die Ni-NTA aufgereinigt und anschließend im Western-Blot analysiert. Wie in Abbildung 51 zu sehen ist, zeigen beide Aufreinigungen sowohl bei dem Mischungsverhältnis 75%/ 25% (His/ Strep) als auch bei einer Mischung von 25 %/ 75 % (His/ Strep) eine distinkte Bande bei einer molekularen Masse von 34 kDa im Western-Blot, welcher mit dem Strep- und mit dem His- Antikörper beprobt wurde.

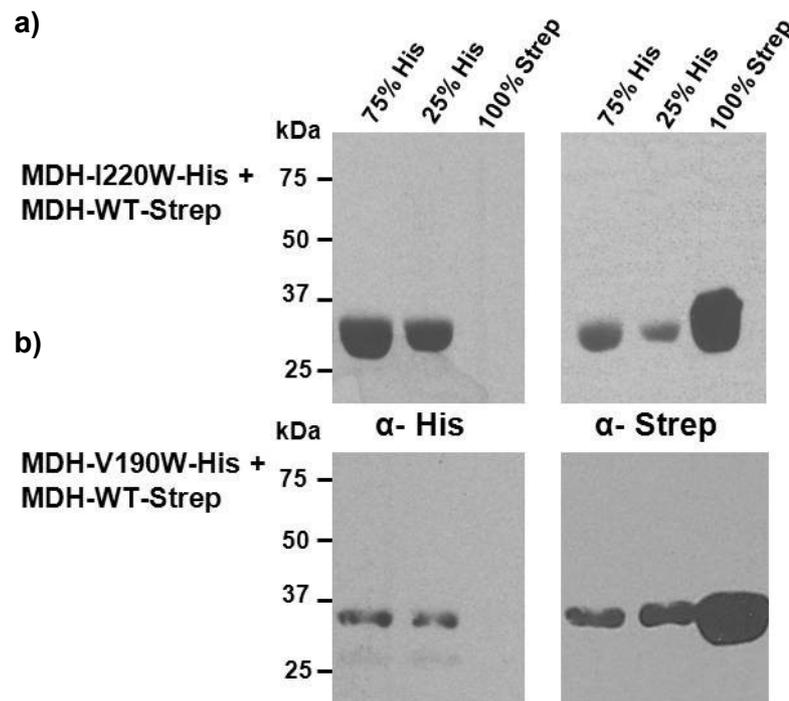


Abb. 51 Western-Blots der Co-Aufreinigungen über Ni-NTA **a)** MDH-I220W-His + MDH-WT-Strep und **b)** MDH-V190W-His + MDH-WT-Strep. Die linken Blots wurden jeweils mit dem His-Antikörper, die rechten mit dem Strep-Antikörper beprobt.

3.2.2.4 Inaktivierung des Wildtyps durch die Mutante

Je 1 μg der Proteine der Co-Aufreinigungen wurden anschließend im Aktivitätstest eingesetzt, um die Inaktivierung der mit aufgereinigten MDH-WT zu untersuchen. Es wurde jeweils die Hin- als auch die Rück- Reaktion analysiert und mit der Aktivität des alleine aufgereinigten MDH-WT verglichen. In Abbildung 52 sind die Ergebnisse des Aktivitätstests zusammengefasst. Der MDH-WT alleine ist sowohl bei der Oxidation von Malat (NADH-Bildung), als auch bei der Reduktion von Oxalacetat (NADH-Verbrauch) aktiv (Abbildung 52. a). Die beiden Co-Aufreinigungen MDH-V190W-His + MDH-WT-Strep (Abbildung 52. b) und MDH-I220W-His + MDH-WT-Strep (Abbildung 52. c) zeigen weder in der Hin- noch in der Rück- Reaktion Aktivität.

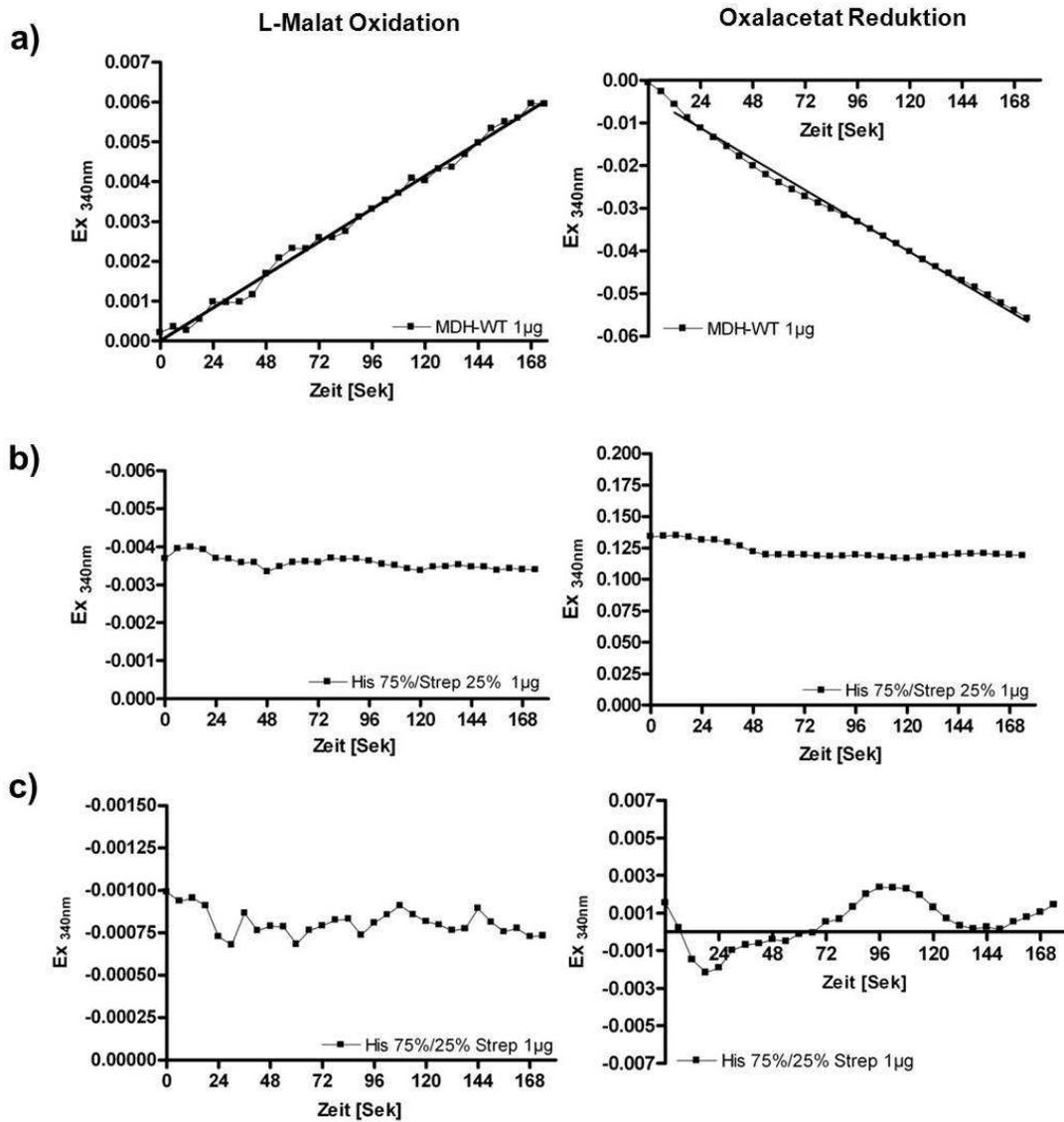


Abb. 52 Aktivitätstests der über den His-Tag der Mutante co-aufgereinigten MDH-WT. (Mischungsverhältnis 75% His/ 25% Strep); **a)** Positivkontrolle: nur MDH-WT; **b)** MDH-V190W-His + MDH-WT-Strep; **c)** MDH-I220W-His + MDH-WT-Strep. Auf der linken Seite sind jeweils die Hinreaktionen gezeigt (L-Malat Oxidation) und die rechten Graphen zeigen die entsprechenden Rückreaktionen (Oxalacetat Reduktion).

3.2.2.5 Lokalisationsstudie der MDH in *P. falciparum*

Im Gegensatz zu anderen Eukaryonten, welche eine zytosolische und eine mitochondriale MDH besitzen, kommt im Genom von *P. falciparum* nur ein Gen vor, welches für eine MDH kodiert. Um die plasmodiale MDH im Parasiten lokalisieren zu können, wurde das GFP-Fusionskonstrukt (pARL-MDH-GFP) verwendet. Die Lokalisation der transgenen Expression des MDH-GFP Proteins wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierfür wurde die Kultur mit Hoechst, zur Färbung des Zellkerns versehen. Das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der transgenen 3D7-MDH-GFP Parasiten ist in der folgenden Abbildung 53 dargestellt. Es zeigte sich in allen Blutstadien eine diffuse Fluoreszenz des GFPs im Zytosol der Parasiten.

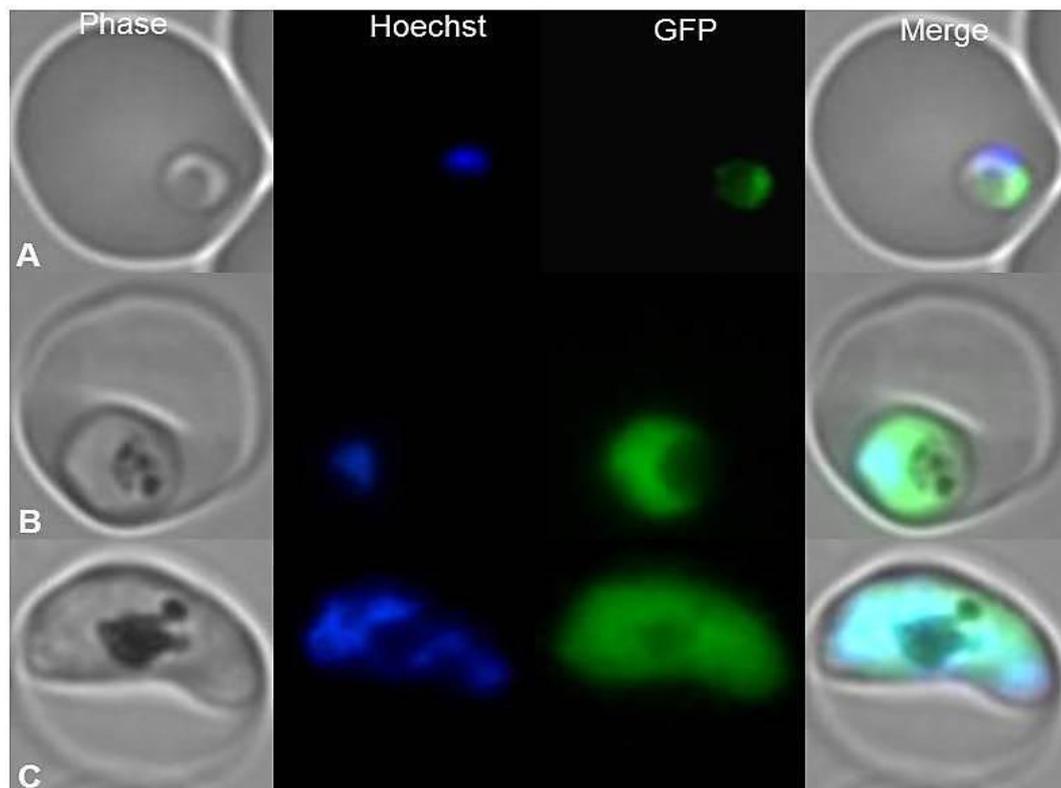


Abb. 53 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transgenen 3D7-MDH-GFP Plasmodien. Phase: Parasiten im Durchlicht; Hoechst: (1:1000) Zellkernfärbung; GFP: Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins; Merge: Überlagerung aller drei Bilder; In A ist ein junger Trophozoit im Ringstadium, in B ist ein Trophozoit und unter C ist ein reifer Schizont dargestellt.

3.2.2.6 Analyse der 3D7-MDH Überexprimierer unter Standardbedingungen

Um für spätere Versuche eine Aussage über das Wachstum der verschiedenen Überexprimierer treffen zu können, wurde zunächst das Wachstum der 3D7-MDH Überexprimierer unter Standardkulturbedingungen betrachtet (Abbildung 54. a). Es ist der Logarithmus der kumulativen Parasitämie der Zelllinien 3D7-MDH-WT, 3D7-MDH-I220W, 3D7-MDH-V190W, 3D7-MDH-E18Q und als Kontrolle die Mock-Zelllinie (3D7-Mock-BSD), welche nur den Leervektor pARL-BSD trägt, gegen die Zeit in h aufgetragen. Mittels GraphPad Prism wurden die Regressionsgeraden für die einzelnen Überexprimierer ermittelt und verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Steigungen der Regressionsgeraden besteht. Die folgenden Steigungen für die jeweiligen Regressionsgeraden konnten ermittelt werden: 3D7-Mock-BSD 0,015, 3D7-MDH-I220W 0,0171, 3D7-MDH-V190W 0,0157, 3D7-MDH-E18Q 0,0158 und 3D7-MDH-WT 0,0163. Dass das jeweilige MDH-Konstrukt von den Parasiten exprimiert wird, wurde mit den Extrakten der transgenen Parasiten über den His-Tag im Western-Blot im Vergleich zum 3D7-Mock nachgewiesen. Wie der Abbildung 54. b zu entnehmen ist, zeigt der Blot je eine Bande bei einer molekularen Masse von 34 kDa bei den 3D7-MDH Überexprimierern, welche beim Extrakt von 3D7-Mock nicht zu detektieren war.

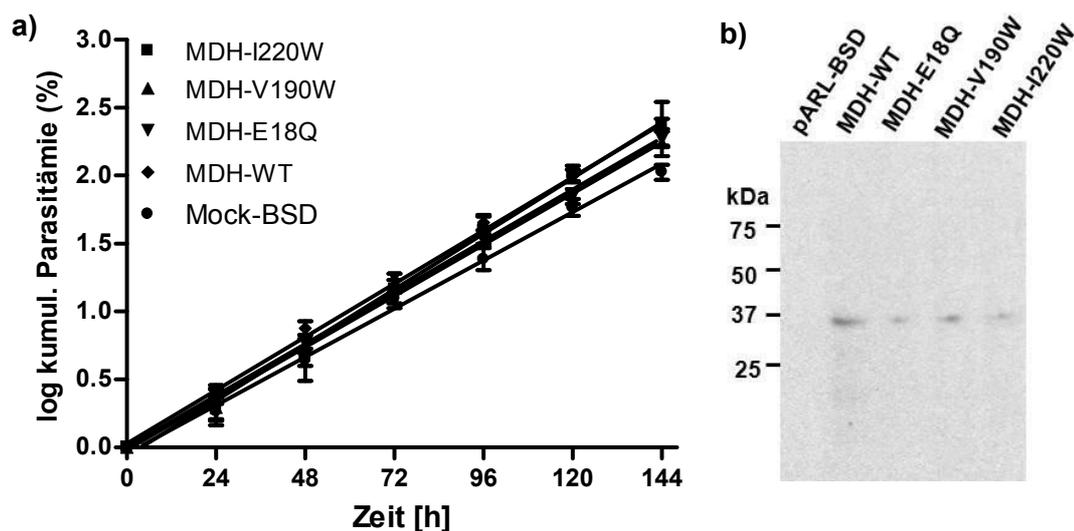


Abb. 54 Transgene 3D7-MDH Überexprimierer. **a)** Wachstum der einzelnen Zelllinien im Vergleich. Es ist der Logarithmus der kumulativen Parasitämie in % gegen die Zeit in h aufgetragen; Steigungen der Regressionsgeraden: 3D7-Mock-BSD: 0,015; 3D7-MDH-I220W: 0,0171; 3D7-MDH-V190W: 0,0157; 3D7-MDH-E18Q: 0,0158 und 3D7-MDH-WT: 0,0163; $p = 0,058$; $n = 3$. **b)** Western-Blot der Plasmodien-Extrakte. Detektion des His-Tags mittels His-Antikörper.

3.2.2.7 Analyse der 3D7-MDH Zelllinien unter variierenden Malat-Konzentrationen

Im Folgenden wurde untersucht ob Änderungen der Malat-Konzentration im Kulturmedium zu einem veränderten Wachstum der 3D7-MDH Überexprimierer führt. Dafür wurde mit den Zelllinien 3D7-Mock-BSD, 3D7-MDH-WT, 3D7-MDH-E18Q und 3D7-MDH-V190W ein 96 h Hypoxanthin-Einbau Test, wie in Abschnitt 2.4.7 beschrieben, mit L-Malat-Konzentrationen von 0,03 mM (Standard-Kulturbedingung) bis 7,5 mM angesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 55 graphisch dargestellt und zeigt, dass die erhöhten Malat-Konzentrationen auf die transgenen Parasiten keinen Einfluss haben und auch die unterschiedlichen Zelllinien bei allen Malat-Konzentrationen gleich vital sind, wie unter Standardbedingungen ohne Malat.

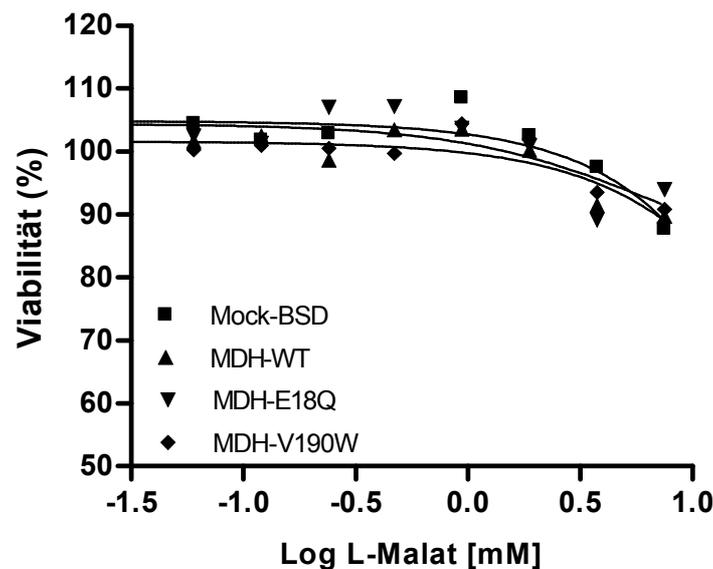


Abb. 55 Einfluss erhöhter Malat-Konzentrationen auf die verschiedene 3D7-MDH Überexprimierer. 96 h Hypoxanthin-Einbau Test mit den Zelllinien 3D7-Mock-BSD, 3D7-MDH-WT, 3D7-MDH-E18Q und 3D7-MDH-V190W. L-Malat wurde in einer Verdünnungsreihe von 0,03 mM bis 7,5 mM eingesetzt.

3.2.3 AspAT- und MDH-Mutanten - co-transgene Parasiten

3.2.3.1 Wachstumsanalyse unter Standardbedingungen

Um den Einfluss der Überexpression der inaktiven AspAT in *P. falciparum* noch zu verstärken, wurden die mit pARL-AspAT-CoMutante transfizierten Parasiten anschließend mit pARLMDH-V190W bzw. pARL-MDH-I220W co-transfiziert. Die generierten co-transgenen Zelllinien wurden anschließend im Vergleich zu 3D7-CoMock Zelllinie für 192 h kultiviert. In Abbildung 56 ist der Logarithmus der kumulativen Parasitämie in % gegen die Zeit in Stunden graphisch dargestellt. Die 3D7-CoMock Zelllinie hat nach 192 h eine kumulative Parasitämie von rund 3580 %, hingegen 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W von nur 170 % und 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W von rund 390 % kumulative Parasitämie erreicht. Mittels GraphPad Prism wurden die Steigungen der Regressionsgeraden ermittelt und verglichen. Es zeigte sich, dass der Unterschied zwischen den Steigungen der Regressionsgeraden der 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W bzw. 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W im Vergleich zu 3D7-Mock mit $p < 0,0001$ sehr signifikant ist. Um das Wachstum zu vergleichen, wurde die Steigung der Regressionsgeraden der 3D7-Mock Zelllinie mit 0,019 als 100 % angesehen und mit den anderen beiden Steigungen von 0,015 bzw. 0,014 ein relatives Wachstum für 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W von 79 % und für 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W von 74 % kalkuliert.

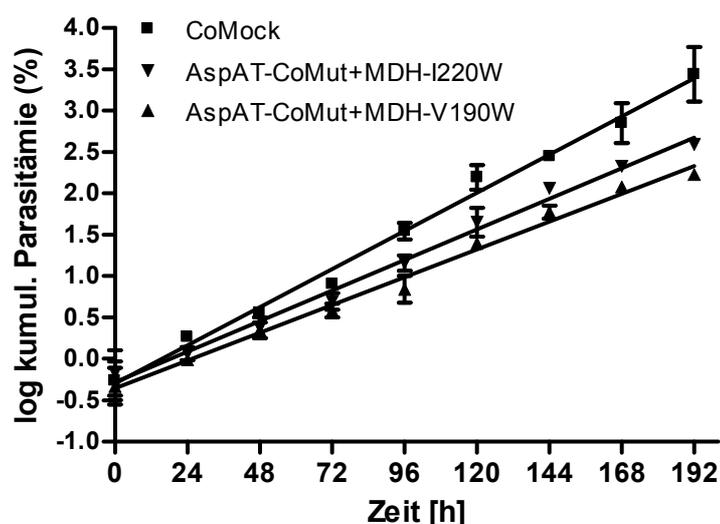


Abb. 56 Wachstumsvergleich der verschiedenen co-transgenen Zelllinien unter normalen Kulturbedingungen. 3D7-CoMock: Steigung $0,019 \pm 0,0008$; 100 %; 3D7-AspAT-

CoMutante/ MDH-I220W: Steigung $0,015 \pm 0,0006$; 79 %; 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W: Steigung $0,014 \pm 0,0005$; 74 %; ANCOVA ($p < 0,0001$).

Dass beide rekombinaten Proteine, AspAT und MDH, von den transgenen Plasmodien exprimiert werden, wurde mittels der entsprechenden Plasmodien-Extrakte im Western-Blot überprüft. Abbildung 57 zeigt die beiden Western-Blots mit den Extrakten von 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W und 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W, welche im Vergleich zum Wildtypstamm 3D7 analysiert wurden. Die Extrakte wurden einmal mit dem Strep-Antikörper zum Nachweis des Strep-Tags der AspAT-CoMutante-Strep (Abbildung 57. a) und mit dem His-Antikörper beprobt, welcher den His-Tag der jeweiligen MDH-Mutante (MDH-I220W-His bzw. MDH-V190W-His) detektiert (Abbildung 57. b). Im Western-Blot welcher mit dem Strep-Antikörper behandelt wurde, konnte bei beiden co-transgenen Parasiten-Kulturen eine Bande bei 47 kDa detektiert werden. Im 3D7-Extrakt konnte keine Bande detektiert werden. Der Blot, welcher mit dem His-Antikörper beprobt wurde, zeigt je eine spezifische Bande bei den co-transgenen Parasiten bei einer molekularen Masse von 34 kDa. Bei dem 3D7-Extrakt wurde eine unspezifische Bande bei rund 50 kDa detektiert.

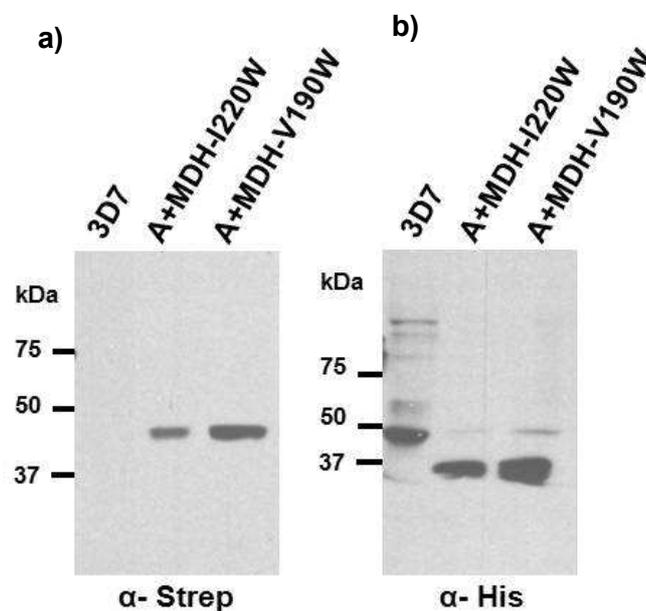


Abb. 57 Western-Blots mit Plasmodien-Extrakten. **a)** Detektion der AspAT-CoMutante-Strep mittels Strep-Antikörper (1:5000); **b)** His-Antikörper zur Detektion des MDH-I220W-His bzw. MDH-V190W-His (1:10000); A=AspAT-CoMutante-Strep.

3.2.3.2 qPCR Analyse der co-transgenen Parasiten

Die Überexpression der entsprechenden AspAT- und MDH- Proteine wurde, neben der Proteinebene (Abbildung 57) ebenfalls auf mRNA-Ebene überprüft. Die mRNA der Plasmodien-Extrakte von den co-transgenen 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W und 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W Plasmodien sowie der 3D7-CoMock Zelllinie wurde, wie unter 2.2.16 beschrieben, isoliert und in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.2.19). Die cDNAs wurden daraufhin als Templates in den quantitativen RT-PCRs (Abschnitt 2.2.20) eingesetzt und somit die Transkriptmengen der cDNA von AspAT und MDH bestimmt. Wie der Abbildung 58 zu entnehmen ist, konnte sowohl für die co-transgene Zelllinie 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W als auch für die 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W eine 4,1fach erhöhte Transkriptmenge der AspAT bestimmt werden. Die relative Transkriptmenge der MDH lag bei der co-transgenen 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W bei 1,64 und bei der 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W unwesentlich niedriger bei 1,56.

