

Charakterisierung des Glyoxalasesystems des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Miriam Urscher
aus
München

München 2011

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den

.....

(Unterschrift)

Dissertation eingereicht am 23. Mai 2011

Mündliche Prüfung am 06. Oktober 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Sondergutachter:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Erreger der Malaria	2
1.1.2	Behandlung und Resistenzentwicklung	4
1.1.3	Der Apikoplast	5
1.2	Das Glyoxalasesystem	6
1.2.1	Glyoxalase I	8
1.2.2	Glyoxalase II	11
1.3	Inhibition des Glyoxalasesystems	13
1.3.1	Inhibition der Glyoxalase I	14
1.3.2	Inhibition der Glyoxalase II	15
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Materialien und Geräte	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3	Bakterienstämme	20
2.1.4	Primer	20
2.1.5	Plasmide und Konstrukte	21
2.2	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1	DNA-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.2	Polymerasekettenreaktion und ortsggerichtete Mutagenese	23
2.2.3	DNA-Gelelektrophorese	23
2.2.4	DNA-Restriktionsverdau	24
2.2.5	Ligation	24
2.2.6	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	25
2.2.7	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i>	25
2.3	Zellbiologische Methoden	26
2.3.1	Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	26
2.3.2	Bestimmung der Parasitämie und Morphologie	27

2.3.3	Sorbitol-Synchronisation	27
2.3.4	Saponin-Lyse	27
2.3.5	Einfrieren von Parasiten	28
2.3.6	Auftauen von Parasiten	28
2.3.7	Zellkultur-Experimente mit Glyoxalase Inhibitoren	29
2.3.8	Transfektion und Selektion	29
2.3.9	Immunfluoreszenzanalyse und Live-Cell-Imaging	30
2.4	Proteinbiochemische Methoden	30
2.4.1	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine	30
2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	33
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	33
2.4.4	Coomassie-Blau-Färbung	34
2.4.5	Western-Blot	34
2.4.6	Immundetektion von Proteinen	35
2.4.7	Chemische Proteinquervernetzung (Crosslinking)	35
2.4.8	Pull-Down Experimente	36
2.4.9	Analytische Gelfiltration	37
2.4.10	Analytische Ultrazentrifugation und CD-Spektroskopie	37
2.4.11	SPR-Spektroskopie	37
2.4.12	Metallionenanalyse	37
2.4.13	Kristallisation	38
2.5	Enzymkinetische Messungen	38
2.5.1	Glyoxalase I Assay und Inhibition	38
2.5.2	Glyoxalase II Assay	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Lokalisation der Glyoxalasen in <i>Plasmodium falciparum</i>	40
3.1.1	<i>PfGloI</i> und <i>PfcGloII</i> befinden sich im Zytosol des Parasiten	40
3.1.2	<i>PftGloII</i> ist im Apikoplasten lokalisiert	40
3.1.3	Kontrolle der GFP-Fusionsproteine mittels Western-Blot	42
3.2	Struktur- und Interaktionsstudien	42
3.2.1	Kristallisationsversuche mit <i>PfGloI</i> und <i>PfcGloII</i>	42
3.2.2	<i>PfGloI</i> und <i>PfcGloII</i> scheinen nicht miteinander zu interagieren	45
3.2.3	<i>PfcGloII</i> bildet transiente Homodimere in Lösung	46
3.3	Katalysemechanismus der Glyoxalase II	50
3.3.1	Rekombinante <i>PftGloII</i> wird in <i>E. coli</i> nur unzureichend exprimiert	50
3.3.2	Optimierung des Expressions- und Reinigungsprotokolls von <i>PfcGloII</i> führt zu einer Steigerung der Enzymaktivität	50
3.3.3	Die Aktivität von <i>PfcGloII</i> ist salz- und pH-abhängig	52

3.3.4	<i>PfcGloII</i> arbeitet mittels Theorell-Chance-Mechanismus	54
3.3.5	Arg257 und Lys260 sind entscheidend für die Substratbindung	56
3.3.6	Mutationen der Substratbindungsstelle beeinflussen k_{cat} und verändern die pH-Abhängigkeit	57
3.4	Inhibitionsstudien <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	59
3.4.1	Curcumin ist ein kompetitiver Inhibitor von <i>PfGloI</i> und bindet bevorzugt an das hochaffine aktive Zentrum	60
3.4.2	Methylgerfelin ist ein kompetitiver Inhibitor von <i>PfGloI</i> , der auf beide aktive Zentren wirkt	62
3.4.3	Compound 5 und 26 inhibieren rekombinante <i>PfGloI</i> im nanomolaren Bereich	63
3.4.4	Methylgerfelin hemmt das Wachstum von <i>Plasmodium falciparum</i>	65
3.4.