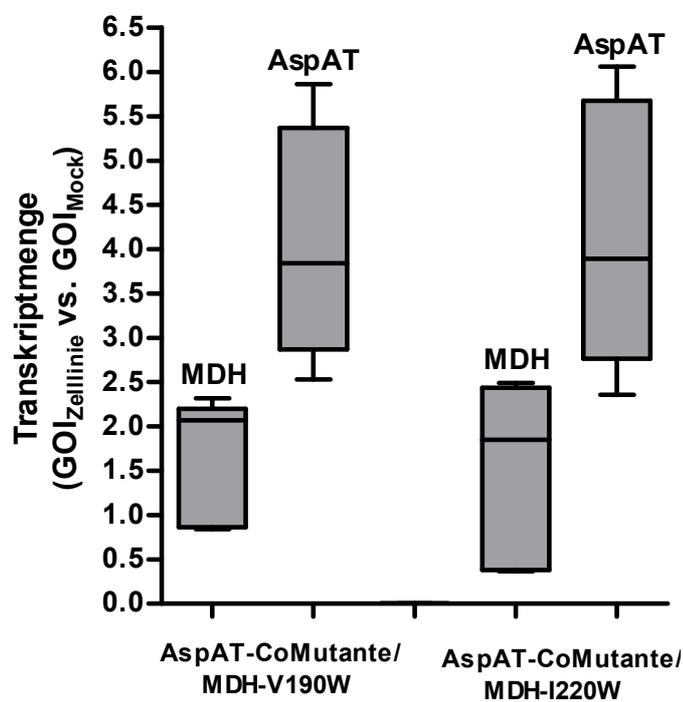
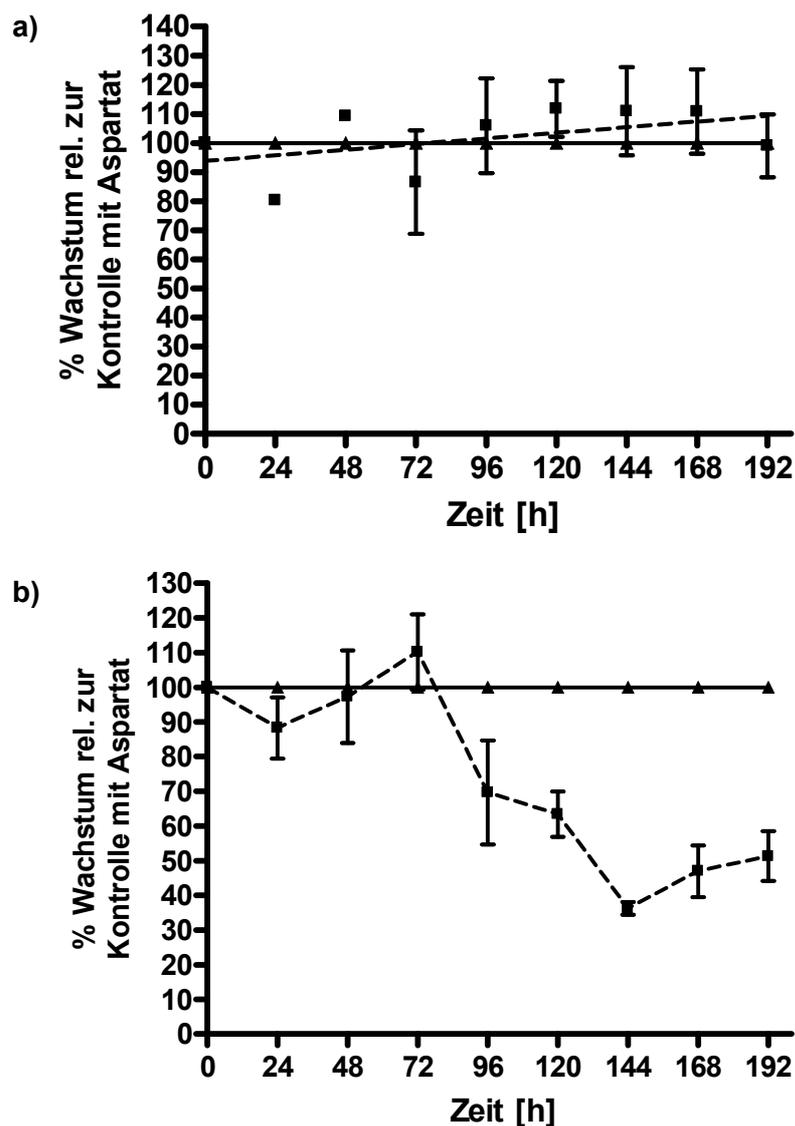


Abb. 58 Quantitative RT-PCRs für und 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W. Es ist die relative Transkriptmenge mit entsprechender Standardabweichung angegeben. 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W – MDH $1,64 \pm 0,32$; AspAT $4,1 \pm 0,59$; 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W – MDH $1,56 \pm 0,4$; AspAT $4,1 \pm 0,56$. $n \geq 5$.

3.2.3.3 Analyse der co-transgenen Parasiten unter Aspartatmangel

In Abbildung 59 ist jeweils das Wachstum der co-transgenen Zelllinien mit und ohne Aspartat im Kulturmedium verglichen worden. Für die 3D7-CoMock ließ sich kein Wachstumsunterschied im Medium mit bzw. ohne Aspartat feststellen (Abbildungen 59. a). Die co-transgene Zelllinie pARL-AspAT-CoMutante/MDH-I220W zeigt hingegen unter Aspartatmangel nach bereits 96 h ein deutlich schlechteres Wachstum im Vergleich zum Wachstum der gleichen Zelllinie mit Aspartat. Nach 192 h war, wie der Abbildungen 59. b zu entnehmen ist, nur noch ein Wachstum von 50 % zu verzeichnen. Die co-transgene Zelllinie pARL-AspAT-CoMutante/MDH-V190W wächst schon nach 72 h ohne Aspartat schlechter als die Kontrolle mit Aspartat und nach 192 h war kein Wachstum mehr zu detektieren (Abbildungen 59. c).



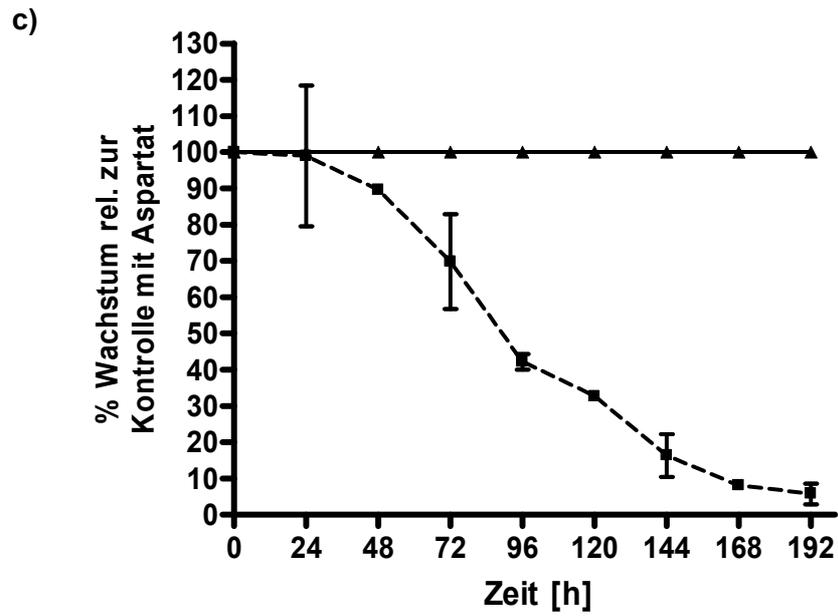


Abb. 59: Wachstum der co-transgenen Kulturen **a)** 3D7-CoMock, **b)** 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W und **c)** 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W ohne Aspartat (Quadrate) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (mit Aspartat-Dreiecke) gegen Zeit in h. Die unbehandelte Kontrolle wurde zu jedem Datenpunkt auf 100% normalisiert. Mittelwerte \pm SEM, $n=2$.

4. Diskussion

4.1 Vitamin B6 - Bedeutung der *de novo* Synthese für *P. falciparum*

Plasmodien sind während der Proliferation im humanen Erythrozyten einer Vielzahl von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxiden, Hydroxyl- und Superoxid- Anionen sowie Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), ausgesetzt. Diese werden einerseits durch das Immunsystem des Wirtes hervorgerufen und andererseits durch die hohe Stoffwechselrate während der erythrozytären Schizogonie und dem damit verbundenen massiven Abbau von Hämoglobin bedingt. Bei Plasmodien wurden verschiedenste Systeme zur Abwehr von oxidativem Stress beschrieben. Bekannte antioxidative Systeme sind das Glutathionsystem (Liebau *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2003b), das Thioredoxinsystem, welches Plasmoredoxin beinhaltet (Becker *et al.*, 2003a) sowie zwei Superoxiddismutasen (Kehr *et al.*, 2010). Des Weiteren sind die antioxidativen Vitamine C (Ascorbinsäure) und E (Tocopherol) in Plasmodien vorhanden, um das Redoxgleichgewicht zu gewährleisten (Stocker *et al.*, 2003). Alle bisher beschriebenen Systeme zur Bekämpfung von ROS in *P. falciparum*, detoxifizieren jedoch hauptsächlich H_2O_2 oder O_2^- . Wenn diese ROS allerdings nicht umgehend unschädlich gemacht werden, können sie unter anderem zu $^1\text{O}_2$ reagieren (Kellogg *et al.*, 1975; Khan und Kasha 1994).

Neben der weitreichenden Funktion als Co-Faktor stehen die antioxidativen Eigenschaften von Vitamin B6 im Fokus (Matxain *et al.*, 2006). Insbesondere wird dabei die Möglichkeit der Detoxifikation von $^1\text{O}_2$ diskutiert. Bei der Suche nach Resistenzmechanismen gegen oxidativen Stress wurde Pdx1 das erste Mal erwähnt und demzufolge zunächst als SOR1 (Singlet Oxygen Resistance 1) bezeichnet (Ehrenshaft *et al.*, 1998). Für andere Organismen, die ebenfalls eine *de novo* Biosynthese von PLP besitzen, konnte ein Zusammenhang der PLP-Synthese und $^1\text{O}_2$ bereits gezeigt werden (Bilski *et al.*, 2000; Denslow *et al.*, 2007; Havaux *et al.*, 2009).

Ob tatsächlich $^1\text{O}_2$ in *P. falciparum* vorkommt, konnte in dieser Arbeit analysiert werden. Dass Vorhandensein von endogenem $^1\text{O}_2$ in *P. falciparum* und die Produktion von $^1\text{O}_2$ während der asexuellen Vermehrung wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und des Farbstoffes APF visualisiert und gemessen. APF reagiert in Anwesenheit von DMSO, welches die Hydroxylradikale neutralisiert, ausschließlich mit $^1\text{O}_2$ (Price *et al.*, 2009). Während der erythrozytären Schizogonie durchläuft der Parasit verschiedene metabolische Situationen, die zu Unterschieden in der Produktion von $^1\text{O}_2$ führen können. Das Volumen des Parasiten wächst während der intraerythrozytären Phase um das bis zu 20fache bezüglich des invasiven Merozoiten (Lew *et al.*, 2003). Daher war eine Einteilung in die drei Hauptentwicklungsstadien von *P. falciparum*, Ringe, Trophozoiten und Schizonten, erforderlich. Um die Messung der $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen unter vergleichbaren Bedingungen zu ermöglichen, wurde eine neue Methode etabliert, bei der die Parasiten von einer asynchronen Kultur in drei Hauptgruppen eingeteilt wurden. Diese Klassifizierung nach Anzahl der Pixel, ermöglicht die Analyse von verschiedenen Stadien unter experimentell identischen Bedingungen, welches die Voraussetzung für die weiteren Analysen war. Hierfür wurde eine synchronisierte Kultur alle acht Stunden über einen Zeitraum von 48 h fotografiert und gemessen, was eine Unterteilung in die drei Stadien nur auf der Ebene der Pixelanzahl, welche für Ringe 200 bis 600 Pixel, 700 bis 1200 Pixel für Trophozoiten und 1400 bis 2500 Pixel für Schizonten sind, erlaubt. Um eine definierte Menge von $^1\text{O}_2$ zu erzeugen wurde eine definierte Konzentration von Cercosporin eingesetzt. Ein Molekül Cercosporin weist eine Quantenausbeute von 0,84-0,97 für die Herstellung von $^1\text{O}_2$ auf (Daub *et al.*, 2000), wodurch die Inkubation der Parasiten mit unterschiedlichen Cercosporin-Konzentrationen zu einer korrelierten $^1\text{O}_2$ -Produktion führt. Da sich aufgrund des erhöhten Volumens der späteren Stadien die induzierte Leuchtkraft unter gleichen Bedingungen unterschied, wurden drei unabhängige Kalibrierungskurven erstellt - eine für jedes Entwicklungsstadium (wie durch die Anzahl der Pixel klassifiziert). Mittels dieser Kalibrierungen konnten die endogenen Konzentrationen an Singulett Sauerstoff für Ringe 0,20 nM, für Trophozoiten 0,34 nM und für Schizonten 0,10 nM, berechnet werden. In Tabelle 12 sind die für die Berechnung der endogenen $^1\text{O}_2$ -Konzentration notwendigen Werte und Formeln der Regressionsgeraden zusammengefasst.

Tab. 12 Zusammenfassung der Ergebnisse zur $^1\text{O}_2$ -Bestimmung der Blutstadien von *Plasmodium falciparum*.

Blutstadien	Ring	Trophozoit	Schizont
Fluoreszenzintensität Mittelwert (AU)	2,23	5,02	2,76
Geradengleichung der Eichkurven	$f(x) = 9,99x$ $r^2 = 0,92$	$f(x) = 13,48x$ $r^2 = 0,85$	$f(x) = 24,93x$ $r^2 = 0,91$
entsprechende Cercosporin- Konzentration (nM)	0,22	0,37	0,11
kalkulierte $^1\text{O}_2$ Konzentration (nM)	0,18 – 0,21	0,31 – 0,36	0,09 – 0,11

Das Ergebnis zeigt deutlich, dass, obwohl die Fluoreszenzintensität beim Schizonten am höchsten erscheint, die meisten $^1\text{O}_2$ -Moleküle im Trophozoiten von *P. falciparum* erzeugt werden. Auch für andere reaktive Sauerstoffspezies konnte bereits gezeigt werden, dass die Konzentration im Trophozoiten-Stadium am höchsten ist (Fu *et al.*, 2010). In diesem Stadium verdaut der Parasit etwa 70% des Hämoglobins seines Wirtes. Der Abbau von Hämoglobin liefert fast alle Aminosäuren und verhindert eine vorzeitige Lyse des bereits stark permeabilisierten Erythrozyten (Lew *et al.*, 2003). Der Nachteil des Hämoglobinverdauens ist jedoch die Bildung einer großen Menge von Ferroprotoporphyrin IX (Häm), welches zu Ferriprotoporphyrin IX (Hämatin) oxidiert wird, mit der gleichzeitigen Herstellung eines Superoxid-Anion Restes (O_2^-). Dies wird zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Beide Moleküle reagieren miteinander unter der Bildung von $^1\text{O}_2$ (Kellogg und Fridovich 1975; Khan und Kasha 1994). Die Ergebnisse zeigen, dass $^1\text{O}_2$ in *P. falciparum* entsteht und im Trophozoiten-Stadium am meisten $^1\text{O}_2$ produziert wird, was wahrscheinlich auf den Verdau von Hämoglobin während dieser Entwicklungsphase zurückzuführen ist.

Da Plasmodien ebenfalls einen eigenen PLP-Synthase Komplex aus Pdx1- sowie Pdx2- Proteinen besitzen und während ihrer Entwicklung im Erythrozyten PLP produzieren (Knöckel *et al.*, 2012), war ein möglicher Zusammenhang der *de novo* PLP-Synthese und $^1\text{O}_2$ in Plasmodien zu analysieren. Bereits vorangegangene Arbeiten zeigen, dass die Synthese von PLP bei Plasmodien über oxidativen Stress reguliert wird (Wrenger *et al.*, 2005). Eine gezielte Produktion von $^1\text{O}_2$ wird durch Cercosporin ermöglicht (Daub *et al.*, 2000). Unter Verwendung von Cercosporin wurden $^1\text{O}_2$ Stress-abhängige Analysen der

Transkriptmengen von *pdx1* und *pdx2* durchgeführt, welche einen erhöhten mRNA-Gehalt der Gene zeigten. Des Weiteren wurden transgene *P. falciparum* Parasiten, durch Überexpression der Enzyme der PLP-Synthase, resistenter gegenüber $^1\text{O}_2$ (Knöckel *et al.*, 2012).

Durch HPLC-Analysen konnte ein erhöhter PLP-Spiegel von 36,6 μM in Pdx1/Pdx2-Überexprimierern im Vergleich zu Wildtyp Plasmodien mit 12,5 μM PLP in dieser Arbeit detektiert werden.

Ein ähnliches Resultat wurde bei Pflanzen mit einem Mangel an Vitamin B6 festgestellt, bei welchen eine erhöhte Sensitivität für oxidativen Stress, unter anderem durch $^1\text{O}_2$, detektiert wurde (Havaux *et al.*, 2009). Ein „knock-out“ des Pdx1-Enzyms in *M. tuberculosis* hat gezeigt, dass die Vitamin B6-Biosynthese essentiell für das Wachstum und die Virulenz der pathogenen Bakterien ist (Dick *et al.*, 2010). Da bisher kein „knock-out“ der Enzyme der PLP-Synthase bei *P. falciparum* erfolgreich war und die Methoden des „knock-downs“ mittels RNA-Interferenz bei Plasmodien nicht anwendbar sind, wurde in dieser Arbeit die Überexpression von dominant-negativen Mutanten gewählt. Durch inaktive Pdx1- und Pdx2- Proteine, welche an die nativen Proteine in der Zelle binden, wurde die PLP-Synthase *in vivo* herunterreguliert. In vorangegangenen Studien der plasmodialen PLP-Synthase wurden essentielle Aminosäuren identifiziert, welche die Komplexbildung nicht beeinträchtigen, jedoch die Synthese von PLP inaktivieren (Müller *et al.*, 2008).

Die generierten transgenen Zelllinien 3D7-Pdx1K83A, 3D7-Pdx2E53Y sowie co-transgene Zelllinie 3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y wurden zunächst mit 80 nM Cercosporin, die gleiche Konzentration die bei dem Pdx1/Pdx2 Überexprimierer eingesetzt wurde (Knöckel *et al.*, 2012), behandelt. Bei allen drei transgenen Parasitenkulturen wirkten 80 nM Cercosporin jedoch letal, weswegen mit 10 nM Cercosporin weiter gearbeitet wurde.

Die co-transgenen *P. falciparum* Parasiten sind durch Überexpression von inaktiven Pdx1- und Pdx2- Enzymen (3D7-Pdx1K83A/Pdx2E53Y) sensitiver gegenüber Cercosporin, hingegen hat die Überexpression einzelner inaktiver Mutanten keinen Effekt, da von diesen Zelllinien vermutlich noch ausreichend PLP gebildet werden kann.

Mittels des Farbstoffes APF, welcher durch $^1\text{O}_2$ zu Fluoreszein reagiert, konnte $^1\text{O}_2$ visualisiert werden. Nach einstündiger Behandlung der Parasiten-Kulturen mit Cercosporin, wiesen die Überexprimierer 3D7-Pdx1/Pdx2 im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie (3D7-CoMock) wesentlich weniger $^1\text{O}_2$ auf. Die Überexpression der mutierten Enzyme, führte jedoch zu einem erhöhten $^1\text{O}_2$ - Gehalt. Dass die

Überexpression der PLP-Synthase einem Schutz vor $^1\text{O}_2$ bewirkt und die mit pARL-Pdx1K83A/Pdx2E53Y co-transgenen Parasiten einem erhöhten $^1\text{O}_2$ -Spiegel ausgesetzt sind, konnte demzufolge durch APF bestätigt werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse deutlich, dass Vitamin B6 im Malariaerreger als Antioxidans gegen $^1\text{O}_2$ wirkt.

4.2 Die Bedeutung der PLP-abhängigen AspAT für *P. falciparum*

Vitamin B6 ist in Form von PLP als Co-Faktor an diversen Enzymreaktionen beteiligt. In *P. falciparum* finden sich PLP-abhängige Enzyme unter anderem im Folatmetabolismus, im Porphyrinmetabolismus, bei der Polyaminbiosynthese und bei der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern (Wilson *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 2001; Alfadhli *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2000 und Müller *et al.*, 2010). Außerdem ist PLP in nahezu alle Reaktionen des Aminosäurestoffwechsels involviert. In *P. falciparum* wurden bisher die Aminolävulinsäure Synthase (Wilson *et al.*, 1996), die Glycinhydroxymethyl Transferase (Alfadhli *et al.*, 2000) sowie die Aspartat Aminotransferase (Wrenger *et al.*, 2011; Berger *et al.*, 2001) identifiziert.

Für die PLP-abhängige AspAT sollte die Bedeutung und in dem Zusammenhang der „downstream“-Effekt von PLP im Parasiten analysiert werden. Die AspAT katalysiert die reversible Reaktion von Aspartat und α -Ketoglutarat zu Oxalacetat und Glutamat. Glutamat wird außerdem durch die Glutamat-Synthase aus Glutamin gebildet, jedoch können beide Aminosäuren auch aus dem Wirt akquiriert werden (Elford *et al.*, 1985). Glutamin sowie Glutamat stellen die Hauptkohlenstoffquelle der Plasmodien dar (Olszewski *et al.*, 2010). Aus dem gebildeten Glutamat kann durch die Glutamatdehydrogenase α -Ketoglutarat hergestellt werden, welches somit dem Citrat-Stoffwechsel zur Verfügung steht (Olszewski *et al.*, 2010). Das von der AspAT gebildete Oxalacetat wird außerdem von der MDH sowie der PEP-Carboxylase synthetisiert. Die MDH katalysiert die reversible Reaktion von Malat zu Oxalacetat. Das plasmodiale Genom kodiert im Gegensatz zu den meisten anderen Eukaryonten nur für eine MDH. Wie im Rahmen dieser Arbeit mittels eines MDH-GFP-Fusionsproteins in *P. falciparum* gezeigt wurde, befindet sich die plasmodiale MDH in allen Blutstadien der Parasiten, genau wie die AspAT (Wrenger *et al.*, 2011), im Zytosol. Demzufolge liegt die MDH bei Plasmodien nur als zytosolische Form vor und nicht, wie bei den meisten anderen Organismen, als Isoenzym im Mitochondrium und im

Zytosol, was mittels Immunfluoreszenzanalyse ebenfalls gezeigt wurde (Pradhan *et al.*, 2009). In Enzymtests mit dem rekombinanten MDH-WT Protein konnte für die Rückreaktion der MDH, die Reduktion von Oxalacetat, kein K_M -Wert bestimmt werden, da ab 0,2 mM eine Substratinibierung auftrat. Diese wurde auch schon von Pradhan und Kollegen (2009b) beschrieben. Für die Oxidation von Malat zu Oxalacetat wurde ein K_M -Wert von 0,54 mM bestimmt. Dass die Synthese von Oxalacetat aus Malat durch die MDH physiologisch relevant für die Parasiten ist, konnte durch einen „knock-out“ der PEP-Carboxylase, welcher lediglich unter einer externen Malatquelle möglich war, gezeigt werden (Bulusu *et al.*, 2011). Die MDH spielt demzufolge in Plasmodien durch Synthese bzw. Konkurrenz um Oxalacetat eng mit der AspAT zusammen.

Das ebenfalls von der AspAT gebildete Aspartat wird für die Synthese von Pyrimidinen sowie zur Rückgewinnung von Purinen benötigt. Zur Einführung in den Purinstoffwechsel muss Aspartat als Substrat für die Adenylosuccinat-Synthetase vorhanden sein (Mehrotra *et al.*, 2010; Raman *et al.*, 2004). Da Erythrozyten nur geringe Mengen an Pyrimidinen enthalten, sind Plasmodien gezwungen ihren Bedarf an Pyrimidinen vollständig durch eine *de novo* Synthese zu decken. Dafür muss Aspartat für die Aspartatcarbamoyl-Transferase zur Verfügung stehen, welche das Substrat N-Carbamoyl-L-Aspartat für die Produktion von Pyrimidinen generiert (Cassera *et al.*, 2011). Des Weiteren wird Aspartat zur Synthese von Asparagin sowie Glutamat und zur Proteinbiosynthese verwendet. In Abbildung 60 sind die Stoffwechselwege in die Aspartat involviert ist in einer Übersicht zusammenhängend dargestellt.

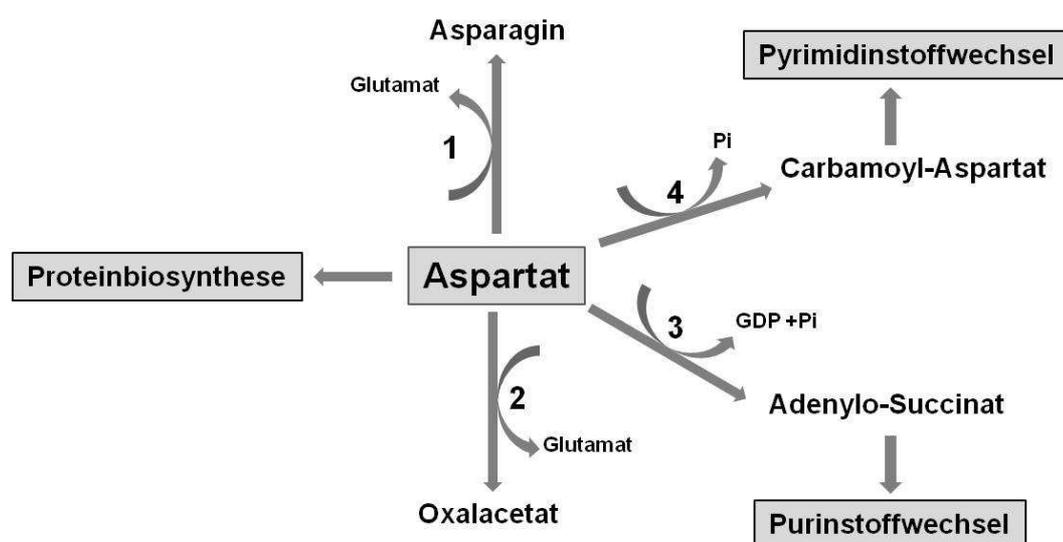


Abb. 60 Aspartatmetabolismus in Plasmodien. 1: Asparagin-Synthese, 2: Aspartat-Aminotransferase, 3: Adenylosuccinat-Synthase, 4: Aspartatcarbamoyl-Transferase.

Die bereits beschriebene spezifische Aktivität der plasmodialen AspAT für Aspartat als Substrat ist 2,7 U/ mg und der ermittelte K_M -Wert für Aspartat liegt bei 0,8 mM (Wrenger *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für Glutamat ein K_M -Wert von 0,46 mM und eine spezifische Aktivität von 7,51 U/ mg bestimmt werden. Durch den niedrigeren K_M -Wert für Glutamat hat die plasmodiale AspAT eine höhere Affinität zu diesem Substrat. Zusätzlich wurde in den Parasiten 6mal mehr Glutamat (11 mM) als Aspartat (1,7 mM) gemessen (Teng *et al.*, 2009), wodurch sich das Gleichgewicht der reversiblen Reaktion der AspAT in Richtung der Aspartatproduktion verschiebt.

Zur *in vivo* Analyse bezüglich der Bedeutung der AspAT wurde der AspAT-WT in Plasmodien überexprimiert, welches jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten hatte. Die Bedeutung der AspAT und das Zusammenspiel mit der MDH wurde im Folgenden mittels Überexpression dominant-negativer Mutanten in Plasmodien näher untersucht.

4.2.1 Dominant-negative Mutanten der AspAT und der MDH in *P. falciparum*

Mittels der Proteinstruktur der dimeren PfAspAT (PDB: 3K7Y) wurden die Aminosäuren R257 und Y68 ausgewählt, da diese im aktiven Zentrum mit PLP interagieren und somit möglicherweise für die Aktivität der AspAT wichtig sind. Nach Mutation der jeweiligen Aminosäure zu Alanin, wurden die Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und es konnte bestätigt werden, dass die Mutation jeweils in einer inaktiven AspAT resultierte. Anschließend wurde eine Doppelmutante generiert, in der sowohl R257 als auch Y68 zu Alanin mutiert vorlagen (AspAT-CoMutante). Das Heterodimer zwischen der AspAT-CoMutante und der Wildtyp-AspAT ist in Abbildung 61 schematisch veranschaulicht. R257A tritt mit dem aktiven Zentrum desselben Monomers in Wechselwirkung, wohingegen Y68A mit dem aktiven Zentrum des gebundenen Monomers interagiert.

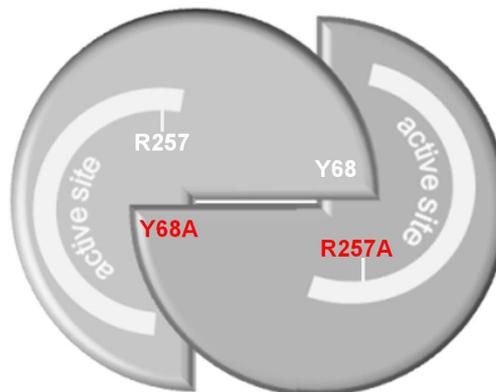


Abb. 61 Schema der Interaktionen der AspAT-CoMutante mit dem AspAT-WT. Das Monomer der AspAT-CoMutante ist rechts mit den rot hervorgehoben Mutationen dargestellt.

Durch FPLC- gefolgt von SLS- Analysen konnte gezeigt werden, dass der Austausch der beiden Aminosäuren gegen Alanin keinen Einfluss auf die Konformation des Proteins hat. Die AspAT-CoMutante liegt, wie die AspAT-WT, als Dimer vor und hat ebenso eine molekulare Masse von 94 kDa. Dass zwischen der AspAT-CoMutante und der AspAT-WT auch eine Dimerisierung möglich ist, sollte mittels Co-Aufreinigung überprüft werden. Dazu wurden beide Proteine rekombinant in *E. coli* hergestellt und die Überstände nach Aufschließen der Zellen gemischt. Im Western-Blot konnten jedoch nicht beide Proteine über ihre spezifischen Tags nachgewiesen werden und demnach war es nicht möglich sie übereinander aufzureinigen. Da die AspAT nur als Dimer aktiv ist, bilden sich zwischen den Monomeren sehr stabile Verbindungen aus, sodass nach Dimerisierung kaum noch eine Aufspaltung möglich ist. Um eine Dimerisierung zwischen dem Wildtyp- und AspAT-CoMutante- Monomer zu ermöglichen, wurden beide Proteine in *E. coli* co-exprimiert. Die anschließenden Co-Aufreinigungen wurden im Western-Blot mittels spezifischer Antikörper gegen die unterschiedlichen Tags überprüft und bestätigten die Bildung von Dimeren aus AspAT-CoMutante und AspAT-WT. Außerdem konnte im anschließenden Aktivitätstest mit den co-aufgereinigten Proteinen, AspAT-CoMutante und gebundenem AspAT-WT, eine Inaktivierung des AspAT-WTs gezeigt werden.

Für die plasmodiale MDH wurden anhand der Kristallstruktur ebenfalls Mutationen zur möglichen Inaktivierung des Enzyms ausgewählt. Die Aminosäuren V190 und I220 wurden jeweils zu Tryptophan mutiert, welches durch die stark hydrophoben Eigenschaften das aktive Zentrum der MDH negativ beeinflussen könnte. Außerdem wurde das Glutamat an Position 18 zu einem Glutamin mutiert, wodurch eine Aminosäure mit einer negativ geladenen Seitenkette gegen eine Aminosäure ohne Ladung der Seitenkette ausgetauscht wurde.

Die mutierten MDH-Proteine wurden anschließend rekombinant in *E. coli* exprimiert und die spezifischen Aktivitäten bestimmt. Für die MDH-WT konnten die spezifischen Aktivitäten von 0,9 U/ mg für Malat und von 25,2 U/ mg für Oxalacetat bestimmt werden. Diese Werte weichen stark von den bereits publizierten Werten von Tripathi *et al.*, 2004 ab, jedoch haben Pradhan und Kollegen (2009b) eine spezifische Aktivität der MDH für Oxalacetat von 3,9 U/ mg bestimmt. Die rekombinanten Proteine MDH-I220W und MDH-V190W waren sowohl bei der Malatoxidation (Hinreaktion) als auch der Reduktion von Oxalacetat (Rückreaktion) nicht aktiv. Die Mutation an Position 18 zu Glutamin (MDH-E18Q) hatte wider Erwarten eine hyperaktive Variante der MDH zur Folge. Die MDH-E18Q ist in der Hinreaktion 6fach aktiver und in der Rückreaktion 15fach aktiver als die MDH-WT. Solch ein Effekt einer Punktmutation auf die Enzymaktivität wurde auch für andere Proteine beschrieben (Bell *et al.*, 2001; Wedel *et al.*, 1997). Wie dieser Effekt bei der MDH zustande kommt, könnte durch zukünftige Kristallisationsstudien mit der MDH-E18Q geklärt werden. Die inaktiven MDH-Mutanten MDH-V190W und MDH-I220W sollten in den folgenden *in vivo*-Experimenten die Wildtyp-MDH binden und inaktivieren können. Um die Bindung zwischen dem Wildtyp und der jeweiligen Mutante zu überprüfen, wurden beide Proteine co-aufgereinigt und die Eluate anschließend im Western-Blot analysiert. Mittels Antikörper gegen die unterschiedlichen Tags konnte gezeigt werden, dass beide Proteine erfolgreich übereinander aufgereinigt wurden und somit untereinander Bindungen ausbilden konnten. Außerdem war der MDH-WT nach der Co-Aufreinigung über die jeweilige Mutante nicht mehr aktiv, was eine Inaktivierung des WT durch beide Mutanten bestätigte.

Für die verschiedenen dominant-negativen Mutanten wurden nach *in vitro* Charakterisierung, Überexpressionskonstrukte für *in vivo* Studien in *P. falciparum* generiert. Nach erfolgreicher Transfektion der Parasiten, wurde die Expression des jeweiligen Proteins im Western-Blot bestätigt.

Der Vergleich des Wachstums der verschiedenen transgenen 3D7-MDH Überexprimierer zeigte unter normalen Kulturbedingungen keinen signifikanten Unterschied. Das bedeutet, dass die Überexpression keiner der MDH-Mutanten bzw. des MDH-WT einen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten unter Standardkulturbedingungen hat.

Für die Funktion von Malat wird postuliert, dass es als Elektronendonator für die Atmungskette bei schlechteren Wachstumsbedingungen fungieren könnte (Wrenger *et al.*, 2012). Andererseits wurde beschrieben, dass es sowohl im Zytosol, als auch im Citrat-Stoffwechsel im Mitochondrium, von wo aus es über den Malat/Ketoglutarat-Transporter ebenfalls in das Zytosol der Zelle gelangt, als „Abfallprodukt“ überbleibt und ausgeschieden wird (Olszewski *et al.*, 2010). Demzufolge wurde analysiert, ob die Zugabe von Malat in das Kulturmedium einen Effekt bezüglich des Wachstums der verschiedenen transgenen Parasiten hervorruft. Bis zu einer Konzentration von 7,5 mM Malat im Kulturmedium sank die Viabilität der Parasiten lediglich auf 90%, was aber unabhängig des transgenen Konstruktes bei allen 3D7-MDH Überexprimierern und auch bei 3D7-Mock-BSD gleich war. Wenn die Produktion von Malat über die MDH für die Parasiten von Bedeutung wäre, hätte zumindest bei den inaktiven MDH-Mutanten ein verbessertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle ohne Malat auftreten müssen. Diese hatten trotz inaktiver MDH Malat zur Verfügung und hätten somit besser wachsen müssen als ohne Malat. Da es jedoch nur ein „knock-down“ der MDH ist, könnte auch die Restaktivität der nativen MDH ausreichen, um den Bedarf an Malat zu decken, wodurch der gleichbleibende Phänotyp der Mutantenzelllinien zu erklären wäre. Falls Malat jedoch primär als „Abfallprodukt“ im Stoffwechsel der Plasmiden entstehen würde (Olszewski *et al.*, 2010), wäre ein negativer Effekt sowohl für die hyperaktive MDH (MDH-E18Q) als auch für die MDH-WT zu erwarten gewesen. Es ist davon auszugehen, dass diese Zelllinien verstärkt Malat bilden. Da in Plasmodien eine Malat-Konzentration von 1,6 mM bestimmt wurde (Teng *et al.*, 2009), ist es unwahrscheinlich, dass bei einem osmotischen Gefälle durch 7,5 mM Malat im Medium der Export von Malat gegen diesen beträchtlichen Konzentrationsgradienten ablaufen könnte.

Das Wachstum der transgenen 3D7-AspAT-CoMutante zeigte im Vergleich zur 3D7-AspAT-WT und 3D7-Mock-Zelllinie unter normalen Kulturbedingungen keinen Unterschied. Durch die Überexpression der AspAT-WT wurde für die Zelllinie eine erhöhte AspAT-Aktivität erwartet und die Überexpression der

AspAT-CoMutante sollte eine niedrigere AspAT-Aktivität in den Parasiten bewirken. Jedoch war weder bei der Überexpression des AspAT-WT noch der AspAT-CoMutante ein Einfluss auf das Wachstum der Parasiten unter Standardbedingungen zu beobachten. Die dominant-negative Überexpression der Mutante gewährleistet jedoch kein 100%iges Ausschalten der nativen AspAT und die Restaktivität reicht somit eventuell für die Plasmodien aus.

Um eine Vorstellung von der Überexpression der AspAT in den transgenen Parasiten bekommen zu können, wurden die relativen Transkriptmengen der mRNA im Vergleich zur 3D7-Mock Zelllinie mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Für die transgenen 3D7-AspAT-WT Plasmodien konnte eine 11fach und für die 3D7-AspAT-CoMutante Parasiten eine 13fache erhöhte Transkriptmenge der AspAT gegenüber der 3D7-Mock-Zelllinie detektiert werden. Diese Werte liegen im Rahmen anderer publizierter Transkriptmengen für die rekombinante Überexpression in Plasmodien (Deshmukh *et al.*, 2012). Demnach ist davon auszugehen, dass in den Überexprimierern wesentlich mehr von der rekombinanten als von der endogenen AspAT vorkommt.

Der Effekt der Überexpression der dominant-negativen AspAT-CoMutante zeigte sich bei der Kultivierung der transgenen Plasmodien in einem RPMI-Medium ohne Aspartat. Für die 3D7-Mock und auch die 3D7-AspAT-WT Zelllinien hat die Kultivierung ohne Aspartat wiederum keine Auswirkungen, jedoch wuchsen die 3D7-AspAT-CoMutante Plasmodien wesentlich schlechter, sodass nach 144 h nur noch ein Wachstum, im Vergleich zur unbehandelten 3D7-AspAT-CoMutante mit Aspartat im Medium, von unter 50% zu detektieren war. Wie das Modell in Abbildung 62. a zeigt, können die Parasiten auch unter dem Einfluss der dominant-negativen AspAT-CoMutante im Vollmedium normal wachsen. Wenn dem Medium jedoch kein Aspartat zugesetzt wird, zeigt sich der durch die AspAT-CoMutante verursachte Nachteil für die Parasiten - denn diese können nicht genügend Aspartat herstellen, um den hohen Bedarf zu decken (Abbildung 62. b).

Anschließend wurden dominant-negativen Mutanten sowohl der AspAT als auch der MDH zusammen in 3D7 co-überexprimiert. Die Expression beider Proteine konnte im Western-Blot auf Proteinebene bestätigt werden. Der Einfluss der dominant-negativen Mutanten auf das Wachstum der co-transgenen Zelllinien wurde im Vergleich zu der 3D7-CoMock Kultur zunächst im Standard-Kulturmedium mit Aspartat analysiert. Dafür wurden die Steigungen der Regressionsgeraden der Wachstumskurven ermittelt und in Bezug gesetzt.

Dabei wurde die Steigung der Geraden für die 3D7-CoMock Zelllinie als 100 % angesehen und für die co-transgenen 3D7-Überexprimierer somit ein Wachstum von 79 % für 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W und 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W von 74 % kalkuliert. Demnach hat die zusätzliche Expression der dominant-negativen MDH-I220W bzw. MDH-V190W Proteine schon im Vollmedium negative Auswirkungen für die Parasiten, was im Modell unter 62. c dargestellt ist. Die Inaktivierung beider Enzyme führt eventuell zu einer Versäuerung durch Anhäufung von Oxalacetat in den Parasiten, da weder von der MDH noch von der AspAT, das von der PEP-Carboxylase gebildete Oxalacetat, verbraucht werden kann. Der Einsatz von radioaktiv markiertem Aspartat führte weder zu einer Markierung von PEP noch von Laktat bzw. Pyruvat (Olszewski *et al.*, 2011) und demzufolge katalysiert die PEP-Carboxylase möglicherweise keine reversible Reaktion von Oxalacetat zu PEP. Ebenso wäre es möglich, dass auch im Vollmedium die Aufnahme von Aspartat für die Plasmodien limitiert ist, was erst bei den co-transgenen Parasiten durch die zusätzlich herunterregulierte MDH deutlich wird. Die MDH könnte nicht ausreichend Oxalacetat liefern, welches dann bei der Aspartat-Synthese durch die Restaktivität der AspAT fehlt und bei alleiniger Überexpression der dominant-negativen AspAT noch zur Verfügung stand.

Unter Standard-Kulturbedingungen führte die alleinige Überexpression der AspAT-CoMutante zu keinem Wachstumsunterschied (Abbildung 62. b) trotz der deutlich erhöhten Transkriptmengen der AspAT-CoMutante in der einfach transgenen Zelllinie. In den co-transgenen Zelllinien konnte jeweils nur eine gering erhöhte Transkriptmenge sowohl der AspAT als auch der MDH im Vergleich zur 3D7-CoMock gemessen werden. Es könnte sein, dass nur Parasiten mit einer gering erhöhten mRNA-Menge der dominant-negativen Mutanten überleben können und demnach auf diese Parasiten selektioniert wurde. Für genauere Aussagen, müssten die Proteinmengen der dominant-negativen Mutanten in den Parasiten quantifiziert werden, da die Transkriptmenge nicht proportional zu dem tatsächlich translatierten Protein ist.

Zum besseren Verständnis der Rolle von Aspartat wurde das Wachstumsverhalten der co-transgenen Zelllinien auch ohne Aspartat im Kulturmedium eruiert. Für die co-transgenen Zelllinien 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-I220W und 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W zeigte sich bei der Kultivierung in Aspartat-freiem Medium ein deutlich negativer Wachstumseffekt. Am stärksten zeigte sich der Wachstumsunterschied bei der

3D7-AspAT-CoMutante/MDH-V190W Zelllinie, die bereits nach 48 h ein deutlich schlechteres Wachstum im Vergleich zum Wachstum in Aspartat-haltigem Medium aufwies. Die Kultivierung ohne Aspartat war für diese co-transgene Zelllinie letal und nach 168 h konnte kein Wachstum mehr detektiert werden. Das Modell veranschaulicht unter Abbildung 62. d die Auswirkungen des Aspartatmangels für die co-transgenen Parasiten, welche wesentlich stärker sind, als wenn nur die AspAT durch die AspAT-CoMutante herunterreguliert wird (Abbildung 62. b).

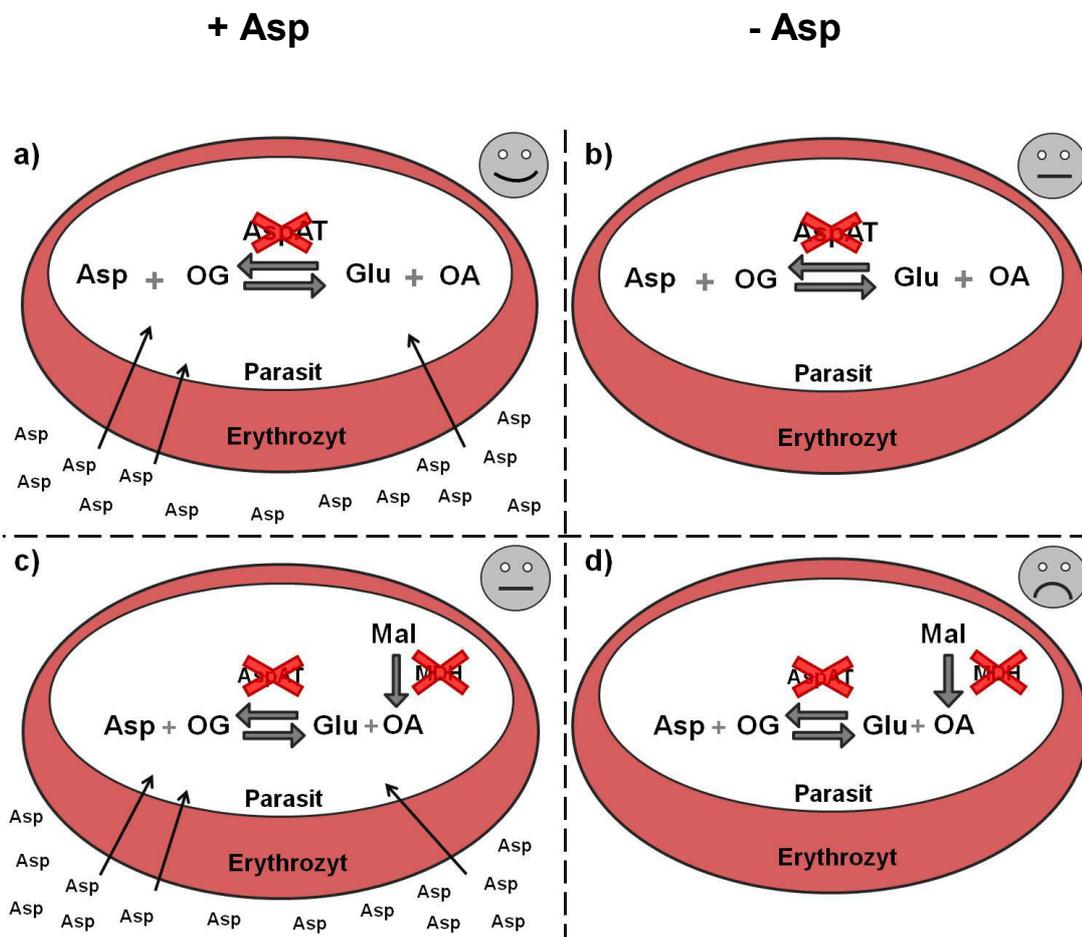


Abb. 62 Darstellung der Auswirkungen der dominant-negativen Mutanten in *P.falciparum* mit und ohne Aspartat im Kulturmedium. **a)** und **b)** 3D7-AspAT-CoMutante **a)** mit Aspartat - kein Wachstumsnachteil; **b)** ohne Aspartat - Wachstumsnachteil. **c)** und **d)** 3D7-AspAT-CoMutante/MDH-Mutante **c)** mit Aspartat - Wachstumsnachteil; **d)** ohne Aspartat - starker Wachstumsnachteil. Asp: Aspartat, OG: α -Ketoglutarat, Glu: Glutamat, OA: Oxalacetat, Mal: Malat.

Sofern die AspAT-Aktivität durch eine dominant-negative Überexpression einer inaktiven AspAT herunterreguliert wird, können die Parasiten nur mit externer Aspartatquelle im Medium optimal wachsen. Die Parasiten sind somit in der Lage aus dem Plasma, welches die Wirtszelle umgibt, Aspartat zu akquirieren. Demnach ist das im Hämoglobin vorkommende Aspartat nicht ausreichend, um den Bedarf der Plasmodien zu decken oder für den Parasiten nicht zugänglich. Aspartat kann von dem Parasiten, wie auch viele andere Aminosäuren und Substanzen, über den „New Permeability Pathway“ (NPP) aufgenommen werden (Baumeister *et al.*, 2010). Diese Transportwege permeabilisieren die Plasmamembran der Wirtszelle und dienen den Plasmodien zur Aufnahme von essentiellen Nährstoffen aus dem umgebenden Plasma. Neben dem Influx von Substraten dienen die NPPs auch dem Export von Substanzen (Kirk *et al.*, 1999).

Inwieweit die Aspartat-Konzentration im Wirts-Plasma für die bereits beschriebenen weitreichenden Funktionen der Aminosäure im Parasiten ausreichen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. In der hier angewandten *in vitro*-Kulturführung wurden 20 mg/l Aspartat eingesetzt, da dies die im RPMI 1640 Medium enthaltene Menge an Aspartat ist. Das den infizierten Erythrozyten umgebende Plasma enthält hingegen durchschnittlich nur 2,8 mg/l Aspartat (Psychogios *et al.*, 2011) und somit nur 14 % der in der *in vitro* Kultur eingesetzten Menge. Wahrscheinlich reichen die Aspartat-Konzentrationen des Wirtes für den Parasiten nicht aus, sodass die AspAT unter *in vivo* Bedingungen im Menschen für den Parasiten essentiell ist, da das Enzym als einziges Aspartat liefern kann.

Aufgrund der schnellen Generationszeit von 48 h und die gleichzeitige starke Vervielfältigung der Parasiten werden große Mengen an Pyrimidinen und Purinen gebraucht, für deren Synthese bzw. Wiedergewinnung sehr viel Aspartat notwendig ist. Somit reicht die durch den Wirt zur Verfügung stehende Aspartatmenge offensichtlich nicht aus, um den hohen Bedarf der Parasiten zu decken. Dies macht die weitreichenden Auswirkungen einer Inaktivierung der AspAT für die Plasmodien deutlich. Die Strukturen der AspATs verschiedener Organismen weisen hohe Homologien auf, wonach es nicht so einfach möglich wäre die plasmodiale AspAT spezifisch zu inhibieren ohne den Wirt zu schaden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die plasmodiale AspAT einen N-Terminus besitzt, welcher eine Rolle bei der Aktivität der plasmodialen AspAT spielt und die AspAT durch ein Peptid, welches aus den Aminosäuren des N-

Terminus der AspAT besteht, inaktiviert werden kann ohne die humane AspAT zu beeinflussen (Wrenger *et al.*, 2011).

Außerdem würde auch die Inhibierung der PLP-Synthese zu einer Inaktivierung der PLP-abhängigen AspAT führen, da dadurch der Co-Faktor für die AspAT nicht mehr zur Verfügung stehen würde und somit die Synthese von Aspartat ebenfalls blockiert wäre. Dies verdeutlicht die umfangreichen sowie weitreichenden „downstream“-Effekte von PLP für die Parasiten, da PLP sowohl in der Funktion als Co-Faktor unabdingbar ist und gleichzeitig durch die Wirkung als Antioxidans gegen $^1\text{O}_2$ eine wichtige Funktion übernimmt. Demnach wäre die PLP-Synthase ein vielversprechender neuer Angriffspunkt gegen den Malariaerreger.

5. Zusammenfassung

Für Vitamin B6 konnte in Pilzen und Pflanzen eine antioxidative Wirkung, insbesondere gegen $^1\text{O}_2$ gezeigt werden. Diese Organismen besitzen, genau wie *P. falciparum*, eine *de novo* Synthese für die aktive Form von Vitamin B6, das Pyridoxal-5-Phosphat (PLP). Um zu analysieren ob und in welchem Maße Plasmodien während der erythrozytären Entwicklung $^1\text{O}_2$ ausgesetzt sind, wurden mittels des Farbstoffes 3-(p-Aminophenyl) Fluoreszein (APF) und dem Photosensitizer Cercosporin, die $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen in den einzelnen Stadien bestimmt. Während des Trophozoiten-Stadiums entsteht innerhalb der Parasiten am meisten $^1\text{O}_2$ (0,3 nM), was durch die hohe metabolische Aktivität und dem damit verbundenen Hämoglobinabbau während dieser Phase erklärt werden kann. Die Studie stellt demnach eine neue Methode zur Quantifizierung von $^1\text{O}_2$ innerhalb des Malariaparasiten *P. falciparum* dar und etabliert die Einteilung der Parasiten durch ihre Pixelanzahl in die erythrozytären Stadien. Gleichzeitig konnte $^1\text{O}_2$ mittels Fluoreszenzmikroskopie in den verschiedenen Stadien visualisiert werden.

Der Zusammenhang zwischen PLP und $^1\text{O}_2$ bei *P. falciparum* wurde durch Überexpression dominant-negativer Mutanten der PLP-Synthase in den Parasiten untersucht. Mittels Wachstumskurven konnte gezeigt werden, dass die Überexprimierer der inaktiven PLP-Synthase wesentlich sensitiver gegenüber Cercosporin-induziertem $^1\text{O}_2$ waren. Bei den Überexprimierern der inaktiven PLP-Synthase konnte außerdem eine erhöhte $^1\text{O}_2$ -Konzentration im Vergleich zur Kontrollzelllinie gemessen werden. Andersrum war bei dem Überexprimierer des aktiven PLP-Synthase Komplexes ein geringerer $^1\text{O}_2$ -Gehalt zu detektieren. Demnach ist die *de novo* PLP-Synthase bei *P. falciparum*, während der Entwicklung im Erythrozyten, entscheidend für die Entgiftung von $^1\text{O}_2$.

Außerdem wurde die eigentliche Funktion von PLP als Co-Faktor im Zusammenhang mit der PLP-abhängigen Aspartat Aminotransferase (AspAT) in *P. falciparum* analysiert. Es wurde eine doppelt mutierte AspAT (AspAT-CoMutante) generiert, welche inaktiv ist, die Wildtyp-AspAT jedoch binden und dadurch hemmen kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der dominant-negativen Mutante in Plasmodien im Vollmedium keinen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten hat. Jedoch führte die Kultivierung der transgenen Parasiten in Aspartat-freiem Medium zu einem Wachstumsdefizit gegenüber der

unbehandelten Zelllinie. Um diesen Effekt zu verstärken wurde der Einfluss der Malatdehydrogenase (MDH) untersucht. Dieses Enzym, welches mittels GFP-Fusionskonstrukt ebenfalls im Zytosol der Parasiten lokalisiert wurde, verwendet, genau wie die AspAT, Oxalacetat als Substrat. Inaktive MDH-Mutanten, welche die Wildtyp-MDH abfangen und inaktivieren, wurden generiert und zusammen mit der AspAT-CoMutante in *P. falciparum* überexprimiert. Bei diesen Zelllinien zeigte sich schon im Vollmedium ein Wachstumsnachteil gegenüber der Kontroll-Zelllinie, welcher sich in Aspartat-freiem Medium noch stärker ausprägte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das im Wirts-Hämoglobin gebundene Aspartat für die Parasiten nicht ausreicht bzw. dem Parasiten nicht zur Verfügung steht. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass Plasmodien Aspartat aus dem Medium aufnehmen können. Im menschlichen Wirt steht den Parasiten jedoch wesentlich weniger Aspartat über das Blutplasma zur Verfügung, wodurch der hohe Bedarf an der Aminosäure für die Synthese der Pyrimidine sowie die Purin- Rückgewinnung wahrscheinlich nicht gedeckt werden kann. Dieser hohe Bedarf an Aspartat für die Plasmodien rückt die AspAT, als einziges Aspartat-produzierendes Enzym der Parasiten, in den Fokus neuer potenzieller Angriffspunkte. Außerdem verstärkt es die Wichtigkeit von PLP in den Parasiten, da die PLP-abhängige AspAT und die damit verbundene Aspartat-Produktion, welche entscheidend für das Überleben der Parasiten ist, die weitreichenden Auswirkungen einer inhibierten PLP-Synthese aufzeigen.

6. Literaturverzeichnis

Alfadhli S und Rathod PK. (2000) „Gene organization of a *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase and its functional expression in *Escherichia coli*.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 110(2): 283-291.

Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. (2012) „Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*.“ *Mediterr J Hematol Infect Dis.*, 4(1): e2012013

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(4): 2704-2711.

Baumeister S, Winterberg M, Przyborski JM, Lingelbach K. (2010) „The malaria parasite *Plasmodium falciparum*: cell biological peculiarities and nutritional consequences.“ *Protoplasma.*, 240(1-4): 3-12.

Baunaure F, Eldin P, Cathiard AM, Vial H. (2004) „Characterization of a non-mitochondrial type I phosphatidylserine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*.“ *Mol Microbiol.*, 51(1): 33-46.

Becker K, Kanzok SM, Iozef R, Fischer M, Schirmer RH, Rahlfs S. (2003a) „Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites.“ *Eur J Biochem.*, 270(6): 1057-1064.

Becker K, Rahlfs S, Nickel C, Schirmer RH. (2003b) „Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*.“ *Biol Chem.*, 384(4): 551-566.

Bell M, Capone R, Pashtan I, Levitzki A, Engelberg D. (2001) „Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 that are independent of MAPK kinase activation.“ *J Biol Chem.*, 276(27): 25351-25358.

Bender, DA. (2003) *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*. Cambridge University Press.

Berger LC, Wilson J, Wood P, Berger BJ. (2001) „Methionine regeneration and aspartate aminotransferase in parasitic protozoa.“ *J Bacteriol.*, 183(15): 4421-4434.

Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF. (2000) „Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants.“ *Photochem Photobiol.*, 71(2): 129-134.

Bjørk A, Mantzilas D, Sirevåg R, Eijsink VG. (2003) „Electrostatic interactions across the dimer-dimer interface contribute to the pH-dependent stability of a tetrameric malate dehydrogenase.“ *FEBS Lett.*, 553(3): 423-426.

Björkman A und Phillips-Howard PA. (1990) „The epidemiology of drug-resistant malaria.“ *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 84(2): 177-180.

Board, Institute of Medicine. Food and Nutrition. (1998) *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington, DC: National Academy Press.

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.*, 7;72: 248-254.

Bulusu V, Jayaraman V, Balaram H. (2011) „Metabolic fate of fumarate, a side product of the purine salvage pathway in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*.“ *J Biol Chem.*, 286(11): 9236-9245.

Cassera MB, Zhang Y, Hazleton KZ, Schramm VL. (2011) „Purine and pyrimidine pathways as targets in *Plasmodium falciparum*.“ *Curr Top Med Chem.*, 11(16): 2103-2115.

Christen P und Jaussi R. (2004) *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. Springer-Verlag.

Clos J und Brandau S. (1994) "pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif.*, 5(2):133-137.

Combs, GF. Jr. (2008) *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Elsevier.

Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Maier AG, Cowman AF. (2004) „Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.“ *Methods Mol Biol.*, 270: 263-276.

Daub ME und Ehrenshaft M. (2000) „THE PHOTOACTIVATED CERCOSPORA TOXIN CERCOSPORIN: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology.“ *Annu Rev Phytopathol.*, 38: 461-490.

Daub ME und Hangarter RP. (1983) „Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin.“ *Plant Physiol.*, 73(3): 855-857.

Daub ME, Li M, Bilski P, Chignell CF. (2000) „Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in *Cercospora*.“ *Photochem Photobiol.*, 71(2): 135-140.

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

Denslow SA, Rueschhoff EE, Daub ME. (2007) „Regulation of the *Arabidopsis thaliana* vitamin B6 biosynthesis genes by abiotic stress.“ *Plant Physiol Biochem.*, 45(2): 152-161.

Derrer B, Windeisen V, Guédez Rodríguez G, Seidler J, Gengenbacher M, Lehmann WD, Rippe K, Sinning I, Tews I, Kappes B. (2010) „Defining the structural requirements for ribose 5-phosphate-binding and intersubunit cross-talk of the malarial pyridoxal 5-phosphate synthase.“ *FEBS Lett.*, 584(19): 4169-4174.

Deshmukh AS, Srivastava S, Herrmann S, Gupta A, Mitra P, Gilberger TW, Dhar SK. (2012) „The role of N-terminus of *Plasmodium falciparum* ORC1 in telomeric localization and var gene silencing.“ *Nucleic Acids Res.*, 40(12): 5313-5331.

di Salvo ML, Safo MK, Contestabile R. (2012) „Biomedical aspects of pyridoxal 5'-phosphate availability.“ *Front Biosci (Elite Ed.)*, 1;4: 897-913.

Dick T, Manjunatha U, Kappes B, Gengenbacher M. (2010) „Vitamin B6 biosynthesis is essential for survival and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*.“ *Mol Microbiol.*, 78(4): 980-988.

Dive D, Gratepanche S, Yera H, Bécuwe P, Daher W, Delplace P, Odberg-Ferragut C, Capron M, Khalife J. (2003) „Superoxide dismutase in *Plasmodium*: a current survey.“ *Redox Rep.*, 8(5): 265-267.

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(1): 59-64.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D und White NJ. (2009) „Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria.“ *N Engl J Med.*, 361(5): 455-467.

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(4): 745-752.

Ehrenshaft M, Chung KR, Jenns AE, Daub ME. (1999) „Functional characterization of SOR1, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotianae*.“ *Curr Genet.*, 34(6): 478-485.

Ehrenshaft 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(4): 603-609.

Ehrlich, P. und Guttman, P. (1891) „Ueber die Wirkung des Methylenblau bei Malaria.“ *Berliner klinische Wochenschrift*; 953-956.

Elford BC, Haynes JD, Chulay JD, Wilson RJ. (1985) „Selective stage-specific changes in the permeability to small hydrophilic solutes of human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 16(1): 43-60.

Ellis KE, Clough B, Saldanha JW, Wilson RJ. (2001) „Nifs and Sufs in malaria.“ *Mol Microbiol.*, 41(5): 973-981.

Foth BJ, Stimmler LM, Handman E, Crabb BS, Hodder AN, McFadden GI. (2005) „The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast.“ *Mol. Microbiol.*, 55(1): 39-53.

Freibichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, Weinberger P, Linert W, Varešlija D, Tipton KF, Della Corte L. (2011) „Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions.“ *Cell Mol Life Sci.*, 68(12): 2067-2079.

Fu Y, Tilley L, Kenny S, Klonis N. (2010) „Dual labeling with a far red probe permits analysis of growth and oxidative stress in *P. falciparum*-infected erythrocytes.“ *Cytometry A.*, 77(3): 253-263.

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

Gengenbacher M, Fitzpatrick TB, Raschle T, Flicker K, Sinning I, Müller S, Macheroux P, Tews I, Kappes B. (2006) „Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights.“ *J Biol Chem.*, 281(6): 3633-3641.

Gesundheitsschutz, Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung (2008) *Malaria-Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit.*

Gropper SS und Smith JL. (2012) *Advanced Nutrition and Human Metabolism.* Wadsworth Inc Fulfillment.

Guédez G, Hipp K, Windeisen V, Derrer B, Gengenbacher M, Böttcher B, Sinning I, Kappes B, Tews I. (2012) „Assembly of the eukaryotic PLP-synthase complex from *Plasmodium* and activation of the Pdx1 enzyme.“ *Structure.*, 20(1): 172-184.

Havaux M, Ksas B, Szewczyk A, Rumeau D, Franck F, Caffarri S, Triantaphylidès C. (2009) „Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress.“ *BMC Plant Biol.*, 10;9.

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. (1989) „Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.“ *Gene.*, 51-59.

Horton HR, Laurence A, Moran K, Gray Scrimgeour, J. David Rawn, Perry MD. (2008) *Biochemie.* Pearson-Verlag.

Jain R, Jordanova R, Müller IB, Wrenger C, Groves MR. (2010) „Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the aspartate aminotransferase of *Plasmodium falciparum*.“ *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, 1;66: 409-412.

Jensen M und Mehlhorn H. (2009) „Seventy-five years of Resochin in the fight against malaria.“ *Parasitol Res.*, 105(3): 609-627.

Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM. (2010) *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme-Verlag.

Kehr S, Sturm N, Rahlfs S, Przyborski JM, Becker K. (2010) „Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites.“ *PLoS Pathog.*, 6(12): e1001242.

Kellogg EW 3rd und Fridovich I. (1975) „Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system.“ *J Biol Chem.*, 250(22): 8812-8817.

Khan AU und Kasha M. (1994) „Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction.“ *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91(26): 12365-12367.

Kirk K, Staines HM, Martin RE, Saliba KJ. (1999) „Transport properties of the host cell membrane.“ *Novartis Found Symp.*, 226: 66-73.

Knöckel J, Müller IB, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. (2007) „The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate de novo.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 152(1): 108-111.

Knöckel J, Müller IB, Butzloff S, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. (2012) „The antioxidative effect of de novo generated vitamin B6 in *Plasmodium falciparum* validated by protein interference.“ *Biochem J.*, 443(2): 397-405.

Kondo H, Nakamura Y, Dong YX, Nikawa J, Sueda S. (2004) „Pyridoxine biosynthesis in yeast: participation of ribose 5-phosphate ketol-isomerase.“ *Biochem J.*, 1;379: 65-70.

Lang-Unnasch, N. (1992) „Purification and properties of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 50(1): 17-26.

Lew VL, Tiffert T, Ginsburg H. (2003) „Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells.“ *Blood*, 101(10): 4189-4194.

Liebau E, Bergmann B, Campbell AM, Teesdale-Spittle P, Brophy PM, Lüersen K, Walter RD. (2002) „The glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 124(1-2): 85-90.

Livak KJ., Schmittgen TD. (2001) „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method.“ *Methods.*, 25(4): 402-408.

Löffler G. (2004) *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer-Verlag.

Lucius R. und Loos-Frank B. (2008) *Biologie von Parasiten*. Springer-Verlag.

Mahajan U und Farooq RC. (2004) „Drug resistance in malaria.“ *J Vect Borne Dis.*, 41(3-4): 45-53.

Maréchal E und Cesbron-Delauw MF. (2001) „The apicoplast: a new member of the plastid family.“ *Trends Plant Sci.*, 6(5): 200-205.

Mehlhorn H und Piekarski G. (2002) *Grundriss der Parasitenkunde*. Spektrum-Verlag.

Mehrotra S, Mylarappa BN, Iyengar P, Balaram H. (2010) „Studies on active site mutants of *P. falciparum* adenylosuccinate synthetase: insights into enzyme catalysis and activation.“ *Biochim Biophys Acta.*, 1804(10): 1996-2002.

Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M, Antalík M. (2002) „Malate Dehydrogenase - Structure and Function.“ *Gen. Physiol. Biophys.*, 21(3): 257-265.

Mittenhuber, G. (2001) „Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways.“ *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 3(1): 1-20.

Mooney S, Hellmann H. (2010) „Vitamin B6: Killing two birds with one stone?“ *Phytochemistry.*, 71(5-6): 495-501.

Mooney S, Leuendorf JE, Hendrickson C, Hellmann H. (2009) „Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity.“ *Molecules.*, 14(1): 329-351.

Moore L und Bellows R. (2012) „Water-Soluble Vitamins: B-Complex and Vitamin C.“ *Colorado State University Extension*.

Moore L und Bellows R. (2012) „Fat-Soluble Vitamins: A, D, E, and K.“ *Colorado State University Extension*.

Müller IB, Das Gupta R, Lüersen K, Wrenger C, Walter RD. (2008) „Assessing the polyamine metabolism of *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 160(1): 1-7.

Müller IB, Hyde JE, Wrenger C. (2010) „Vitamin B metabolism in *Plasmodium falciparum* as a source of drug targets.“ *Trends Parasitol.*, 26(1): 35-43.

Müller IB, Knöckel J, Groves MR, Jordanova R, Ealick SE, Walter RD, Wrenger C. (2008) „The assembly of the plasmodial PLP synthase complex follows a defined course.“ *PLoS One.*, 3(3):e1815.

Müller IB, Wu F, Bergmann B, Knöckel J, Walter RD, Gehring H, Wrenger C. (2009) „Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.“ *PLoS One.*, 4(2):e4406.

Müller S, Da'dara A, Lüersen K, Wrenger C, Das Gupta R, Madhubala R, Walter RD. (2000) „In the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase.“ *J Biol Chem.*, 275(11): 8097-8102.

Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. (2003) „Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites.“ *Trends Parasitol.*, 19(7): 320-328.

Müller IB und Hyde JE. (2010) „Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance.“ *Future Microbiol.*, 5(12): 1857-1873.

Neuwirth M, Flicker K, Strohmeier M, Tews I, Macheroux P. (2007) „Thermodynamic characterization of the protein-protein interaction in the heteromeric *Bacillus subtilis* pyridoxalphosphate synthase.“ *Biochemistry.*, 46(17): 5131-5139.

Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, und Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. (2008) „Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia.“ *N Engl J Med.*, 359(24): 2619-2620.

Olszewski KL, Mather MW, Morrisey JM, Garcia BA, Vaidya AB, Rabinowitz JD, Llinás M. (2010) „Branched tricarboxylic acid metabolism in *Plasmodium falciparum*.“ *Nature*, 466(7307): 774-778.

Olszewski KL und Llinas M. (2011) „Central carbon metabolism of *Plasmodium* parasites.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 175(2): 95-103.

Percudani R und Peracchi A. (2003) „A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes.“ *EMBO Rep.*, 4(9): 850-854.

Piro A, Tagarelli G, Lagonia P, Tagarelli A, Quattrone A. (2010) „Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders.“ *Ann Nutr Metab.*, 57(2): 85-88.

Pradhan A, Mukherjee P, Tripathi AK, Avery MA, Walker LA, Tekwani BL. (2009a) „Analysis of quaternary structure of a [LDH-like] malate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* with oligomeric mutants.“ *Mol Cell Biochem.*, 325(1-2): 141-148.

Pradhan A, Tripathi AK, Desai PV, Mukherjee PK, Avery MA, Walker LA, Tekwani BL. (2009b) „Structure and function of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase: role of critical amino acids in co-substrate binding pocket.“ *Biochimie.*, 91(11-12): 1509-1517.

Price M, Reiners JJ, Santiago AM, Kessel D. (2009) „Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy.“ *Photochem Photobiol.*, 85(5): 1177-1181.

Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, Wishart D. (2011) „The human serum metabolome.“ *PLoS One.*, 6(2):e16957.

Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI. (2004) „Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast.“ *Nat Rev Microbiol.*, 2(3): 203-216.

Raman J, Mehrotra S, Anand RP, Balaram H. (2004) „Unique kinetic mechanism of *Plasmodium falciparum* adenylosuccinate synthetase.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 138(1): 1-8.

Roth E. (1990) "*Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite." *Blood Cells*, 16(2-3): 61-67.

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

Sienkiewicz N, Daher W, Dive D, Wrenger C, Viscogliosi E, Wintjens R, Jouin H, Capron M, Müller S, Khalife J. (2004) „Identification of a mitochondrial

superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol.*, 137(1): 121-132.

Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, González-Gross M. (2007) „Vitamin B6 status, deficiency and its consequences-an overview.“ *Nutr Hosp.*, 22(1): 7-24.

Stocker P, Lesgards JF, Vidal N, Chalier F, Prost M. (2003) „ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins.“ *Biochim Biophys Acta.*, 1621(1): 1-8.

Strohmeier M, Raschle T, Mazurkiewicz J, Rippe K, Sinning I, Fitzpatrick TB, Tews I. (2006) „Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex.“ *Proc Natl Acad Sci UsA.*, 103(51): 19284-9.

Stryer L. (1995) *Biochemie*. Spektrum-Verlag.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. (2006) „Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.“ *Science*, 313(5791): 1287-1290.

Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N, Fitzpatrick TB. (2005) „Vitamin B6 biosynthesis in higher plants.“ *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(38): 13687-13692.

Teng R, Junankar PR, Bubb WA, Rae C, Mercier P and Kirk, K. (2009) „Metabolite profiling of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum* by (1)H NMR spectroscopy.“ *NMR Biomed.*, 22(3): 292-302.

Trager W, and Jensen, JB. (1976) „Human malaria parasites in continuous culture.“ *Science.*, 193(4254): 67367-5.

Triglia T, Cowman AF. (1999) „*Plasmodium falciparum*: a homologue of p-aminobenzoic acid synthetase.“ *Exp Parasitol.*, 92(2): 154-158.

Tripathi AK, Desai PV, Pradhan A, Khan SI, Avery MA, Walker LA, Tekwani BL. (2004) „An alpha-proteobacterial type malate dehydrogenase may complement LDH function in *Plasmodium falciparum*. Cloning and biochemical characterization of the enzyme.“ *Eur J Biochem.*, 271(17): 3488-3502.

Wedel BJ, Foster DC, Miller DE, Garbers DL. (1997) „A mutation of the atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) receptor results in a constitutively hyperactive enzyme.“ *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(2): 459-462.

Wilson CM, Smith AB, Baylon RV. (1996) „Characterization of the delta-aminolevulinic synthase gene homologue in *P. falciparum*.“ *Mol Biochem Parasitol.*, 79(1): 135-140.

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(7): 5242-5248.

Wrenger C, Müller IB, Schifferdecker AJ, Jain R, Jordanova R, Groves MR. (2011) „Specific inhibition of the aspartate aminotransferase of *Plasmodium falciparum*.“ *J Mol Biol.*, 405(4): 956-971.

Wrenger C, Müller IB, Silber AM, Jordanova R, Lamzin VS, Groves MR. (2012a) „Aspartate aminotransferase: bridging carbohydrate and energy metabolism in *Plasmodium falciparum*.“ *Curr Drug Metab.*, 13(3): 332-336.

Wrenger C, Müller IB, Butzloff S, Jordanova R, Lunev S, Groves MR. (2012b) „Crystallization and preliminary X-ray diffraction of malate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*.“ *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, 68(Pt 6): 659-662.

Yang Y, Zhao G, Man TK, Winkler ME. (1998) „Involvement of the gapA- and epd (gapB)-encoded dehydrogenases in pyridoxal 5'-phosphate coenzyme biosynthesis in *Escherichia coli* K-12.“ *J Bacteriol.*, 180(16): 4294-4299.

Young MD und Moore DV. (1961) „Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.“ *Am J Trop Med Hyg.*, 317-320.

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.*, 10: 4609-4620.

Zhao ME und Winkler G. (1995) „Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase of *Escherichia coli* K-12.“ *J Bacteriol.*, 177(4): 883-891.

Zón MA, Marchiando NC, Fernández H. (1999) „A study of the bielectronic electro-reduction of cercosporin phytotoxin in highly acidic non-aqueous medium.“ *J. of Electroanal. Chem.*, 465(2): 225-233.

Danksagung

Frau Dr. Ingrid B. Müller danke ich herzlichst für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit am Bernhard-Nocht-Institut, die Betreuung dieser Arbeit sowie dafür, dass Sie sich immer Zeit für Fragen nahm und stets offen für Diskussionen war. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die Freiheit die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte und für die Chancen zur Teilnahme an diversen Konferenzen, insbesondere die Möglichkeit zur Vorstellung sowie Diskussion meiner Ergebnisse beim „Molecular Parasitology Meeting“ in Woods Hole.

Prof. Dr. Carsten Wrenger danke ich für das freundliche Überlassen des tollen Themas sowie die Übernahme des Gutachteramtes.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Susanne Dobler von der Universität Hamburg, für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie Übernahme der Begutachtung der Disputation, bedanken.

Außerdem geht auch ein großes Dankeschön an meine Kollegen der LG Müller, insbesondere an Bärbel Bergmann für die vielen netten Gespräche zwischen den Versuchen und die immer wieder leckeren Abendessen bei ihr zu Hause, sowie an Madlen Hotze und Victoria Horns für die Unterstützung bei der Analyse der MDH.

Dr. Matthew R. Groves vom EMBL-Hamburg möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der SLS-Analysen sowie der Identifikation potenzieller Mutationsstellen durch Kristallstudien danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann, Steffen Wandschneider, für die liebevolle Unterstützung sowie Geduld neben der Arbeit, und insbesondere auch bei Karla Prechtl für viele tolle Gespräche, Ratschläge sowie das mühselige Korrekturlesen zum Schluss dieser Arbeit, bedanken. Meinen Eltern, Astrid und Detlef Butzloff, sowie meiner Schwester Melanie Butzloff möchte dafür danken, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Problemchen und Anliegen hatten. Gleiches gilt für meine Großeltern, insbesondere meinem Opa Günter Kröpelin danke ich dafür, dass er mein Interesse für die Biologie schon als Kind geweckt hat.

Vielen Dank euch allen!!!

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Zitate wurden als solche kenntlich gemacht. Der Veröffentlichung meiner Dissertation stimme ich zu.

Hamburg, den 27.03.2013

Anhang

Publikationen

Cytometric Quantification of Singlet Oxygen in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

Sabine Butzloff,¹ Matthew R. Groves,² Carsten Wrenger,^{3*} Ingrid B. Müller^{1*}

¹Biochemical Parasitology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard-Nocht Straße 74, D-20359 Hamburg, Germany

²European Molecular Biology Laboratory, Hamburg Outstation c/o DESY, Building 25A, Notkestraße 85, D-22670 Hamburg, Germany

³Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

Received 17 February 2012; Revision Received 13 May 2012; Accepted 21 May 2012

Grant sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG); Grant number: WR124/2; Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Grant number: 2009/54325-2.

*Correspondence to: Carsten Wrenger, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil, or Ingrid B. Müller, Biochemical Parasitology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard-Nocht Straße 74, D-20359 Hamburg, Germany

Email: cwrenger@icb.usp.br or ibmueller@bni-hamburg.de

Published online 26 June 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22081

© 2012 International Society for Advancement of Cytometry

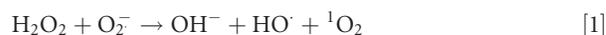
• Abstract

The malaria parasite *Plasmodium falciparum* proliferates within human erythrocytes and is thereby exposed to a variety of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide anion, and highly reactive singlet oxygen (¹O₂). While most ROS are already well studied in the malaria parasite, singlet oxygen has been neglected to date. In this study we visualized the generation of ¹O₂ by live cell fluorescence microscopy using 3-(p-aminophenyl) fluorescein as an indicator dye. While ¹O₂ is found restrictively in the parasite, its amount varies during erythrocytic schizogony. Since the photosensitizer cercosporin generates defined amounts of ¹O₂ we have established a new cytometric method that allows the stage specific quantification of ¹O₂. Therefore, the parasites were first classified into three main stages according to their respective pixel-area of 200–600 pixels for rings, 700–1,200 pixels for trophozoites and 1,400–2,500 pixels for schizonts. Interestingly the highest mean concentration of endogenous ¹O₂ of 0.34 nM is found in the trophozoites stage, followed by 0.20 nM (ring stage) and 0.10 nM (schizont stage) suggesting that ¹O₂ derives predominantly from the digestion of hemoglobin. © 2012 International Society for Advancement of Cytometry

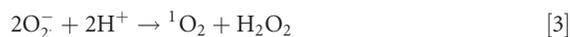
• Key terms

Plasmodium falciparum; singlet oxygen; reactive oxygen species; pixel-area; cercosporin; aminophenyl fluorescein (APF)

MALARIA is one of the most important tropical diseases in the world and is caused by the protozoan parasite *Plasmodium*. The most dangerous form is *Plasmodium falciparum*, which leads to malaria tropica. To find new strategies in order to fight this parasite it is important to understand its metabolism and its development within the red blood cell. During its lifecycle *Plasmodium* is permanently exposed to oxidative stress, caused either by the immune response of the host or by its own high metabolic rate. The degradation of hemoglobin, the main source of amino acids for the parasite (1) leads not only to the generation of toxic heme, hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH[•]) and superoxide anion (O₂^{•-}) (2) but also to the highly reactive, non-radical molecule singlet oxygen (¹O₂) (3). A possible involvement of singlet oxygen in the Fenton-like process, shown in Eq. [1], was described by Kellogg and Fridovich (4).



Moreover one singlet oxygen molecule can be produced by either the reaction of one hydroxyl radical and a superoxide or two superoxide ions and two hydrogen ions (5), shown in the Eqs. [2] and [3], respectively.



To overcome these reactive oxygen species (ROS) *Plasmodium* has developed multiple antioxidant defense mechanisms. A complete glutathione system, a thiore-

doxin system, including peroxiredoxin and two superoxide dismutases are found in the parasite (6). Furthermore, the antioxidative vitamins C and E are available to balance the redox equilibrium (7). However, none of the above mentioned defense systems were shown to detoxify singlet oxygen. Recently vitamin B6 was linked to defang singlet oxygen in plants and fungi (8–10). *Plasmodium falciparum* possesses a functional *de novo* synthesis of pyridoxal 5-phosphate, the active vitamin B6 (11,12), which was recently shown to be involved in the detoxification of singlet oxygen in the parasite (13). Humans with a partially deficient glucose-6-phosphate dehydrogenase activity exhibit a certain degree of protection against malaria (14). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is important in the generation of reduced glutathione, which controls oxidative damage in erythrocytes. Thus the deficit of G6PD leads to higher ROS levels in the host cell of the malaria parasite, thereby killing the pathogen. There is a high potential for the development of drugs attacking the parasite's redox metabolism. Therefore a clear understanding of the occurring oxidative stress level and its variance during the different stages of *Plasmodium* is essential. Tracking the level of oxidative stress within the malaria parasite by using cytometric application has been subject to previous studies (15); however, visualization was solely restricted to the occurrence of general ROS (16).

In the following an *in vivo* study is envisaged describing for the first time a method which enables the visualization and measurement of the amounts of singlet oxygen generated in *Plasmodium falciparum*. We report on the feasibility to quantify the amount of singlet oxygen produced within the parasite and to monitor the changes in singlet oxygen levels during the erythrocytic life cycle.

To produce a defined amount of the highly reactive $^1\text{O}_2$ molecules we used cercosporin, a singlet oxygen producer naturally occurring in the plant pathogenic fungus *Cercospora nicotinae* (17,18).

MATERIALS AND METHODS

Cultivation of *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum wild type cells (3D7 strain) were maintained in continuous culture according to Trager and Jensen as modified (19). In brief, 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 use of human erythrocytes for *P. falciparum* cell culture was approved by UKE/BNI research ethics committee.

Isolation of Parasite Stages by a Discontinuous Percoll-alanine Gradient

The Percoll gradient consisted of four layers of Percoll in RPMI-1640, 0.9% (w/v) NaCl and 3% (w/v) L-alanine [from bottom to top: 90% (8 ml), 80% (5 ml), 70% (5 ml) and 60% (5 ml)] placed in 50 ml Falcon tubes. The culture was centri-

fuged at 1,500 rpm for 5 min at 4°C, the pellet were resuspended in 0.9% (w/v) NaCl with 3% (w/v) L-alanine, and were carefully placed on top of the gradient. Subsequently the tubes were centrifuged at 4,000 rpm for 20 min at room temperature. The cells between the 60–70% interface, containing schizonts, the trophozoites could be found in the 80% layer and the rings were harvested in the top of the 90% layer. The cells were washed three times in 0.9% (w/v) NaCl and resuspended in culture medium.

Synchronization of Ring-Stage Parasites Using Sorbitol

A *Plasmodium* culture with mainly ring stages was pelleted for 5 min at 1,500 rpm and 4°C. The pellet was resuspended in 5 volumes of 5% (w/v) sorbitol in HT-PBS and incubated for 5 min at 37°C according to reference (20). Subsequently the suspension was centrifuged at 4°C for 10 min at 1,000 rpm and the parasites were resuspended in RPMI 1640 and cultivated as described above.

Classification of the Stages Via Sizes of Pixel-Areas

Pictures of a highly sorbitol synchronized culture were taken every 8 h for 48 h with a Axioscope 2 plus microscope with the Plan Apochromal 63x objective (Zeiss, Germany) and the ORCA HR camera (Hamamatsu), pixel size 5.9(H) μm x 5.9(V) μm , using the software of Openlab 5.0.1 (Improvision). The numbers of pixels of at least 30 parasites at each 8 h time point were measured with the software *Adobe Photoshop Version 9.0* resulting in varying pixel-areas according to the respective stage. For simplicity, the pixel-areas obtained were portioned into three distinguishable main stages as shown in Figure 1. Data analysis was performed in GraphPad Prism 4.0 using a one-way ANOVA.

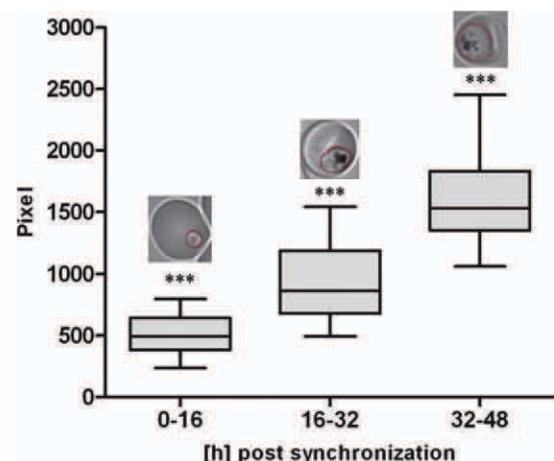


Figure 1. Classification of development stages according to pixel-areas. Column statistics: ring-stage 0–16h post synchronization, ($n = 82$), mean 494 ± 17 ; trophozoit-stage 16–32 h, ($n = 86$), mean 921 ± 29 ; schizont-stage 32–48 h, ($n = 72$), mean $1,617 \pm 39$. Means are significantly different with P value < 0.0001 (one-way ANOVA). Exemplarily selected pixel-areas are shown in red. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Detection of Singlet Oxygen in *P. falciparum*

Using the fluorescence dye 3-(p-aminophenyl) fluorescein (APF) (Invitrogen) it is possible to determine singlet oxygen in living parasites without staining the erythrocytic host cell (Fig. 2) (13). These molecules are produced relative to the concentration of cercosporin added to the culture (ranging from 0.1 nM to 40 nM). The culture was incubated for 1 h at 37°C in the dark. The produced hydroxyl radicals were quenched by adding 1% DMSO to the cells. DMSO does not affect the detection of $^1\text{O}_2$ molecules (21), which were visualized by adding 20 μM APF to the cells. Subsequently the fluorescence of APF was captured with an exposure time of 1,000 ms using a FITC filter and the Axioskop 2 plus microscope (Zeiss, Germany) and quantified with *Adobe Photoshop Version 9.0* (13).

Quantification of Singlet Oxygen Induced by Cercosporin Treatment

Calibration curves were determined by using an asynchronous culture of *P. falciparum*. Four independent experiments were done as described above, treating the parasites with increasing concentrations of cercosporin (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1 nM). Mean values at each cercosporin concentration from four independent experiments were calculated and merged, resulting in three calibration curves, one for each developmental stage. To define the luminosity produced by cercosporin treatment alone, the luminosity of background $^1\text{O}_2$ (in the absence of cercosporin) was subtracted.

To monitor the stage-specific amount of singlet oxygen within the cell, parasites were isolated by Percoll-gradient 8 h before starting the measurement in the ring, trophozoite, and

schizont stage of *Plasmodium*. The luminosity intensities of at least 21 parasites at each stage was detected with an exposure time of 1,000 ms, and analyzed as described above.

RESULTS

Classification of the Parasite Stages by Sizes of Pixel-Areas

To analyze native and induced amounts of singlet oxygen in different life-stages of the parasite a classification according to their size is needed to ensure equal treatment. Therefore, an asynchronous culture was synchronized using sorbitol (20) and analyzed by phase contrast during 8-h intervals. To confirm the sorbitol synchronization we isolated in parallel the three main stages from an asynchronous culture over a discontinuous Percoll-alanin gradient. According to the mean size of the pixel-area at defined time points after synchronization the parasites were categorized into classes. For a sharper segregation into the three major stages (ring, trophozoite, and schizonts) any overlap in the sizes of the pixel-areas were omitted. The resulting categories range from 200 to 600 pixels for rings, 700 to 1,200 pixels for trophozoites and 1,400 to 2,500 pixels for the schizont stage as shown in Figure 1.

Visualization of Singlet Oxygen in *P. falciparum*

The application of the specific singlet oxygen detection dye 3-(p-aminophenyl) fluorescein (APF) resulted in a distinct fluorescent staining of *P. falciparum*, previously treated with cercosporin. No fluorescence was detected in noninfected erythrocytes and the signal was restricted exclusively to the para-

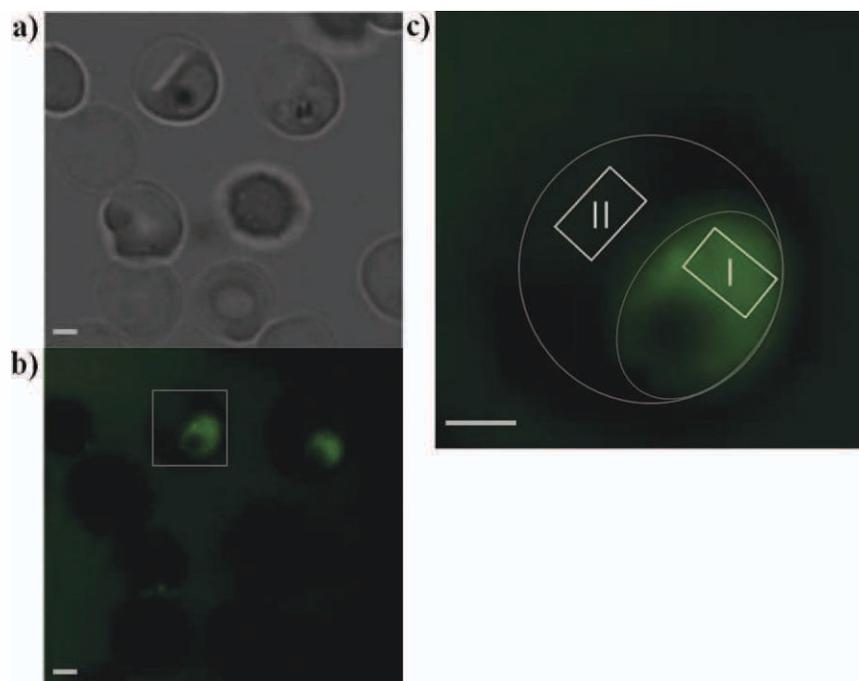


Figure 2. Visualization of singlet oxygen and the method used to measure the luminosity intensity. Phase image (a), fluorescence image of APF-staining of singlet oxygen (b); enlargement of a representative infected erythrocyte as indicated in (c); including the measurement area of the mean luminosity intensity of APF in the parasite (I) and background luminosity (II) in the erythrocytic compartment. The included scale bars are representing 2 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

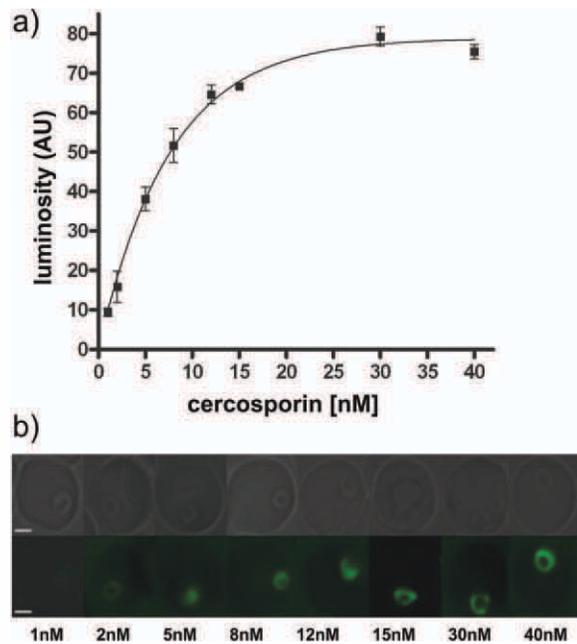


Figure 3. (a) Saturation curve for cercosporin. The saturation-curve was measured from the mean luminosity (with standard deviation) in ring-stage parasites using concentrations of cercosporin from 1 to 40 nM at of 1000 ms exposure time and 20 μ M APF. Equation $f(x) = 76.41(1 - e^{-0.1388x})$, $r^2 = 0.97$, $n = 3$; (b) Luminosity of corresponding cercosporin concentration. The upper row represents a series of ring-stage parasites in phase contrast. The lower panel shows the corresponding APF luminosity, induced by rising cercosporin concentrations as fluorescent images. The included scale bars are representing 2 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

site compartment (Fig. 2). The mean luminosity intensity of a defined area in the parasite was measured and the background luminosity of the erythrocyte was subtracted as indicated in Figure 2c.

The Saturation Curve of APF

In order to identify optimal assay conditions and detection limits a saturation curve of luminosity detected at varying concentration of cercosporin but constant exposure time of 1,000 ms and 20 μ M of APF was generated. The cercosporin concentration ranged from 1 to 40 nM and was visualized within the parasite (Figs. 3a and 3b).

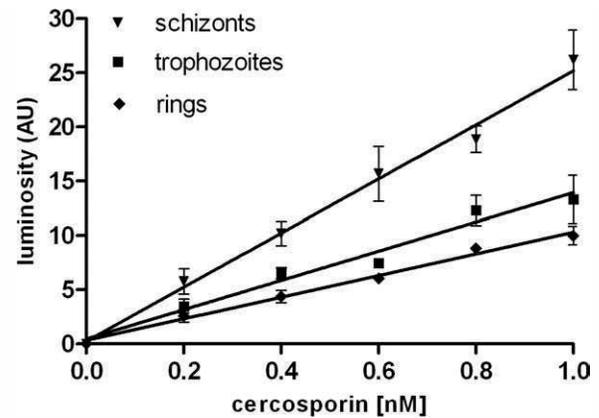


Figure 4. Calibration curves with rising cercosporin concentrations for the ring, the trophozoite and the schizont stage of *P. falciparum*. The luminosities induced by endogenous $^1\text{O}_2$ (Table 1) and background have been subtracted. The linear equations rings: $f(x) = 9.99x$, $r^2 = 0.92$; Trophozoites $f(x) = 13.48x$, $r^2 = 0.85$; schizonts $f(x) = 24.93x$, $r^2 = 0.91$ and $n = 4$ for each line.

Quantifying Singlet Oxygen Induced by Cercosporin in *P. falciparum*

The classification according to the pixel-area allowed the detection of the luminosity generated upon cercosporin treatment in an asynchronous culture in which the different stages are treated under the same condition. In a representative section of the each parasite the mean luminosity (intensity of the fluorescent signal) was measured and the background luminosity of in the erythrocytic compartment was subtracted as illustrated in Figure 2c. The detected luminosity in the respective section includes also those photons being out-of-plane. Taking into account that during the asexual development the volume of the parasite increases, independent calibration curves had to be generated for the three main stages, classified as described above, applying rising cercosporin concentrations. The resulting differences in luminosity at each cercosporin concentration were detected due to different sizes. In order to determine the amount of singlet oxygen in *Plasmodium* we treated parasites with rising concentrations of cercosporin. After subtracting the background luminosity including endogenous singlet oxygen, it is possible to measure the luminosity intensity generated by the respective concentration of cercosporin which give rise to the individual calibration curves as shown in Figure 4. The luminosity of each parasite

Table 1. Quantification the endogenous amount of $^1\text{O}_2$ in the main stages of *P. falciparum*

PLASMODIAL ERYTHROCYTIC STAGES	RING	TROPHOZOITE	SCHIZONT
Mean luminosity (AU)	2.23	5.02	2.76
Equation of the respective regression line	$f(x) = 9.99x$ $r^2 = 0.92$	$f(x) = 13.48x$ $r^2 = 0.85$	$f(x) = 24.93x$ $r^2 = 0.91$
Corresponding cercosporin concentration (nM)	0.22	0.37	0.11
Calculated amount of $^1\text{O}_2$ (nM)	0.18–0.21	0.31–0.36	0.09–0.11

The singlet oxygen content was calculated according to the quantum yield of 0.84–0.97 as determined before (17).

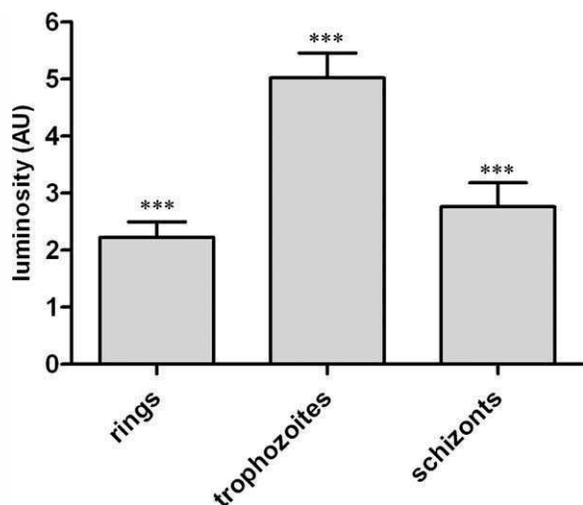


Figure 5. Visualization of endogenous singlet oxygen by APF-staining. Column statistics: rings ($n = 31$) mean 2.23 ± 0.27 ; trophozoites ($n = 43$), mean 5.02 ± 0.43 ; schizonts ($n = 21$), mean 2.76 ± 0.42 . Means are significantly different P -value < 0.0001 (one-way ANOVA).

stage correlates with the amount of cercosporin-induced formation of singlet oxygen. Knowing that the $^1\text{O}_2$ quantum yield of cercosporin ranges from 0.84 to 0.97 and is independent of the environment (18), the intracellular concentration of generated singlet oxygen was calculated in the different parasite stages (Table 1).

Monitoring and Calculation the Stage-Specific Amount of Singlet Oxygen

In Figure 5 the luminosity of the endogenous amount of singlet oxygen is measured for the main stages of the asexual cycle of *P. falciparum* (mean values for rings 2.23 AU, for trophozoites 5.02 AU and for schizonts 2.76 AU). The strongest luminosity was measurable in the trophozoite stage, yet during the development of the ring as well as the schizont phase, the lower levels of luminosity were detected. Using the calibration curves, it is possible to calculate the amount of singlet oxygen in those different steps of development. The results are summarized in Table 1.

DISCUSSION

During proliferation within human erythrocytes the *P. falciparum* is exposed to a variety of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide anion and singlet oxygen. Singlet oxygen is known to harm macromolecules such as DNA, proteins and the lipid bilayer, which results in destruction of the cell membrane (20). In a recent report we have already demonstrated the presence of endogenous as well as cercosporin-induced levels of $^1\text{O}_2$ in the human malaria parasite *P. falciparum* (13).

The intention of the presented study was to measure the production of singlet oxygen during the asexual reproduction cycle of *P. falciparum* using fluorescence microscopy and the

singlet oxygen detection dye APF, which interacts exclusively with $^1\text{O}_2$ in presence of the hydroxyl radical-quenching DMSO (21), as shown before (13). Since one molecule of cercosporin exhibits a quantum yield of 0.84–0.97 for the production of $^1\text{O}_2$ (18), incubation of the parasite with various concentrations of cercosporin leads to a correlated level of $^1\text{O}_2$ synthesis. However, the parasite faces different metabolic situations during erythrocytic schizogony which may result in differences in the production of ROS and thus of $^1\text{O}_2$. Therefore a categorization into the three main developmental stages of *P. falciparum*, ring, trophozoite, and schizont, was required.

During the intraerythrocytic phase the volume of the parasite increases up to 20-fold with respect to the invasive merozoite (22). To enable the analysis of these rapidly growing stages under comparable conditions, a new method was established in which the parasites of an asynchronous culture are categorized into three main groups. This classification according to the sizes of the pixel-areas allows the analysis of external treatment of various stages under identical experimental conditions, a prerequisite for the subsequent analyses presented in this study. Therefore, the parasite had to be synchronized and development was monitored over 48 h permitting a subdivision into the three main stages based only on the increase in the size of pixel-area, which ranged from 200 to 600 pixels for rings, 700 to 1,200 pixels for trophozoites and 1,400 to 2,500 pixels for the schizont stage.

To generate a defined amount of singlet oxygen we used defined concentration of cercosporin, taking into account that in each development-stage the luminosity induced under equal conditions strongly differs due to increased parasite size but not due to variation in the treatment. Hence, three independent calibration curves were calculated—one for each stage (as classified by the size of the pixel-areas).

According to these calibrations the mean values of singlet oxygen were determined to be 0.20 nM in rings, 0.34 nM in trophozoites, and 0.10 nM in schizonts. The result clearly shows that although luminosity appears to be highest in schizonts most singlet oxygen is produced at the trophozoite stage of *P. falciparum*. A similar behavior has already been shown for other reactive oxygen species (16). In that stage the parasite digests roughly 70% of the hemoglobin from its host. The degradation of hemoglobin supplies the parasite with almost all amino acids and it further prevents premature lysis of the already highly permeabilized erythrocyte (23). However, the downside of this hemoglobin digestion is the formation of a large amount of ferroprotoporphyrin IX (heme), which is oxidized to ferriprotoporphyrin IX (hematin), with the concurrent production of a superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$). This is rapidly converted to hydrogen peroxide (H_2O_2). Both of the mentioned molecules react by producing singlet oxygen (4,5).

In summary this study introduces a new but simple cytometric method to simultaneously investigate different stages enabling for the first time the quantification of singlet oxygen within the malarial parasite *P. falciparum* as visualized by life cell imaging. In the future this method might be adapted to flow cytometry approaches to enable automated detection of

singlet oxygen of entire plasmodial cell populations. However, since individual developmental stages generate different amounts of singlet oxygen highly synchronized plasmodial stages are a prerequisite for flow cytometry applications. Alternatively counterstaining with different fluorescent dyes could be applied to enable specific visualization of infected and noninfected erythrocytes as well as different developmental stages of the malaria parasite (24,25).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Ms. Bärbel Bergmann for excellence technical assistance. The human erythrocytes were obtained from the blood bank of the University Hospital Hamburg-Eppendorf (UKE).

LITERATURE CITED

- Sherman IW. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull World Health Organ* 1977;55:265–276.
- Francis SE, Sullivan DJ, and Daniel E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:97–123.
- Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, Weinberger P, Linert W, Vareslija D, Tipton KF, Della Corte L. Highly reactive oxygen species: Detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2067–2079.
- Kellogg EW, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 1975;250:8812–8817.
- Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12365–12367.
- Kehr S, Sturm N, Rahlfs S, Przyborski JM, Becker K. Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLoS Pathog* 2010;6:1001242.
- Stocker P, Lesgards, JF, Vidal N, Chaliel F and Prost M. ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochim Biophys Acta* 2003;1621:1–8.
- Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N and Fitzpatrick TB. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13687–13692.
- Ehrenshaft M, Chung KR, Jenns AE, Daub ME. Functional characterization of SOR1, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotianae*. *Curr Genet* 1999;34:478–485.
- Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* 2000;71:129–134.
- Müller IB, Hyde JE, Wrenger C. Vitamin B metabolism in *Plasmodium falciparum* as a source of drug targets. *Trends Parasitol* 2010;26:35–43.
- 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;280:5242–5248.
- Knöckel J, Müller IB, Butzloff S, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. The antioxidative effect of *de novo* generated vitamin B6 in *Plasmodium falciparum* validated by protein interference. *Biochem J* 2012;443:397–405.
- Guindo A, Fairhurst, RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med* 2007;4:e66.
- Senok AC, Li K, Nelson EA, Arumanayagam M, Li CK. Flow cytometric assessment of oxidant stress in age-fractionated thalassaemic trait erythrocytes and its relationship to in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 1998;116:1–6.
- Fu Y, Tilley L, Kenny S, Klonis N. Dual labeling with a far red probe permits analysis of growth and oxidative stress in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Cytometry Part A* 2010;77:253–263.
- Daub ME, Hangarter RP. Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiol* 1983;73:855–857.
- Daub ME, Li M, Bilski P, Chignell CF. Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: A possible defense against cercosporin phototoxicity in cercospora. *Photochem Photobiol* 2000;71:135–140.
- Das Gupta R, Krause-Ihle T, Bergmann B, Müller IB, Khomutov AR, Müller S, Walter RD, Lüersen K. 3-Aminoxy-1-aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2857–2864.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979;65:418–420.
- Price M, Reiners JJ, Santiago AM, Kessel D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2009;85:1177–1181.
- Glaeser J, Nuss AM, Berghoff BA, Klug G. Singlet oxygen stress in microorganisms. *Adv Microb Physiol* 2011;58:141–173.
- Lew VL, Tiffert T, Ginsburg H. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* 2003;101:4189–4194.
- Grimberg BT, Erickson JJ, Sramkoski RM, Jacobberger JW, Zimmerman PA. Monitoring *Plasmodium falciparum* growth and development by UV flow cytometry using an optimized Hoechst-thiazole orange staining strategy. *Cytometry A* 2008;73A:546–554.
- Gerena Y, Gonzalez-Pons M, Serrano AE. Cytofluorometric detection of rodent malaria parasites using red-excited fluorescent dyes. *Cytometry A* 2011;79A:965–972.

Carsten Wrenger,^{a,b} Ingrid B. Müller,^b Sabine Butzloff,^b Rositsa Jordanova,^c Sergey Lunev^c and Matthew R. Groves^{c*}

^aDepartment of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes 1374, 05508-000 Sao Paulo-SP, Brazil, ^bBiochemical Parasitology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard Nocht Strasse 74, D-20359 Hamburg, Germany, and ^cEuropean Molecular Biology Laboratory – Hamburg Outstation c/o DESY, Building 25A, Notkestrasse 85, D-22670 Hamburg, Germany

Correspondence e-mail:
groves@embl-hamburg.de

Received 20 February 2012
Accepted 3 April 2012

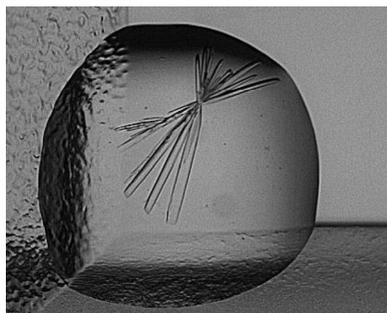
Crystallization and preliminary X-ray diffraction of malate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*

The expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction characterization of malate dehydrogenase (MDH) from the malarial parasite *Plasmodium falciparum* (*PfMDH*) are reported. In order to gain a deeper understanding of the function and role of *PfMDH*, the protein was purified to homogeneity. The purified protein crystallized in space group *P1*, with unit-cell parameters $a = 72$, $b = 157$, $c = 159$ Å, $\alpha = 105$, $\beta = 101$, $\gamma = 95^\circ$. The resulting crystals diffracted to a maximal resolution of 2.24 Å and the structure has been solved by molecular replacement, with 16 monomers in the asymmetric unit. The 16 monomers are arranged into four independent tetramers, in agreement with previous reports demonstrating the tetrameric solution state of *PfMDH*. The X-ray structure of *PfMDH* is expected to clarify the differences in catalysis by *PfMDH* compared with other MDH family members and to provide a basis for the structure-based design of specific *PfMDH* inhibitors as well as general MDH inhibitors.

1. Introduction

Malaria remains a pressing concern for global human health, and the lack of an effective vaccine as well as the spread of multi-drug-resistant strains requires the development of novel drug leads. Currently, the highly effective compound atovaquone, a constituent of the approved therapeutic Malarone, is known to interact with the bc_1 complex of the mitochondrial respiratory chain (Kessl *et al.*, 2003). Interestingly, recent publications have demonstrated the presence of a bifurcated tricarboxylic acid (TCA) cycle within the mitochondria of the parasite that is composed of both oxidative and reductive pathways (Olszewski & Llinás, 2011; Olszewski *et al.*, 2010). As a result, the malarial parasite does not cycle metabolites around a classical TCA pathway, but rather is dependent on the import and export of metabolites from the mitochondria in order to fuel carbon metabolism in the mitochondria.

The mitochondrial functions of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* have recently attracted renewed interest, mainly because the genome sequence of the parasites revealed that genes encoding proteins that were thought to be irrelevant for parasite survival or development appear to be present in the parasite genome (Gardner *et al.*, 2002). In this context, the genes encoding the proteins that comprise the TCA cycle have been identified. However, the precise functions and localizations of some of the parasite proteins differ from those found in other eukaryotes. For instance, mitochondrial isocitrate dehydrogenase is an NADP⁺-dependent enzyme that is most likely not to be a part of the parasite's TCA cycle but appears to play a role in redox regulation of the organelle (Wrenger & Müller, 2003). Furthermore, it has been shown that the pyruvate dehydrogenase, which is usually the link between cytosolic glycolysis and the mitochondrial TCA cycle, is located in the apicoplast of *P. falciparum*, where it provides acetyl-CoA and NADH for fatty-acid biosynthesis (Foth *et al.*, 2005). These data suggest that the roles of the enzymes predicted to be involved in certain metabolic pathways in the malaria parasites should be reassessed in order to define their precise functions in parasite metabolism.



© 2012 International Union of Crystallography
All rights reserved

Malate dehydrogenase (MDH) catalyses the reversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of oxaloacetate to malate. MDHs exist in multiple forms that differ in cofactor specificity and subcellular localization. Phylogenetic analyses of protozoan MDHs (EC 1.1.1.37) differentiated these enzymes into different classes, with a subdivision between mitochondrial and cytosolic MDHs (Roger *et al.*, 1999). MDHs are members of the NAD⁺-dependent dehydrogenase family, which includes lactate dehydrogenases and alcohol dehydrogenases. These proteins are characterized by two functional domains, the catalytic domain and the NAD⁺-binding domain, and are generally homodimeric or homotetrameric. However, mutants of MDHs also appear to be active in a monomeric form (Madern *et al.*, 2000). Madern and coworkers placed apicoplast MDHs at an evolutionary branch point between the MDH and lactate dehydrogenase (LDH) families by primary-sequence analysis and a comparison of the solution oligomeric state.

Despite the high degree of homology between the members of the NAD⁺ dehydrogenase family, the enzymes are very specific for their respective substrates: MDHs have a high specificity for malate and oxaloacetate, whereas pyruvate and lactate are not accepted as substrates at an appreciable rate (Chapman *et al.*, 1999). Mitochondrial MDH is an integral part of the TCA cycle, providing oxaloacetate for the generation of citrate and NADH to fuel the mitochondrial electron-transport chain. However, *P. falciparum* does not possess a currently identified mitochondrial MDH, but rather a cytosolic MDH which supplies metabolites to the mitochondria and might be responsible for the generation of reducing equivalents, *e.g.* malate, to feed the respiratory chain (Wrenger *et al.*, 2012). The cytosolic enzyme serves in the provision of malate, which is transported into the mitochondrion *via* a potential malate/aspartate shuttle (Gardner, 2002). This shuttle system would allow the bi-directional transport of reducing equivalents between the cytosol and the mitochondrion and therefore overcomes the barrier of the inner mitochondrial membrane, which is impermeable to pyridine nucleotides.

In order to more fully understand the role of the cytosolic MDH of *P. falciparum* (*PfMDH*), we have expressed, purified and crystallized *PfMDH* and report the X-ray diffraction characterization of the crystals obtained.

2. Methods

2.1. Cloning of *PfMDH*

The *MDH* gene of *P. falciparum* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using sequence-specific sense (5'-GCG CGC **GGTCTC** CAA TGA CTA AAA TTG CCT TAA TAG GTA GTG G-3') and antisense (5'-GCG CGC **GGTCTC** AGC GCT TTA AAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GGC CTT TAA TTA AGT CGA AAG CTT TTT GTG-3') oligonucleotides containing *Bsa*I restriction sites (indicated in bold) and *P. falciparum* 3D7 cDNA as template. The PCR was performed with *Pfu* polymerase using the following conditions: one cycle of 367 K for 7 min followed by 35 cycles of 1 min at 367 K, 1.5 min at 315 K and 2 min at 341 K. The PCR fragments were either cloned into TOPO Blunt (Invitrogen) or pASK-IBA3 previously digested with *Bsa*I and their nucleotide sequences were determined by automated sequencing (Seqlab, Germany). Nucleotide-sequence and protein-sequence analyses were performed using the *Gene Runner* software. The final construct consisted of full-length *PfMDH* (PFF0895w; residues 1–313) with the additional amino acids GHHHHHHHLKR at the C-terminus.

2.2. Expression of *PfMDH*

PfMDH was recombinantly expressed in *Escherichia coli* BLR (DE3) (Novagen) using the expression plasmid pASK-IBA-MDH, which contains the open reading frame for the *MDH* gene fused to a C-terminal His tag to facilitate purification. Recombinant protein was purified *via* nickel-chelating chromatography employing the C-terminal His tag according to the manufacturer's recommendations. Transformed *E. coli* BLR (DE3) cells were propagated in selective medium (TB in the presence of 35 µg ml⁻¹ ampicillin) overnight at 310 K. The culture was induced at an OD₆₀₀ of 0.8 with 2 µg ml⁻¹ anhydrotetracycline. After induction, the temperature of the culture was lowered to 292 K and the cells were harvested by centrifugation (5500 rev min⁻¹ for 30 min) after overnight induction. All lysis, clarification and purification steps were performed at 277 K unless otherwise specified.

2.3. Purification of *PfMDH*

The frozen cells from 3 l culture medium were suspended in 50 ml buffer A [50 mM bis-Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10%(v/v) glycerol, 5 mM β-mercaptoethanol (BME)] supplemented with 10 units of DNase. The cells were lysed by sonication and the homogenate was clarified by centrifugation at 19 000 rev min⁻¹ for 60 min.

The supernatant containing the soluble His-tagged protein was filtered using 0.22 µm Filtropur filters (Sarstedt) and incubated for 10 min with 15 ml Ni-charged affinity resin (Ni-NTA Agarose, Qiagen). The beads were poured into a gravity-flow column (Bio-Rad) and washed with 200 ml buffer A. The protein was eluted with 50 mM bis-Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.25 M imidazole, 10%(v/v) glycerol, 5 mM BME. The eluate was pooled and immediately dialyzed overnight at 277 K against 20 mM bis-Tris pH 6.5, 200 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol, 5 mM BME.

The protein was concentrated to a volume of 2 ml and applied onto a HiLoad 16/60 Superdex 75 column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM bis-Tris pH 6.5, 150 mM NaCl, 5 mM BME. The gel-filtration buffer was chosen based upon a ThermoFluor-based stability assay (Ericsson *et al.*, 2006; Nettleship *et al.*, 2008). The final purified protein eluted as a single peak with a retention time consistent with a tetrameric protein (data not shown). This peak was pooled and concentrated using a Spin-X UF concentration unit with a 10 kDa cutoff (Corning).

The final protein concentration was determined to be 10 mg ml⁻¹ based upon its theoretical absorbance at 280 nm [$Abs_{0.1\%}(1 \text{ mg ml}^{-1}) = 0.35$; <http://web.expasy.org/protparam/>]. The final yield of purified *PfMDH* was approximately 5 mg per litre of culture. The protein was concentrated and immediately used in crystallization trials. The protein purity was better than 95% as estimated using Coomassie Brilliant Blue-stained SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

3. Results

3.1. Crystallization of *PfMDH*

Concentrated protein was submitted to the EMBL Hamburg high-throughput crystallization facility (Mueller-Dieckmann, 2006) for initial screening against the Classics and Classics II Suites (Qiagen) sparse-matrix screening kits. Experiments were also performed in the presence of 1,8-ANS (Groves *et al.*, 2007; Watts *et al.*, 2010) to aid the identification of successful trials. All crystallization was performed at 293 K using equal volumes (200 nl) of protein solution

and crystallization reagent. Rod-shaped crystals of *PfMDH* appeared one to two weeks after setting up crystallization experiments. Initial crystals were identified in 0.96 M sodium citrate pH 7.0 (Fig. 1a). Further optimization was performed at the same facility, using optimization screens designed around successful initial crystallization conditions in the absence of 1,8-ANS. The initial hit was optimized using an adapted solution-seeding method (D'Arcy *et al.*, 2007) in which the initial crystallization conditions were used as an additive (10%) for repeated sparse-matrix screening. After obtaining improved crystals in 0.096 M sodium citrate pH 7, 25% (w/v) PEG 3350, we obtained a final condition consisting of 0.1 M ammonium citrate pH 7, 22% (w/v) PEG 3350.

3.2. Diffraction data collection and processing

Optimized crystals were briefly transferred into a cryoprotective solution composed of 0.2 M ammonium citrate pH 7.0, 40% (w/v) PEG 3350. After a brief incubation period (5 s), the crystals were harvested from the cryoprotective solution into suitably sized cryoloops (Hampton Research). The mounted crystals were then flash-cooled in the nitrogen stream on beamline X13 at EMBL Hamburg (100 K) or plunge-cooled in liquid nitrogen prior to shipment to beamline BM14 at the ESRF. Initial frames (1 s exposure, 0 and 90° φ -axis rotation values) were used to characterize the crystals for optimal data-collection parameters using the software *BEST* (Bournekov & Popov, 2006) as implemented in *DNA* (Incardona *et al.*, 2009). Data-collection parameters are indicated in Table 1.

Data were reduced using the *XDS* (Kabsch, 2010) and *SCALA* software (Evans, 2006). An analysis based on the Matthews coefficient (Matthews, 1968) predicted multiple copies of *PfMDH* in the

Table 1

Results of data collection from *PfMDH* crystals.

Values in parentheses are for the highest resolution bin.

Data-collection parameters	X13, EMBL Hamburg	BM14, ESRF
Beamline	X13, EMBL Hamburg	BM14, ESRF
Wavelength (Å)	0.8123	0.97841
Temperature (K)	100	100
Oscillation range (°)	0.25	0.3
Crystal-to-detector distance (mm)	266.27	253.45
No. of frames	999	650
Exposure per frame (s)	15	6
Data-integration statistics		
Space group	<i>P1</i>	<i>P1</i>
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 71.8, b = 156.6,$ $c = 158.6, \alpha = 104.6,$ $\beta = 101.0, \gamma = 95.1$	$a = 72.4, b = 155.3,$ $c = 159.1, \alpha = 103.6,$ $\beta = 101.5, \gamma = 95.2$
Resolution limits (Å)	19.76–2.95 (3.12–2.95)	47.62–2.24 (2.38–2.24)
Total No. of reflections	326962 (35475)	580251 (60206)
No. of unique reflections	126210 (16058)	273174 (31701)
Multiplicity	2.59 (2.21)	2.12 (1.90)
Completeness (%)	92.0 (73.6)	89.5 (64.3)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	17.6 (64.8)	5.3 (45.6)
Mean $I/\sigma(I)$	5.88 (1.42)	10.46 (1.57)
V_M^{\ddagger} (Å ³ Da ⁻¹)	3.08	
Solvent content ‡ (%)	60.15	

† R_{merge} is defined as $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the i th intensity measurement of reflection hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity from multiple observations. ‡ Based on 16 molecules per asymmetric unit.

asymmetric unit. Accordingly, an R_{free} set (Brünger, 1992) for use in subsequent structure refinement and validation was created using 5% of the reflections populated from reflections in thin shells of equivalent resolution using the *DATAMAN* package (Kleywegt & Jones, 1996).

Molecular-replacement calculations were performed using the *MOLREP* package (Vagin & Teplyakov, 2010).

4. Discussion

Rod-shaped crystals of *PfMDH* appeared one to two weeks after setting up crystallization experiments using the EMBL Hamburg high-throughput crystallization facility (Mueller-Dieckmann, 2006). Initial crystals grown in 0.96 M sodium citrate pH 7.0 (Fig. 1a) diffracted to 2.77 Å resolution on beamline X13 at EMBL Hamburg (Table 1). The optimized crystals used for data collection (Fig. 1b, Table 1) had dimensions of 0.1 × 0.1 × 0.3 mm and diffracted to 2.24 Å resolution on beamline BM14 at the ESRF (Fig. 2, Table 1). Indexing algorithms determined that the *PfMDH* crystals belonged to the primitive monoclinic system, with unit-cell parameters $a = 72.4, b = 155.3, c = 159.1$ Å, $\alpha = 103.6, \beta = 101.5, \gamma = 95.2^\circ$.

The data-collection and reduction statistics for the *PfMDH* crystal are reported in Table 1. Indicative diffraction patterns are shown in Fig. 2. Based on the molecular weight and the space group, it was inferred that there were 16 molecules of *PfMDH* in the asymmetric unit of the crystal, which corresponds to a solvent content of about 56% (Matthews, 1968). Initial molecular-replacement trials using the data collected on beamline X13 at EMBL Hamburg were performed in *BALBES* (Long *et al.*, 2008) and a solution was found using the coordinates of MDH from *Cryptosporidium parvum* (PDB entry 2hjr; Vedadi *et al.*, 2007), which possesses 42.9% sequence identity over 309 residues, as a search model.

Molecular replacement using the data collected on beamline BM14 at the ESRF confirmed the correctness of the previously identified solution. The best solution for the higher resolution data (Tf/σ score of 6.036, Tf contrast of 4.491), as well as acceptable R and R_{free} values after the first refinement cycle (45.3 and 45.2, respectively), supported

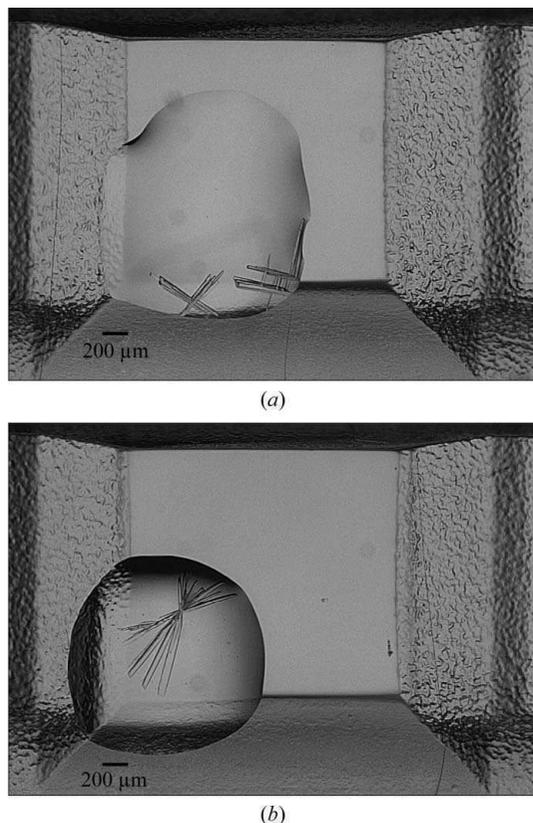


Figure 1
Images of (a) initial and (b) optimized crystals of *PfMDH* grown at the EMBL high-throughput crystallization facility (Mueller-Dieckmann, 2006). Growth conditions are detailed in the text.

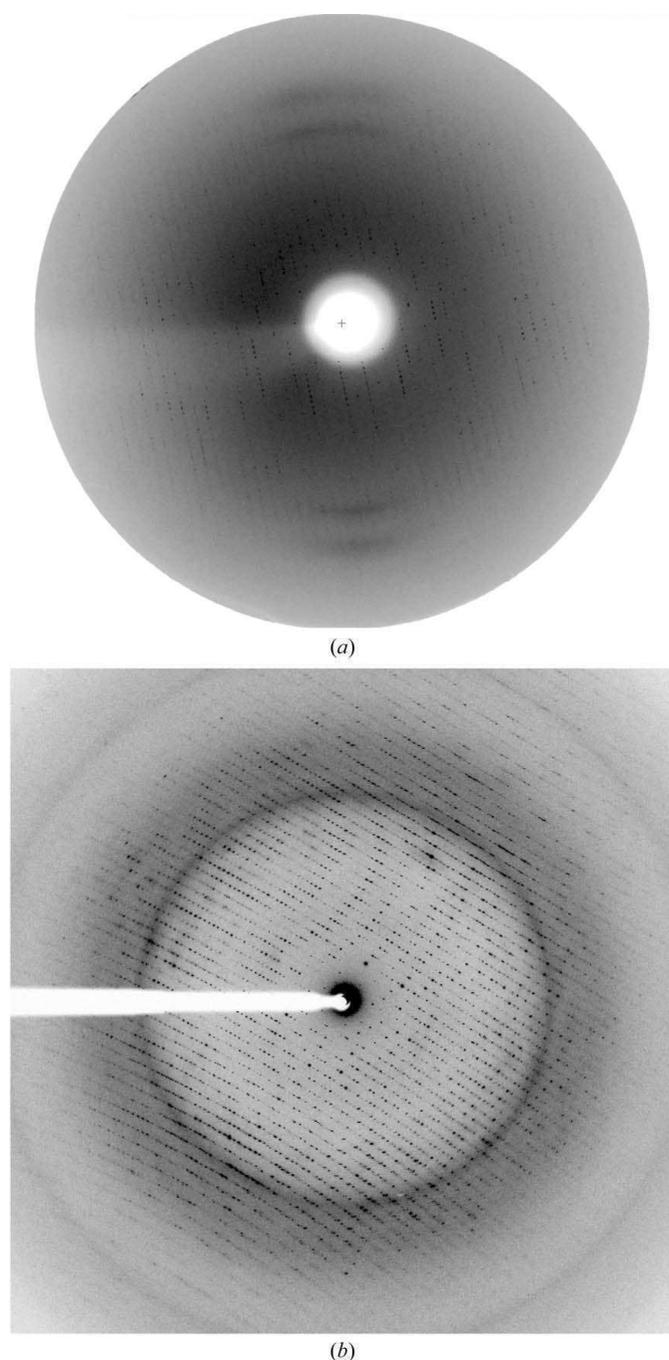


Figure 2
Examples of the diffraction obtained from the (a) unoptimized (beamline X13, EMBL Hamburg) and (b) optimized (beamline BM14, ESRF) crystals of PfMDH. Data were collected from the unoptimized crystal and the optimized crystal harvested into a fibre loop and a Mylar loop, respectively. The maximum resolutions in (a) and (b) are 2.74 and 2.24 Å, respectively. The corresponding beamline parameters are indicated in Table 1.

the presence of four tetrameric PfMDH assemblies in the asymmetric unit.

In this regard, it is pertinent to note that previous research on MDHs, for example those from *Flavobacterium frigidimarum* (Fujii *et al.*, 2007), *C. parvum* (Vedadi *et al.*, 2007) and a thermophilic *Bacillus* species (Wynne *et al.*, 1996), have shown that MDH displays a strong tendency to form oligomers and exists predominantly as tetramers, although isoforms of the enzyme from other species have been reported to be present as either dimers or tetramers in solution

(Hunter *et al.*, 2000). Additionally, it has previously been reported that PfMDH is a tetramer in solution (Pradhan *et al.*, 2009). Crystal structure refinement of PfMDH is in progress and analysis of the structure will be reported elsewhere. The determined structure is likely to shed light on the differences in PfMDH catalysis when compared with that of other MDH family members and to help in the structure-based design of specific PfMDH inhibitors as well as general MDH inhibitors.

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; grant WR124/2) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant 09/54325-2) to CW. X-ray data were collected on beamlines X13 at EMBL Hamburg and BM14 at the ESRF. We would like to thank Bärbel Bergmann for outstanding technical support and Drs J. Müller-Dieckmann and V. Lamzin for stimulating discussions. The authors would also like to thank the staff of beamline BM14 at the ESRF for their support during data collection.

References

- Bourenkov, G. P. & Popov, A. N. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 58–64.
 Brünger, A. T. (1992). *Nature (London)*, **355**, 472–475.
 Chapman, A. D., Cortés, A., Dafforn, T. R., Clarke, A. R. & Brady, R. L. (1999). *J. Mol. Biol.* **285**, 703–712.
 D’Arcy, A., Villard, F. & Marsh, M. (2007). *Acta Cryst.* **D63**, 550–554.
 Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., DeTitta, G. T., Dekker, N. & Nordlund, P. (2006). *Anal. Biochem.* **357**, 289–298.
 Evans, P. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 72–82.
 Foth, B. J., Stimmeler, L. M., Handman, E., Crabb, B. S., Hodder, A. N. & McFadden, G. I. (2005). *Mol. Microbiol.* **55**, 39–53.
 Fujii, T., Oikawa, T., Muraoka, I., Soda, K. & Hata, Y. (2007). *Acta Cryst.* **F63**, 983–986.
 Gardner, M. J. *et al.* (2002). *Nature (London)*, **419**, 498–511.
 Groves, M. R., Müller, I. B., Kreplin, X. & Müller-Dieckmann, J. (2007). *Acta Cryst.* **D63**, 526–535.
 Hunter, G. R., Hellman, U., Cazzulo, J. J. & Nowicki, C. (2000). *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**, 203–214.
 Incardona, M.-F., Bourenkov, G. P., Levik, K., Pieritz, R. A., Popov, A. N. & Svensson, O. (2009). *J. Synchrotron Rad.* **16**, 872–879.
 Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.
 Kessler, J. J., Lange, B. B., Merbitz-Zahradnik, T., Zwicker, K., Hill, P., Meunier, B., Pálsdóttir, H., Hunte, C., Meshnick, S. & Trumppower, B. L. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 31312–31318.
 Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996). *Acta Cryst.* **D52**, 826–828.
 Laemmli, U. K. (1970). *Nature (London)*, **227**, 680–685.
 Long, F., Vagin, A. A., Young, P. & Murshudov, G. N. (2008). *Acta Cryst.* **D64**, 125–132.
 Madern, D., Ebel, C., Mevarech, M., Richard, S. B., Pfister, C. & Zaccari, G. (2000). *Biochemistry*, **39**, 1001–1010.
 Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
 Mueller-Dieckmann, J. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 1446–1452.
 Nettleship, J. E., Brown, J., Groves, M. R. & Geerlof, A. (2008). *Methods Mol. Biol.* **426**, 299–318.
 Olszewski, K. L. & Llinás, M. (2011). *Mol. Biochem. Parasitol.* **175**, 95–103.
 Olszewski, K. L., Mather, M. W., Morrissy, J. M., Garcia, B. A., Vaidya, A. B., Rabinowitz, J. D. & Llinás, M. (2010). *Nature (London)*, **466**, 774–778.
 Pradhan, A., Mukherjee, P., Tripathi, A. K., Avery, M. A., Walker, L. A. & Tekwani, B. L. (2009). *Mol. Cell. Biochem.* **325**, 141–148.
 Roger, A. J., Morrison, H. G. & Sogin, M. L. (1999). *J. Mol. Evol.* **48**, 750–755.
 Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.
 Vedadi, M. *et al.* (2007). *Mol. Biochem. Parasitol.* **151**, 100–110.
 Watts, D., Müller-Dieckmann, J., Tsakanova, G., Lamzin, V. S. & Groves, M. R. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 901–908.
 Wrenger, C., Müller, I. B., Silber, A. M., Jordanova, R., Lamzin, V. S. & Groves, M. R. (2012). *Curr. Drug Metab.* **13**, 332–336.
 Wrenger, C. & Müller, S. (2003). *Eur. J. Biochem.* **270**, 1775–1783.
 Wynne, S. A., Nicholls, D. J., Scawen, M. D. & Sundaram, T. K. (1996). *Biochem. J.* **317**, 235–245.

The antioxidative effect of *de novo* generated vitamin B₆ in *Plasmodium falciparum* validated by protein interference

Julia KNÖCKEL*¹, Ingrid B. MÜLLER*, Sabine BUTZLOFF*, Bärbel BERGMANN*, Rolf D. WALTER* and Carsten WRENGER*^{†2}

*Department of Biochemistry, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard-Nocht-Strasse 74, D-20359 Hamburg, Germany, and [†]Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

The malaria parasite *Plasmodium falciparum* is able to synthesize *de novo* PLP (pyridoxal 5'-phosphate), the active form of vitamin B₆. In the present study, we have shown that the *de novo* synthesized PLP is used by the parasite to detoxify ¹O₂ (singlet molecular oxygen), a highly destructive reactive oxygen species arising from haemoglobin digestion. The formation of ¹O₂ and the response of the parasite were monitored by live-cell fluorescence microscopy, by transcription analysis and by determination of PLP levels in the parasite. Pull-down experiments of transgenic parasites overexpressing the vitamin B₆-biosynthetic enzymes *PfPdx1* and *PfPdx2* clearly demonstrated an interaction of the two proteins *in vivo* which results in an elevated PLP level from 12.5 μM in wild-type

parasites to 36.6 μM in the *PfPdx1/PfPdx2*-overexpressing cells and thus to a higher tolerance towards ¹O₂. In contrast, by applying the dominant-negative effect on the cellular level using inactive mutants of *PfPdx1* and *PfPdx2*, *P. falciparum* becomes susceptible to ¹O₂. Our results demonstrate clearly the crucial role of vitamin B₆ biosynthesis in the detoxification of ¹O₂ in *P. falciparum*. Besides the known role of PLP as a cofactor of many essential enzymes, this second important task of the vitamin B₆ *de novo* synthesis as antioxidant emphasizes the high potential of this pathway as a target of new anti-malarial drugs.

Key words: antioxidant, malaria, oxidative stress, *Plasmodium falciparum*, singlet molecular oxygen, vitamin B₆.

INTRODUCTION

Vitamin B₆ is an essential nutrient, which is needed by all living organisms to maintain a functional cell metabolism. To date, more than 140 enzymes have been found to be dependent on the cofactor PLP (pyridoxal 5'-phosphate), the active component of vitamin B₆ [1]. Many of the PLP-dependent enzymes are essential and therein offer the possibility to target diseases [2]. Whereas humans are entirely dependent on the uptake of vitamin B₆ from their diet, bacteria, fungi and plants as well as the apicomplexan parasites *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* possess a *de novo* vitamin B₆-synthesis pathway [3–6]. Vitamin B₆ can be synthesized in two ways. *Escherichia coli* and other members of the γ-subdivision of proteobacteria possess the DXP (1-deoxyxylulose 5-phosphate)-dependent vitamin B₆-synthesis pathway. In contrast, the DXP-independent vitamin B₆-biosynthesis route is present in fungi and plants, as well as the renowned human pathogens *P. falciparum*, *T. gondii* and *Mycobacterium tuberculosis* [4,6,7]. PLP, the active form of vitamin B₆, is synthesized from the substrates glutamine, ribose 5-phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate by the two enzymes Pdx1 and Pdx2 [3,4,6]. The enzymes assemble into a complex consisting of 12 Pdx1 proteins, forming a double crown of two hexameric rings, in which each Pdx1 is decorated by one Pdx2 enzyme [8,9].

Vitamins such as ascorbic acid (vitamin C) or tocopherol (vitamin E) are well known for their antioxidative potential [10]. A similar function has been suggested for vitamin B₆ [11–13]. These studies have revealed that PLP possesses a high antioxidative

reactivity, comparable with that of vitamins C and E [3,10] and is, as such, being involved in the defence against oxidative stress. Oxidative stress is caused by the formation of ROS (reactive oxygen species) which leads to profound cell damage. ROS such as hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radicals (OH•), superoxide anions (O₂⁻) or singlet molecular oxygen (¹O₂) are side products of cell metabolism, deriving mainly from photo-oxidative reactions or electron-transfer reactions involving haem proteins (e.g. cytochromes). They are described as signalling molecules inducing apoptosis [14] and as an important weapon of immune cells to fight invading pathogens [15].

During its life cycle in the mosquito and human hosts, the malaria parasite *P. falciparum* is permanently exposed to elevated levels of oxidative stress [16]. Besides attacks of the immune systems of the respective host, where ROS are deployed to kill invading pathogens, the parasite faces another even bigger challenge: *Plasmodium* relies on the digestion of human haemoglobin to obtain amino acids for its metabolism and to make room for itself to grow inside the erythrocyte [17]. During haemoglobin breakdown, toxic haem (ferriprotoporphyrin IX) [18] and H₂O₂, OH• radicals and O₂⁻, as well as highly reactive ¹O₂ molecules, are generated [19,20], which have to be detoxified in the parasite. The malaria parasite exhibits different enzymatic stress-defence systems, such as a glutathione and a thioredoxin system including plasmoredoxin and two superoxide dismutases to protect itself against ROS [21]. Additionally, the antioxidative vitamins C and E are available to balance the redox equilibrium. However, with the exception of vitamin E, which is lipid-soluble and therefore suggested to be located in cell membranes [22],

Abbreviations used: APF, 3'-(*p*-aminophenyl) fluorescein; au, arbitrary units; Bsd, blasticidin S deaminase; DXP, 1-deoxyxylulose 5-phosphate; GFP, green fluorescent protein; hDHFR, human dihydrofolate reductase; HRP, horseradish peroxidase; ORF, open reading frame; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; ROS, reactive oxygen species; Strep, *Strep*-tag II; TPK, thiamine pyrophosphokinase; WT, wild-type.

¹ Present address: Laboratory of Malaria and Vector Research (LMVR), National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, U.S.A.

² To whom correspondence should be addressed (email cwrenger@icb.usp.br).

The nucleotide sequence data reported for *PfPdx1* and *PfPdx2* have been deposited in the DDBJ, EMBL, GenBank® and GSDB Nucleotide Sequence Databases under accession numbers NP_703871 and AJ871406 respectively.

none of the above-mentioned defence systems are able to detoxify $^1\text{O}_2$. The fact that vitamin B₆ is linked to $^1\text{O}_2$ defence in plants and fungi [5,11] suggests that vitamin B₆ biosynthesis might also play a yet unrecognized role as antioxidant in *P. falciparum* which is adjustable to variable levels of oxidative stress within the cell [6].

In the present study, using cercosporin, a $^1\text{O}_2$ producer generated by the plant pathogenic fungus *Cercospora nicotinae* [23], we investigate the presence of $^1\text{O}_2$, visualized by the cell-permeant fluorescence dye APF [3'-(*p*-aminophenyl) fluorescein] [24], and its detoxification in *P. falciparum*. Our results show a strong induction of $^1\text{O}_2$ levels in the parasite caused by cercosporin treatment, which leads to the up-regulation of vitamin B₆ biosynthesis in WT (wild-type) parasites. Furthermore, co-transgenic parasites episomally overexpressing *PfPdx1* and *PfPdx2* exhibit a higher tolerance to $^1\text{O}_2$ than parasites overexpressing inactive mutants of the two proteins. The latter are even more sensitive to cercosporin than WT parasites. By performing co-purification of the episomally expressed proteins from these transgenic parasites, we additionally substantiate the *in vivo* interaction of *PfPdx1* and *PfPdx2* in the malaria parasite, which is indispensable for the *de novo* synthesis of PLP.

EXPERIMENTAL

Reagents

Restriction enzymes and ligase were purchased from New England Biolabs, and oligonucleotides were from MWG Operon. The StrepTactin™ Sepharose purification system and the monoclonal anti-Strep (*Strep*-tag II) antibody were purchased from IBA. The monoclonal anti-Myc antibody and APF were from Invitrogen. Cercosporin and all other chemicals were from Sigma, unless stated otherwise.

Cultivation of *P. falciparum* and Northern blot analyses of cercosporin-treated WT parasites

P. falciparum strain 3D7 was maintained in continuous culture using the method of Trager and Jensen [25] as modified in [26]. Briefly, 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) at 4% haematocrit. The cells were cultivated in 90-mm-diameter Petri dishes (Nunc) and incubated at 37°C in 90% N₂, 5% O₂ and 5% CO₂.

To establish the influence of an increased level of $^1\text{O}_2$ on the transcription of *pdx1* (GenBank® accession number PFF1025c) and *pdx2* (GenBank® accession number AJ871406), *P. falciparum* 3D7 parasites were incubated in presence of cercosporin, a fungal toxin known as an $^1\text{O}_2$ producer. The impact of cercosporin on the erythrocytic stages of *P. falciparum* was determined by using the [³H]hypoxanthine-incorporation assay as described in [26] and the IC₅₀ value was calculated from sigmoidal inhibition curves using GraphPad Prism 4.0.

To determine the effect of cercosporin on the transcription of the *pdx1* and *pdx2* genes, highly synchronized *P. falciparum* 3D7 cultures containing 8–10% trophozoite stage parasites were maintained in 100 ml amounts in tissue culture flasks (150 cm²; TPP) and incubated for 4 h in the presence of 0.1 or 0.3 μM cercosporin, corresponding to concentrations of approximately 0.08- and 0.3-fold the IC₅₀ value respectively. Subsequently, the parasites were isolated by saponin and resuspended in TRIzol® (Invitrogen) for RNA extraction according to the manufacturer's instructions and as carried out previously [6]. A 25 μg amount of RNA was analysed by Northern blotting using radiolabelled

pdx1 or *pdx2* probes. For quantification of the transcript signal, intensities from areas of identical sizes were compared using the software ImageJ 1.34s (NIH; <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Cloning of the pARL1a⁻-Bsd and MOCK plasmids

To obtain transgenic parasites with resistance to a second selection drug, the hDHFR (human dihydrofolate reductase) cassette of the pARL1a⁻ vector [27], leading to WR99210 resistance of transgenic parasites, was exchanged with the ORF (open reading frame) of the *Bsd* (blasticidin S deaminase) gene. Therefore the *Bsd* gene was amplified by PCR using the specific oligonucleotides Blasticidin-BamHI-S (sense) (5'-gcgcgatccATGCATAAGCCTTTGTCTCAAG-3') and Blasticidin-SacI-AS (antisense) (5'-gcgcgagctcTTATTAGCCCTCCCACACATAACC-3') and cloned into pARL1a⁻ using BamHI and SacI restriction enzymes (sequences in bold). Expression of parts of the remaining hDHFR due to incomplete elimination of the C-terminal region of hDHFR was prevented by the addition of two stop codons (underlined) at the 3'-end of the Blasticidin-SacI-AS oligonucleotide. Integrity of the sequence was proved by automatic sequencing (MWG Operon) and the vector was used for cloning of the pARL-*PfPdx2*-Myc-Bsd transfection construct.

To investigate the influence of the applied selection drugs on the growth of transgenic parasites, MOCK plasmids were generated for the transfection into *P. falciparum* 3D7. For MOCK-WR, we used a version of the pARL1a⁺ vector which has no GFP (green fluorescent protein) sequence included, so that transfection of the parasites leads to resistance of the cells against WR99210, whereas no protein is overexpressed. For generating a vector with resistance against blasticidin S, the *Bsd* gene was amplified by PCR, again using the specific oligonucleotides Blasticidin-BamHI-S and Blasticidin-SacI-AS as well as the template pCMV-Bsd (Invitrogen). This time, the PCR product was cloned into the GFP-free vector pARL1a⁺ [27], using the restriction enzymes BamHI and SacI.

Generation of transgenic *P. falciparum* cell lines

To overexpress the plasmodial PLP-synthesis enzymes *PfPdx1* and *PfPdx2* in the parasitic Strep- or Myc-fusion proteins, four different constructs were generated. The *pdx1* ORF was fused to a C-terminal Strep tag, whereas the *pdx2* ORF was cloned with the addition of a C-terminal Myc tag. The ORFs of both genes were amplified by PCR from the expression constructs *PfPdx1*-IBA3 and *PfPdx2*-IBA3 or *PfPdx1*-K83A-IBA3 and *PfPdx2*-E53Y-IBA3 [6,8] using High Fidelity Enzyme Mix (Fermentas) and the specific oligonucleotides *PfPdx1*-pARL-Kpn-S (sense) (5'-gagaggtaccATGGAAAATCATAAAGATGATGC-3') and IBA3-Strep-Avr-AS (antisense) (5'-gagacctaggTTATTATTTTTTCGA-ACTGCGGG-3') for the *PfPdx1*-Strep fusion protein and *PfPdx2*-pARL-Kpn-S (5'-gcgcggtaccATGTCAGAAATAACTA-TAGGGG-3') and *PfPdx2*-Myc-Avr-AS (5'-gagacctaggTTAT-TATAAATCTTCTCTGATATTAATTTTTTGTCTGAATAT-TGTAATTTTTAACC-3') for the *PfPdx2*-Myc chimaera to obtain 942 or 696 bp fragments respectively. Subsequently, the *pdx1* and *pdx1*K83A fragments were cloned into the pARL1a⁻ vector [27] using the restriction enzymes KpnI and AvrII (bold), resulting in the constructs pARL-*PfPdx1*-Strep-WR and pARL-*PfPdx1*K83A-Strep-WR. The vector contains the hDHFR cassette, leading to resistance of the transgenic parasites against the selection drug WR99210. The PCR products for *pdx2* and *pdx2*E53Y, however, were cloned into the vector pARL1a⁻-Bsd, again using KpnI and AvrII restriction sites. Transfection

of the resulting constructs pARL-*PfPdx2*-Myc-Bsd or pARL-*PfPdx2*-E53Y-Myc-Bsd leads to Bsd resistance of the transgenic parasites. To suppress translation of GFP, which is automatically fused to the proteins by cloning via the *AvrII* restriction site into the pARL1a⁻ vector, two stop codons (underlined) were introduced into the 3' end of the respective antisense primer sequence. The integrity of all constructs was confirmed by automated sequencing (MWG Operon) and the plasmid DNA for transfection was generated using a Maxi Prep Kit (Qiagen).

In all cases, transfection of circular plasmid DNA was carried out using the method described in [28–30], with the modification of using 1 µg/µl Bsd (Sigma) to select for Bsd-resistant parasites. To generate co-transfectants, either schizonts of the transgenic parasite line *PfPdx1*-Strep were used to infect pARL-*PfPdx2*-Myc-Bsd-pre-loaded erythrocytes or *PfPdx1*-Strep ring-stage parasites were electroporated directly with the pARL-*PfPdx2*-Myc-Bsd plasmid DNA as described above. The mutant co-transgenic lines as well as the double-MOCK cells were generated in the same way. To obtain co-transgenic parasites, both selection drugs, i.e. WR99210 and Bsd, were applied to the culture medium the next day at concentrations of 5 nM and 1 µg/µl respectively.

Measuring the PLP levels in the parasite

To determine the amount of PLP in *Plasmodium*, cells were synchronized with 5% sorbitol. Trophozoites of 3D7 WT and the transgenic cell line *PfPdx1*-Strep/*PfPdx2*-Myc were isolated from the host cell by saponin lysis as described above [26] and washed carefully in saline buffer using the method described in [31]. The cell number was determined using a Neubauer chamber (haemocytometer). Metabolites of 1.54×10^9 cells (WT) and 1.78×10^9 cells (*PfPdx1*-Strep/*PfPdx2*-Myc) were extracted with perchloric acid and the supernatants (each double) were subjected to HPLC analysis performed by Labor Dr Fenner. PLP standard was eluted at 2.3 min retention time with 2.6 mV (70 µg/l). The amount of PLP was calculated using a volume of 28 fl per trophozoite as detailed in [31].

Detection of ¹O₂ formation in *P. falciparum*

The cell-permeant fluorescent dye APF was used to specifically determine ¹O₂ in living parasites. In the presence of ¹O₂ and OH• radicals, APF is converted into a fluorescent product and can therefore be used to visualize those molecules. To specifically investigate ¹O₂, DMSO can be used to quench OH• radicals as demonstrated previously [27]. To determine the amount of ¹O₂ in *P. falciparum*, the parasite culture was incubated with either 10 or 20 µM APF before fluorescence microscopy using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). In order to quench OH• radicals, 0.1 or 1% DMSO was added to the cell culture respectively before the addition of APF, not affecting the detection of ¹O₂ [24]. In order to visualize ¹O₂, the effect of 0.85 µM cercosporin on ¹O₂ production in the parasite was tested by incubating the cells for 1 h at 37°C. Images were taken at different exposure times ranging from 250 to 1000 ms to reduce and increase sensitivity respectively. The APF fluorescence was measured and quantified using Axioskop 2 plus software (Zeiss). Analysis of the double-transgenic cell lines MOCK-WR/MOCK-Bsd, as well as the mutant *PfPdx1*-K83A-Strep/*PfPdx2*-E53Y-Myc and the WT *PfPdx1*-Strep/*PfPdx2*-Myc were carried out as described above using a lower concentration of 80 nM cercosporin to detect significant differences in the ¹O₂ levels of WT and overexpressors. In order to compare the cell lines, maximum luminosity was measured in synchronous trophozoites at the constant exposure time of 250 ms using OpenLab software. Data analysis was

performed using a one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test using GraphPad Prism 4.0.

Western blot analyses of transgenic parasites

For Western blot analyses, highly synchronized 3D7 WT parasites (trophozoite stage), as well as the transgenic cell lines *PfPdx1*-Strep, *PfPdx2*-Myc and *PfPdx1*-Strep/*PfPdx2*-Myc were subjected to saponin lysis as detailed above to isolate the parasites from their host cells. The parasite pellets were kept at -20°C for protein extraction. 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 of protein (20 µg) were separated by SDS/PAGE (10% gels) and subsequently transferred on to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell). Expression of *PfPdx1*-Strep and *PfPdx2*-Myc proteins were analysed using either a monoclonal anti-Strep antibody (1:20 000 dilution; IBA) or a monoclonal anti-Myc antibody (1:2500 dilution; Zymed) and a secondary HRP (horseradish peroxidase)-coupled anti-mouse antibody (1:10 000 dilution; Invitrogen) respectively. The *PfPdx1* protein was additionally investigated by probing one membrane with polyclonal rat *PfPdx1* antisera (1:10 000 dilution; Eurogentec) and a secondary HRP-coupled anti-rat antibody (1:10 000 dilution; Jackson ImmunoResearch). The blots were stripped and re-probed with a polyclonal antibody against plasmodial TPK (thiamine pyrophosphokinase) (1:10 000 dilution; [32]) and a secondary HRP-coupled anti-rabbit antibody (1:10 000 dilution; Dianova). The detection was performed using ECL (enhanced chemiluminescence) (Millipore).

Co-purification of *PfPdx1*-Strep and *PfPdx2*-Myc from parasites

For co-purification of *PfPdx1*-Strep and *PfPdx2*-Myc proteins from plasmodia, a parasite culture of the co-transgenic cell line *PfPdx1*-Strep-WR/*PfPdx2*-Myc-Bsd containing mainly trophozoite and schizont stages was treated with saponin to isolate the parasites from their host cells. The parasite pellet was then resuspended in buffer W (100 mM Tris/HCl, pH 8.0, and 150 mM NaCl) and the suspension was repeatedly frozen in liquid nitrogen and thawed. After removing the cell debris by centrifugation at 6000 g for 30 min, the supernatant was incubated with 100 µl of 50% StrepTactin™ Sepharose under rotation for 45 min and washed once with buffer W, and the protein was eluted in buffer E (100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM desthiobiotin and 1 mM EDTA).

The eluate obtained was concentrated and subjected to Western blot analysis as described above for the transgenic cell lines. The nitrocellulose membrane was probed first with a monoclonal anti-Strep antibody (1:20 000 dilution) and a secondary monoclonal HRP-conjugated anti-mouse antibody (1:10 000 dilution; Invitrogen), stripped and re-probed with the monoclonal anti-Myc antibody (1:2500 dilution; Zymed) and again the secondary monoclonal HRP-conjugated anti-mouse antibody.

Growth assays of transgenic cell lines

To analyse the long-term effect of cercosporin on WT parasites as well as the *PfPdx1*-Strep- and/or *PfPdx2*-Myc- and *PfPdx1*-K83A-Strep- and/or *PfPdx2*-E53Y-Myc-overexpressing transgenic *P. falciparum* parasites, the growth of asynchronous parasite cultures with starting parasitaemia of 2–3% was monitored for several days by light microscopy of Giemsa-stained thin smears in the presence of the respective selection drug and 80 or 10 nM cercosporin respectively. As a

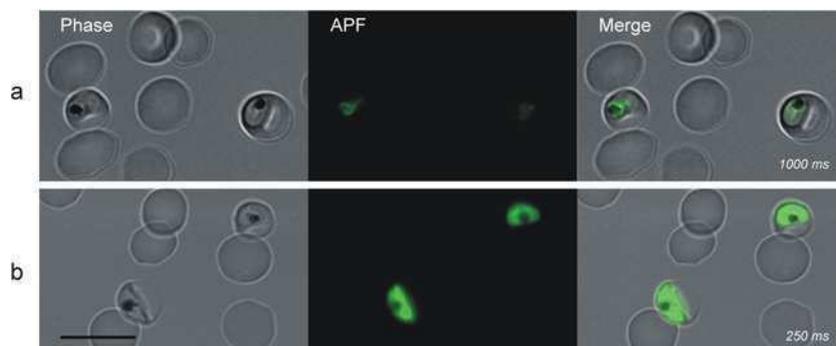


Figure 1 Detection of $^1\text{O}_2$ production in infected and uninfected erythrocytes using APF

Cultured plasmodial parasites were treated with $0.85 \mu\text{M}$ cercosporin for 1 h at 37°C . Untreated (a) and treated (b) infected erythrocytes were incubated with 0.1% DMSO to quench OH^\bullet radicals as described in [24] before $10 \mu\text{M}$ APF was added. Fluorescence was captured at different exposure times (250 and 1000 ms) as shown on the right. Scale bar, $10 \mu\text{m}$. E, erythrocyte; P, parasite. Phase, live images of *P. falciparum*-infected and uninfected erythrocytes; APF, image taken using the FITC channel; Merge, merging of both images.

control, each parasite line was grown under standard conditions in the presence of the selection drug, but without addition of cercosporin. Exchange of culture medium, selection drug and cercosporin was performed every day. Thin blood smears were taken daily, stained with Giemsa and the parasitaemia was determined as the percentage of infected erythrocytes measured in 1000 erythrocytes. Parasite cultures reaching a parasitaemia of 8–10% were diluted and cumulative parasitaemias were calculated by extrapolation from observed parasitaemias and the corresponding dilution factors that were employed at each subculturing step.

To determine the influence of cercosporin treatment on the growth of the parasites, parasitaemias of the treated cultures were normalized against untreated cultures and the resulting growth curves were analysed by Microsoft Excel and GraphPad Prism 4.0.

To enable a comparison of the growth behaviour of the different cell lines, proliferation rates of the parasites were calculated from exponential growth curves as described previously [30] using the equation $y = a \times \exp(Kx)$ and $0.69/K$, which results in theoretical doubling times of parasitaemia. Statistical analyses were performed employing an unpaired two-tailed Student's *t* test.

RESULTS

Monitoring $^1\text{O}_2$ stress on *P. falciparum* induced by cercosporin

The photosensitizing toxin cercosporin is generated by the plant pathogen *Cercospora*, causing severe cell damage to invaded host plants [33]. Although cercosporin is known to be a potent $^1\text{O}_2$ producer [34], a small amount of O_2^- is formed [35]. However, intensive analysis of this molecule clearly showed that the *in vivo* toxicity of cercosporin derives from $^1\text{O}_2$ [36,37]. APF, which is shown to be converted into a fluorescent product in the presence of $^1\text{O}_2$ and is cell-permeant in mammalian cells [24], was used to visualize specifically the synthesis of $^1\text{O}_2$ within the malaria parasite. Since APF is not limited to the reaction with $^1\text{O}_2$, but also detects OH^\bullet radicals [38], DMSO was used to quench the latter as described previously [24]. As indicated in Figure 1, in the presence of $0.85 \mu\text{M}$ cercosporin (Figure 1b), the fluorescent signal of APF is strongly enhanced compared with the untreated control (Figure 1a), whereas no fluorescence is visualized under similar conditions in non-infected erythrocytes. The parasites were treated with 0.1% DMSO to ascribe the fluorescence solely to $^1\text{O}_2$ in *P. falciparum*. Upon cercosporin treatment, APF fluorescence is strongly induced, confirming the potency of cercosporin in $^1\text{O}_2$ generation (Figure 1).

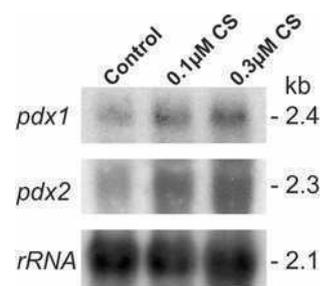


Figure 2 Northern blot analysis of *pdx1* and *pdx2* following cercosporin treatment of WT parasites

P. falciparum 3D7 was incubated for 4 h without cercosporin as a control and in the presence of 100 nM ($0.1 \mu\text{M}$ CS) and 300 nM ($0.3 \mu\text{M}$ CS) cercosporin respectively. Subsequently, RNA was isolated and analysed by Northern blotting. The membrane was hybridized with specific radiolabelled *pdx1* or *pdx2* probes, showing increasing amounts of RNA for *pdx1* as well as *pdx2* consistent with increasing concentrations of cercosporin. For quantification, signal intensities were analysed using ImageJ 1.34s software. A probe directed against 18S rRNA was used as loading control. Sizes of RNA standards are shown on the right in kb.

Vitamin B₆ biosynthesis is up-regulated as response to $^1\text{O}_2$ stress

In order to investigate the reaction of *P. falciparum* to increased levels of $^1\text{O}_2$, 3D7 WT parasites were treated with cercosporin and the IC_{50} value of cercosporin in malaria parasite cell culture was determined to be $0.85 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Northern blot analyses of the *pdx1* and *pdx2* transcripts after incubation of the parasites in the presence of 0.1 and $0.3 \mu\text{M}$ cercosporin, as shown in Figure 2, revealed an approximately 2–3-fold increased amount of RNA for both genes in treated parasites compared with the untreated control, as estimated by the signal intensity of identical areas using ImageJ 1.34s software. This increase is indicative of a transcriptional response to cercosporin.

PfPdx1 and *PfPdx2* are overexpressed in transgenic *P. falciparum* parasites

The fact that 3D7 WT parasites show an up-regulation of their vitamin B₆ biosynthesis as a reaction to increased amounts of $^1\text{O}_2$ allows us to propose that in *P. falciparum* vitamin B₆ acts as an antioxidant for the detoxification of these highly reactive and damaging molecules. Parasites which overexpress both biosynthesis enzymes Pdx1 and Pdx2 might be more tolerant against $^1\text{O}_2$ stress than WT parasites. 3D7 parasites were transfected with plasmids leading to episomal overexpression of

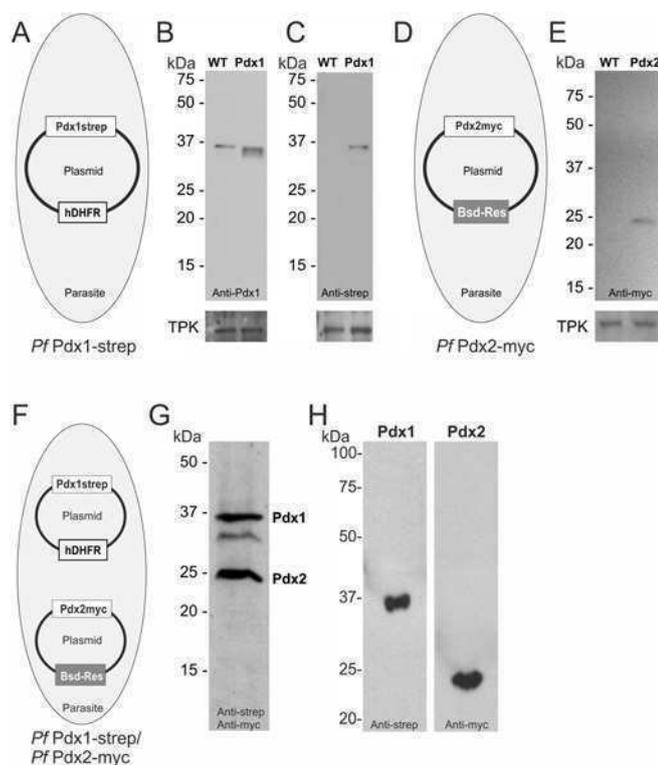


Figure 3 Western blot analyses of transgenic parasite lines overexpressing either *PfPdx1*–Strep or *PfPdx2*–Myc and the co-transgenic cell line *PfPdx1*–Strep/*PfPdx2*–Myc

Equal amounts of total protein extract of 3D7 WT and transgenic parasites were separated by SDS/PAGE and subsequently subjected to Western blot analysis. Schematic depictions of the transgenic parasites (large oval) carrying plasmids for episomal overexpression of either *PfPdx1*–Strep (A) or/and *PfPdx2*–Myc (D and F) (bold circles) are shown on left of the corresponding Western blot membranes. A protein extract of parasites overexpressing *PfPdx1* was analysed using a polyclonal anti-*PfPdx1* antibody, which detects the native untagged and the episomally overexpressed Strep-tagged *PfPdx1* proteins (B) or a monoclonal anti-Strep antibody (C), showing only overexpressed Strep-tagged protein. Respective analyses were performed for the cell line *PfPdx2*–Myc (D and E), using a monoclonal anti-Myc antibody (E), clearly detecting the overexpressed Myc-tagged protein. A protein extract of the co-transgenic cell line *PfPdx1*–Strep/*PfPdx2*–Myc (F) was analysed using monoclonal anti-Strep and anti-Myc antibodies (G). Polyclonal antibodies directed against the plasmodial TPK [32] was used as loading control. The cell extract of the co-transgenic parasite line *PfPdx1*–Strep/*PfPdx2*–Myc (F) was also used to perform co-purification experiments. Episomally overexpressed *PfPdx1* was purified via StrepTactin™ Sepharose and the eluate was subjected to Western blot analyses (H). The membrane was probed with a monoclonal anti-Strep antibody (H, left), stripped and re-probed with a monoclonal anti-Myc antibody, detecting episomally overexpressed Myc-tagged *PfPdx2* protein (H, right). Sizes of the molecular mass standards are indicated in kDa.

the tagged proteins. Schematic views of the respective transgenic parasites are shown in Figures 3(A), 3(D) and 3(F). To determine the presence of the overexpressed proteins, Western blot analyses were performed using antibodies against the respective fusion tag. Figures 3(B) and 3(C) show the *PfPdx1* protein, detected with a polyclonal anti-*PfPdx1* antibody which shows native *PfPdx1* in the WT parasite extract as well as native and Strep-tagged proteins in extract derived from transgenic parasites (Figure 3B). Using an anti-Strep antibody, only the episomally overexpressed Strep-fusion protein in the transgenic parasites is detected (Figure 3C). Subsequently, the effect of the overexpression of the Strep-tagged *PfPdx1* in the transgenic parasites was investigated. The proliferation rate of the cell line *PfPdx1*–Strep was monitored for 144 h and compared with the transgenic parasites carrying a MOCK plasmid yielding resistance against the selection drug WR99210 (MOCK-WR), as well as WT parasites. The

Table 1 Calculated doubling times of transgenic and WT parasites

The proliferation of all cell lines was monitored for 144 h. *Plasmodium* proliferates within 48 h. To allow statistics on the growth behaviour, doubling times (h) were calculated from the monitored parasitaemia of the respective parasites employing exponential growth curves. The resulting values reflect the means with S.E.M. values calculated from at least three independent experiments. n.d., not determined; †no doubling time calculated owing to a reduced survival rate of the parasites. Significance was analysed applying a two-tailed unpaired Student's *t* test on the means of the doubling times compared with the ones of the respective MOCK parasite line. MOCK is compared with WT and treated cells with untreated (***P* < 0.005).

Parasite line	Doubling time (h)		
	Growth assay	Stress assay	
		Untreated	80 nM cercosporin-treated
3D7 WT	18.8 ± 0.3	†	n.d.
MOCK-WR	19.4 ± 0.2	n.d.	n.d.
MOCK-Bsd	22.7 ± 0.5 (**)	n.d.	n.d.
MOCK-WR/MOCK-Bsd	18.5 ± 0.4	n.d.	n.d.
<i>PfPdx1</i> –Strep	19.3 ± 1.1	†	n.d.
<i>PfPdx2</i> –Myc	24.0 ± 0.9	†	n.d.
<i>PfPdx1</i> –Strep/ <i>PfPdx2</i> –Myc	21.5 ± 1.2	23.9 ± 1.1	n.d.
<i>PfPdx1</i> –K83A–Strep	19.1 ± 0.5	†	20.1 ± 0.6
<i>PfPdx2</i> –E53Y–Myc	25.3 ± 3.4	†	26.9 ± 3.8
<i>PfPdx1</i> –K83A–Strep/ <i>PfPdx2</i> –E53Y–Myc	19.1 ± 0.6	†	†

proliferation rates of these parasites (representing theoretical doubling times of parasitaemia) were determined to be 19.3, 19.4 and 18.8 h respectively, showing no significant aberration in proliferation due to the overexpression of *PfPdx1* or to the selection drug WR99210.

The *PfPdx2* enzyme is overexpressed as a Myc-fusion protein and was visualized by Western blotting using a monoclonal anti-Myc antibody (Figure 3E). A single band of 25 kDa is only present in the extract of transgenic parasites, representing the overexpressed *PfPdx2*–Myc protein (Figure 3E).

The proliferation rate for the transgenic *PfPdx2*–Myc-Bsd parasites was determined to be 24.0 h, which is in the same range as the doubling time of 22.7 h calculated for the corresponding Bsd-resistant MOCK-Bsd cell line. The slightly, but significantly, elevated proliferation rates are hence due to the Bsd selection drug (Table 1). Thus the overexpression of *PfPdx2* does not affect parasite proliferation.

Respective analyses were performed with the extract of the co-transgenic cell line *PfPdx1*–Strep/*PfPdx2*–Myc, overexpressing *PfPdx1*–Strep and *PfPdx2*–Myc proteins. The blot was probed with the monoclonal anti-Strep and anti-Myc antibodies and bands were detected in the size of 35 and 25 kDa, representing the episomally overexpressed *PfPdx1*–Strep and *PfPdx2*–Myc proteins respectively (Figure 3G).

Again, the growth of the parasites was monitored, showing a proliferation rate of 21.5 h, which resembles the proliferation rates calculated for the other cell lines, but slightly differs from the appropriate co-transgenic control cell line, MOCK-WR/MOCK-Bsd with its corresponding proliferation rate of 18.5 h.

In conclusion, the overexpression of either of the individual proteins alone or *PfPdx1* and *PfPdx2* simultaneously had no impact on the proliferation rate of the parasites.

In vivo interaction of *PfPdx1* and *PfPdx2*

Only in the last decade have crystal structures of the PLP synthase complexes of *Thermotoga maritima* and *Bacillus subtilis* been solved and an interaction of Pdx1 and Pdx2 was shown at the biochemical level [6,8]. However, all of these analyses were

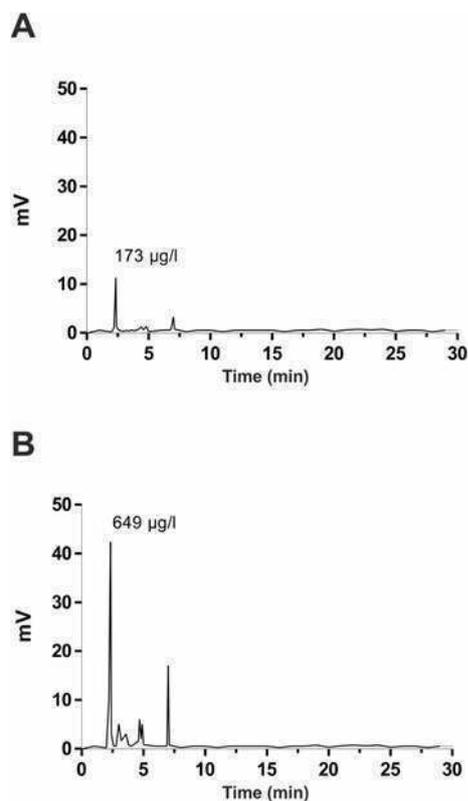


Figure 4 HPLC traces of PLP content in WT and *PfPdx1*–*Strep/PfPdx2*–*Myc*-overexpressing cells

Cultured parasites were isolated by saponin, and extracts were subjected to HPLC analysis. PLP standard elutes at 2.3 min, with 2.6 mV corresponding to 70 µg/l. (A) Extract of 1.54×10^9 WT parasites reveal a PLP peak of 11.26 mV (173 µg/l) and (B) extract of 1.78×10^9 *PfPdx1*–*Strep/PfPdx2*–*Myc* overexpressors show a PLP peak of 42.23 mV (649 µg/l). Results are representative of two independent experiments.

performed *in vitro* with recombinantly expressed proteins derived from bacterial expression systems. To investigate whether the plasmodial vitamin B₆ biosynthesis enzymes *PfPdx1* and *PfPdx2* interact *in vivo*, the co-transgenic cell line *PfPdx1*–*Strep/PfPdx2*–*Myc* was analysed by pull-down experiments using StrepTactin™ Sepharose for the affinity purification. As shown by Western blot analysis (Figure 3H), the *PfPdx1* and *PfPdx2* proteins were co-purified from parasite lysate and thus an *in vivo* interaction of *PfPdx1* and *PfPdx2* in the malaria parasite *P. falciparum* was demonstrated for the first time.

Co-overexpression of *PfPdx1* and *PfPdx2* results in increased PLP levels

Since both enzymes, i.e. *PfPdx1* and *PfPdx2*, participate in the direct formation of the active B₆ vitamers (PLP), co-overexpression of active proteins should result in an increased PLP level in the transgenic parasites. Therefore the absolute amount of PLP was analysed by HPLC in 3D7 WT (Figure 4A) and co-transgenic *PfPdx1*–*Strep/PfPdx2*–*Myc* trophozoite-stage parasites (Figure 4B). The amount of PLP per trophozoite was calculated according to the parasite's volume of 28 fl as determined by Saliba et al. [31]. Whereas WT 3D7 parasites contain 12.5 µM PLP, the concentration in the co-overexpressing *PfPdx1*–*Strep/PfPdx2*–*Myc* cell line is found to be approximately three times higher at 36.6 µM.

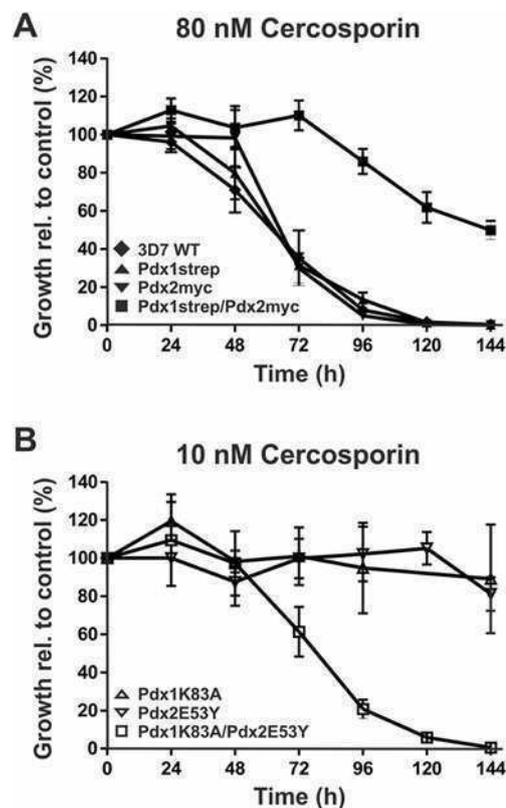


Figure 5 Effect of cercosporin on the growth of transgenic *P. falciparum* parasites expressing *PfPdx1* and *PfPdx2* WT and mutant proteins

(A) 3D7 as well as *PfPdx1* and *PfPdx2* WT-overexpressing parasites were cultured in the presence of 80 nM cercosporin and monitored for 144 h. The parasitaemia (% of infected erythrocytes measured in 1000 erythrocytes) was calculated relative to the respective untreated control cells. Results are means \pm S.D. for at least four independent experiments. (B) Effect of 10 nM cercosporin treatment on cells overexpressing either *PfPdx1*-K83A or *PfPdx2*-E53A mutant protein separately or as a co-expression. The growth was monitored under the conditions described above.

Expression of *PfPdx1* and *PfPdx2* leads to higher tolerance of the transgenic parasites towards cercosporin

The transgenic parasites described above were used to investigate the long-term effect of ¹O₂ stress on *P. falciparum*. To increase the levels of ¹O₂, the parasites were treated with cercosporin. As shown in Figure 5(A), cultivation of 3D7 WT in the presence of 80 nM cercosporin for 144 h kills the parasites. The first effect of the treatment was observed after 48 h, where the growth of progeny of these cells starts to decrease compared with untreated parasites, with the most significant decrease in parasitaemia during cercosporin treatment occurring between 96 and 120 h. After 144 h, all of the parasites were dead. The same effect of cercosporin supplementation was observed in the cell lines *PfPdx1*–*Strep* and *PfPdx2*–*Myc*. The growth characteristics of the *PfPdx1*–*Strep*-overexpressing parasites in the presence of cercosporin were comparable with treated WT cells, with the highest decrease in growth between 96 and 120 h and almost no detectable surviving parasites after 144 h. The *PfPdx2*–*Myc*-overexpressing parasites reacted even faster to the application of cercosporin. In this case, the growth relative to the growth of untreated parasites started to decrease after 72 h and ended with the death of the parasites after 120 h, whereas the untreated parasites follow exponential growth.

A different pattern arises when the co-transgenic cell line *PfPdx1*–*Strep/PfPdx2*–*Myc* is cultivated in the presence of

cercosporin. The first effects of the treatment are seen after 96 h, where the growth of the parasites starts to decrease slightly compared with the untreated control. At the end of the observation period at 144 h, 50% of the parasites are still alive, whereas all other parasite lines were already dead 120 h after the first cercosporin application. The doubling times of the co-transgenic parasites under stress conditions were determined to be 23.9 h, which shows no significant difference in proliferation compared with untreated parasites (Table 1).

Inactivating the enzymatic activities by the dominant-negative effect of the expression of the mutated proteins *PfPdx1-K83A* and *PfPdx2-E53Y*

The *PfPdx1-K83A* and *PfPdx2-E53Y* mutants have been characterized biochemically and found to be catalytically inactive, whereas their ability to form the PLP synthase complex was unaffected [8]. To evaluate the importance of the plasmodial vitamin B₆ biosynthesis in reducing ¹O₂ stress, mutated versions of both *PfPdx1* and *PfPdx2* were overexpressed in the parasite in a dominant-negative approach. The presence of the mutant proteins was confirmed by Western blot analysis of parasite extract, using monoclonal anti-Strep and anti-Myc antibodies (Figures 3B, 3E and 3H). Monitoring the growth rate of the transgenic parasites *PfPdx1-K83A-Strep*, *PfPdx2-E53Y-Myc* and the co-transgenic line *PfPdx1-K83A-Strep/PfPdx2-E53Y-Myc* (schematic depictions in Figure 3A, 3D and 3G) revealed no significant alteration of the parasites' proliferation (Table 1). However, in the presence of 80 nM cercosporin, these parasites died after 144 h.

In contrast, the presence of 10 nM cercosporin in the culture medium did not affect the growth of either the *PfPdx1-K83A-Strep* or the *PfPdx2-E53Y-Myc* cell line compared with the untreated cells (Figure 5B), but simultaneous expression of both mutant proteins *PfPdx1-K83A* and *PfPdx2-E53Y* killed the parasites even at a concentration of 10 nM cercosporin. Thus the overexpression of the mutant proteins did not sustain the protective effect as shown for the WT co-transgenic parasites. The parasitaemia started to decrease after 72 h and ended with the death of the parasites after 144 h, whereas the parasitaemia of the untreated *PfPdx1-K83A-Strep/PfPdx2-E53Y-Myc* parasite line doubled in 19.1 h, which is not significantly altered (Table 1).

The anti-proliferative effect of cercosporin is directly linked to ¹O₂ in the parasite

In order to analyse *in vivo* the direct involvement of the PLP synthase in ¹O₂ detoxification, the content of ¹O₂ in the co-transgenic parasite line *PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc* and the mutant line *PfPdx1-K83A-Strep/PfPdx2-E53Y-Myc* was visualized with APF fluorescence and the luminescence intensity [expressed as au (arbitrary units) of luminosity] was measured in the presence of 80 nM cercosporin (Figure 6). Following statistical analyses, it is evident that significantly ($P < 0.01$) more ¹O₂ is present after cercosporin treatment in the mutant *PfPdx1-K83A-Strep/PfPdx2-E53Y-Myc* cell line (median luminosity of 2736 au) than in the MOCK cell line (median luminosity of 2200 au), whereas a protective effect against ¹O₂ can be observed in the WT *PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc*-overexpressing parasites (median luminosity of 1383 au), which show significantly lower ¹O₂ levels (Figure 6).

DISCUSSION

Vitamin B₆ is a cofactor required by more than 140 PLP-dependent enzymes [1], many of them crucial to maintain a functional cell metabolism. Vitamin B₆ has been shown to possess a high antioxidative potential in detoxifying ¹O₂ [39]. The human

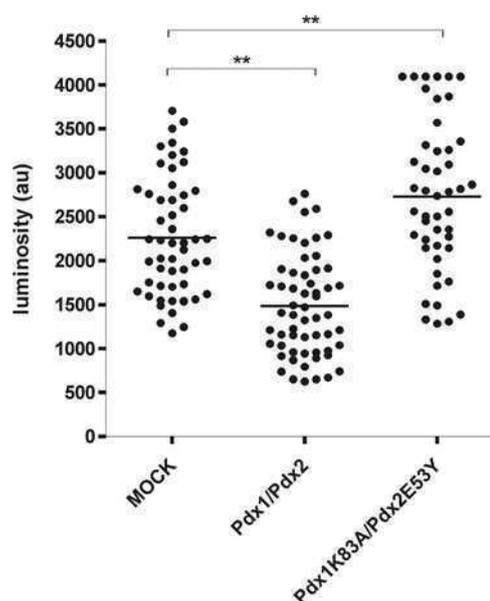


Figure 6 Effect of cercosporin on the ¹O₂ content of double-transgenic *P. falciparum* cells

The co-transgenic cell lines MOCK-WR/MOCK-Bsd (MOCK), *PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc* (*Pdx1/Pdx2*) and *PfPdx1-K83A-Strep/PfPdx2-E53Y-Myc* (*Pdx1K83A/Pdx2E53Y*) were exposed to 80 nM cercosporin before adding 1% DMSO and 20 μ M APF to visualize ¹O₂ in the parasites. The luminosity of single parasites (shown as scattered plot) was analysed using OpenLab software and deployed to column statistics using a one-way ANOVA to evaluate the significance. ** $P < 0.01$.

malaria parasite *P. falciparum* depends on the digestion of host haemoglobin as the main source of amino acids during its asexual life cycle in the erythrocyte. While degrading haemoglobin, the parasite faces severe problems. Digesting the globin results in the accumulation of toxic haem, which the parasite detoxifies by its polymerization into the non-toxic haemozoin (malaria pigment), a mechanism which has been studied extensively over the last decade [40,41]. However, during this feeding process, high amounts of ROS are also generated, which need to be quenched [42]. The malaria parasite possesses a number of antioxidants, such as vitamins C and E or glutathione.

Furthermore, several proteins, such as superoxide dismutase, thioredoxin and plasmodoxin, are expressed in the parasite to fight ROS (reviewed in [21]). However, all of these systems were described to detoxify H₂O₂ and O₂⁻, the primary ROS generated during haemoglobin digestion, disregarding the fact that those molecules are highly reactive and disintegrate further if not detoxified immediately. One of the molecules arising is ¹O₂, originating from O₂⁻ breakdown following the Haber-Weiss reaction [19]. For the first time, we have demonstrated in the present study the presence of native ¹O₂ in the malaria parasite, which was achieved by *in vivo* visualization of APF fluorescence when it interacts with ¹O₂. Native ¹O₂ is detectable in the parasite, but not in erythrocytes (Figure 1), indicating that ¹O₂ formation occurs solely during parasitism of erythrocytes by *P. falciparum*. The origin of these ¹O₂ molecules is probably the digestion of host haemoglobin. ¹O₂ leads to profound cell damage, stressing the necessity of a potent protection mechanism. However, none of the antioxidative systems described so far, except of vitamin E and carotenoids, which are lipid-soluble and therefore localized to cell membranes [22], have been described to detoxify ¹O₂ [43].

Previously, the presence of the plasmodial *pdx1* and *pdx2* transcripts were analysed within the erythrocytic cycle of the malaria parasite by Northern blot experiments [6] and revealed a

prevalence in the ring and trophozoite stages, which is in agreement with the microarray data performed by Bozdech et al. [44].

In order to investigate an involvement of the plasmodial vitamin B₆ biosynthesis in combating oxidative stress resulting from ¹O₂, we used cercosporin, an ¹O₂ producer described by Daub and Hangarter [35]. Upon treatment with cercosporin, the level of ¹O₂ increases drastically compared with non-treated cells (Figure 1). Furthermore, the transcription levels of the vitamin B₆ biosynthesis genes *pdx1* and *pdx2* were analysed by Northern blotting and found to be up-regulated as result of cercosporin treatment, which clearly indicates an involvement of the two proteins in ROS defence. Transcription levels were increased approximately 2–3-fold in comparison with the untreated control, which could be expected, as it was shown in tobacco and fungi that the vitamin B₆ levels in the cells are tightly regulated. The individual overexpression of *pdx1* or *pdx2* in fungi leads in most of the generated clones to a down-regulation of the native genes and did not result in higher amounts of vitamin B₆ within cells, assuming that high levels of vitamin B₆ might have a negative effect on the cells [45]. However, it has been reported that *C. nicotinae*, which utilizes cercosporin to penetrate its host cells, reveals an elevated level of the Pdx1 enzyme to protect itself against the highly destructive effects of ¹O₂. Additionally, it was shown that cercosporin-sensitive mutant strains can be rescued by complementation with the *pdx1* gene of *Phaseolus vulgaris* [46]. Similar results were observed with a *pdx1* (*snz1*)-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain which could be complemented with the *pdx1* gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (*Gintpdx1*) [47]. It has been shown that vitamin B₆-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* are highly sensitive against high light and photo-oxidative stress due to the formation of ¹O₂ and the resulting severe lipid peroxidation [48]. This again underlines the indispensability of vitamin B₆ as an antioxidant. To determine a potentially protective effect of vitamin B₆ against increased amounts of ¹O₂ in the human malaria parasite *P. falciparum*, transgenic parasite strains were generated overexpressing either *PfPdx1* or *PfPdx2* separately or a co-transgenic cell line expressing both *PfPdx1* and *PfPdx2*. Long-term exposure of the transgenic and WT parasites to cercosporin led to the death of WT parasites as well as the single overexpressors *PfPdx1*-Strep and *PfPdx2*-Myc. However, the co-transgenic cell line *PfPdx1*-Strep/*PfPdx2*-Myc, which simultaneously overexpresses *PfPdx1* and *PfPdx2*, was not affected by the treatment.

The overexpression of the PLP synthase enzymes *PfPdx1* and *PfPdx2* in *P. falciparum* results in higher levels of vitamin B₆ of 36.6 μM compared with 12.5 μM in 3D7 WT cells, which is corroborated by the fact that ¹O₂ is reduced in those parasites. This elevated level enables the protective effect against ¹O₂ in the present study. Previous reports of recombinantly expressed Pdx1 and Pdx2 enzymes revealed that both enzymes interact by forming a complex consisting of 12 Pdx1 and 12 Pdx2 proteins *in vitro* [6,8,9]. Additionally, biochemical analyses showed that a 1:1 ratio of both proteins is required for maximum activity of the PLP synthase complex *in vitro* [6,49]. By performing pull-down experiments using the transgenic *PfPdx1*-Strep-WR/*PfPdx2*-Myc-Bsd parasites, an *in vivo* interaction of the *PfPdx1* and *PfPdx2* enzymes was observed for the first time. The fact that only the co-transgenic parasites were protected from the destructive effects of ¹O₂ (Figure 5A) shows that increased amounts of both enzymes are needed to provide higher amounts of PLP in the cell. In contrast, overexpression of the single enzymes *PfPdx1* or *PfPdx2* does not rescue ¹O₂-treated parasites.

Since all attempts to apply reverse genetics to knock out the two genes encoding the PLP synthase failed and the tools to generate conditional knockdowns are not applicable in the malaria parasite

[8], we applied a transgenic approach using protein interference by overexpressing inactive *PfPdx1* and *PfPdx2* mutant proteins. The selected mutant proteins *PfPdx1*K83A and *PfPdx2*E53Y were already determined to be catalytically inactive, hence preventing the *de novo* synthesis of PLP, but did not change the binding capabilities of the two proteins, so that the overall structure of the PLP synthase complex is still unaffected [8]. Interestingly, expressing the individual mutated *PfPdx1* and *PfPdx2* proteins in the parasite did not lead to ¹O₂-susceptible stains; however, the co-transgenic parasite line *PfPdx1*-K83A-Strep/*PfPdx2*-E53Y-Myc is highly sensitive to cercosporin (Figure 5B) and shows higher levels of ¹O₂ in the parasites than in control parasites (Figure 6). This dominant-negative effect is likely to be caused by the presence of inactive mutant proteins in the parasite, which are incorporated in the endogenous PLP synthase complex and alter its ability to provide sufficient levels of PLP. Overexpression of only one inactive component, either *PfPdx1*-K83A or *PfPdx2*-E53Y, however, does not have this drastic consequence for the parasite, and PLP levels can still be kept high enough to cope with ¹O₂ stress.

In conclusion, our results clearly demonstrate an important role of the endogenous vitamin B₆ biosynthesis in the detoxification of ¹O₂ in *P. falciparum*. Aside from the need for PLP as an essential cofactor, it enables the parasite to deal with highly destructive ¹O₂ molecules deriving from the digestion of haemoglobin, the main source of amino acids for the parasite during schizogony in human erythrocytes, but also from the attacks of the immune systems of the respective human or mosquito host [50].

These two biological important functions of the vitamin B₆-biosynthesis enzymes might also explain why all efforts to generate Pdx1- or Pdx2-knockout cell lines have failed so far, leading to the assumption that the genes are essential for the parasite, as has been shown for *A. thaliana* as well as *M. tuberculosis* [5,7]. Furthermore, by means of overexpression of two catalytically inactive PLP synthase proteins, we have shown for the first time a phenotypic effect in the malaria parasite *P. falciparum* that is manifested as a defect in the protection against ¹O₂.

The vitamin B₆ metabolism has already been exploited as drug target by intracellular activation of pro-drugs leading to artificial B₆ molecules which inhibit PLP-dependent enzymes [30]. Dual usage of vitamin B₆, as cofactor and ROS defence, substantiates the potency and druggability of the enzymes involved in PLP biosynthesis. The fact that the same vitamin B₆-biosynthesis pathway as in *P. falciparum* is also present in other prominent human pathogens, e.g. *M. tuberculosis* and *T. gondii*, carries the chance that drugs targeting this pathway could be used to fight a broad range of disease agents, including the opportunity to treat co-infections with different pathogens with a single drug. Lacking vitamin B₆ biosynthesis and the corresponding enzymes, the human host would probably be unaffected by those substances and the risk of side effects owing to an interference of the drug with the human metabolism would be significantly decreased.

AUTHOR CONTRIBUTION

Experiments were performed by Julia Knöckel, Ingrid Müller, Sabine Butzloff, Bärbel Bergmann and Carsten Wrenger. Results were analysed by Julia Knöckel, Ingrid Müller, Sabine Butzloff, Rolf Walter and Carsten Wrenger. The paper was written by Julia Knöckel, Ingrid Müller and Carsten Wrenger.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie-Luise Eschbach for technical assistance. Additionally, we thank Matthew R. Groves (European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Germany) and Louis H. Miller and Margery Sullivan (Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) for corrections to the paper and helpful comments before submission. WR 99210 was a gift from Jacobus Pharmaceutical Company, Princeton, NJ, U.S.A.

FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) [grant numbers WA 395/15 (to R.D.W.) and WR 124/2 (to C.W.)] as well as the German Academic Exchange Service (DAAD). C.W. is a 'Jovem Pesquisador' of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant number 2009/54325-2].

REFERENCES

- Percudani, R. and 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., di Salvo, M. L., Borri-Voltattorni, C., Bossa, F. and Mozzarelli, A. (2007) Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1291–1324
- Ehrenshaft, M., Bilski, P., Li, M. Y., Chignell, C. F. and Daub, M. E. (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B₆ biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9374–9378
- Knöckel, J., Müller, I. B., Bergmann, B., Walter, R. D. and Wrenger, C. (2007) The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate *de novo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **152**, 108–111
- Tambasco-Studart, M., Titz, O., Raschle, T., Forster, G., Amrhein, N. and Fitzpatrick, T. B. (2005) Vitamin B₆ biosynthesis in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13687–13692
- Wrenger, C., Eschbach, M. L., Müller, I. B., Warnecke, D. and Walter, R. D. (2005) Analysis of the vitamin B₆ biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **280**, 5242–5248
- Dick, T., Manjunatha, U., Kappes, B. and Gengenbacher, M. (2010) Vitamin B₆ biosynthesis is essential for survival and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **78**, 980–988
- Müller, I. B., Knöckel, J., Groves, M. R., Jordanova, R., Ealick, S. E., Walter, R. D. and Wrenger, C. (2008) The assembly of the plasmodial PLP synthase complex follows a defined course. *PLoS ONE* **3**, e1815
- Zein, F., Zhang, Y., Kang, Y. N., Burns, K., Begley, T. P. and Ealick, S. E. (2006) Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **45**, 14609–14620
- Stocker, P., Lesgards, J. F., Vidal, N., Chalier, F. and Prost, M. (2003) ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochim. Biophys. Acta* **1621**, 1–8
- Ehrenshaft, M., Chung, K. R., Jenns, A. E. and Daub, M. E. (1999) Functional characterization of *SOR1*, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotianae*. *Curr. Genet.* **34**, 478–485
- Mabxain, J. M., Ristilä, M., Strid, A. and Eriksson, L. A. (2006) Theoretical study of the antioxidant properties of pyridoxine. *J. Phys. Chem. A* **110**, 13068–13072
- Ohta, B. K. and Foote, C. S. (2002) Characterization of endoperoxide and hydroperoxide intermediates in the reaction of pyridoxine with singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12064–12065
- Kim, S. Y., Lee, S. M., Tak, J. K., Choi, K. S., Kwon, T. K. and Park, J. W. (2007) Regulation of singlet oxygen-induced apoptosis by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Mol. Cell. Biochem.* **302**, 27–34
- Guzik, T. J., Korbut, R. and Adamek-Guzik, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469–487
- Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C. and Schirmer, R. H. (2003) Glutathione: functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.* **384**, 551–566
- Lew, V. L., Macdonald, L., Ginsburg, H., Krugliak, M. and Tiffert, T. (2004) Excess haemoglobin digestion by malaria parasites: a strategy to prevent premature host cell lysis. *Blood Cells Mol. Dis.* **32**, 353–359
- Papalexis, V., Siomos, M. A., Campanale, N., Guo, X., Kocak, G., Foley, M. and 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
- Khan, A. U. and Kasha, M. (1994) Singlet molecular oxygen in the Haber–Weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12365–12367
- Naqui, A., Chance, B. and Cadenas, E. (1986) Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 137–166
- Müller, S. (2004) Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **53**, 1291–1305
- Wang, X. and Quinn, P. J. (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.* **38**, 309–336
- Daub, M. E., Herrero, S. and Chung, K. R. (2005) Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**, 197–206
- Price, M., Reiners, J. J., Santiago, A. M. and Kessel, D. (2009) Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **85**, 1177–1181
- Trager, W. and Jensen, J. B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673–675
- Das Gupta, R., Krause-Ihle, T., Bergmann, B., Müller, I. B., Khomutov, A. R., Müller, S., Walter, R. D. and Luersen, K. (2005) 3-Aminoxy-1-aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2857–2864
- Crabb, B. S., Rug, M., Gilberger, T. W., Thompson, J. K., Triglia, T., Maier, A. G. and Cowman, A. F. (2004) Transection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol. Biol.* **270**, 263–276
- Knöckel, J., Bergmann, B., Müller, I. B., Rathaur, S., Walter, R. D. and Wrenger, C. (2008) Filling the gap of intracellular dephosphorylation in the *Plasmodium falciparum* vitamin B₁ biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **157**, 241–243
- Müller, I. B., Knöckel, J., Eschbach, M. L., Bergmann, B., Walter, R. D. and Wrenger, C. (2010) Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. *Cell. Microbiol.* **12**, 677–691
- Müller, I. B., Wu, F., Bergmann, B., Knöckel, J., Walter, R. D., Gehring, H. and Wrenger, C. (2009) Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* **4**, e4406
- Saliba, K. J., Horner, H. A. and Kirk, K. (1998) Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **273**, 10190–10195
- Eschbach, M. L., Müller, I. B., Gilberger, T. W., Walter, R. D. and 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
- Daub, M. E., Jenns, A. E. and Ehrenshaft, M. (1995) Fungal resistance to photosensitizers that generate singlet oxygen. *ACS Symp. Ser.* **616**, 201–216
- Dobrowolski, D. C. and Foote, C. S. (1983) Cercosporin, a singlet oxygen generator. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22**, 720–721
- Daub, M. E. and 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. (1982) Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. *Plant Physiol.* **69**, 1361–1364
- Hughes, K. W., Negroto, D., Daub, M. E. and Meaussen, R. L. (1984) Free-radical stress response in paraquat-sensitive and resistant tobacco plants. *Environ. Exp. Bot.* **24**, 151–157
- Setsubinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J. and Nagano, T. (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* **278**, 3170–3175
- Mabxain, J. M., Ristilä, M., Strid, A. and Eriksson, L. A. (2007) Theoretical study of the reaction of vitamin B₆ with ¹O₂. *Chemistry* **13**, 4636–4642
- Egan, T. J. (2002) Physico-chemical aspects of hemozoin (malaria pigment) structure and formation. *J. Inorg. Biochem.* **91**, 19–26
- Goldberg, D. E. (1992) Plasmodial hemoglobin degradation: an ordered pathway in a specialized organelle. *Infect. Agents Dis.* **1**, 207–211
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S. and Ginsburg, H. (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* **34**, 163–189
- Di Mascio, P., Devasagayam, T. P., Kaiser, S. and Sies, H. (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 1054–1056
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. and DeRisi, J. L. (2003) The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* **1**, e5
- Herrero, S. and Daub, M. E. (2007) Genetic manipulation of vitamin B₆ biosynthesis in tobacco and fungi uncovers limitations to up-regulation of the pathway. *Plant Sci.* **172**, 609–620
- Graham, C. M., Ehrenshaft, M., Hausner, G. and Reid, D. M. (2004) A highly conserved gene for vitamin B biosynthesis may have consequences for stress and hormone responses in plants. *Physiol. Plant.* **121**, 8–14
- Benabdellah, K., Azcon-Aguilar, C., Valderas, A., Speziga, D., Fitzpatrick, T. B. and Ferrol, N. (2009) GintPDX1 encodes a protein involved in vitamin B₆ biosynthesis that is up-regulated by oxidative stress in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* **184**, 682–693
- Havaux, M., Ksas, B., Szcwycyk, A., Rumeau, D., Franck, F., Caffarri, S. and Triantaphylides, C. (2009) Vitamin B₆ deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress. *BMC Plant Biol.* **9**, 130
- Gengenbacher, M., Fitzpatrick, T. B., Raschle, T., Flicker, K., Sinning, I., Müller, S., Macheroux, P., Tews, I. and Kappes, B. (2006) Vitamin B₆ biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J. Biol. Chem.* **281**, 3633–3641
- Barillas-Mury, C. and Kumar, S. (2005) *Plasmodium*–mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell. Microbiol.* **7**, 1539–1545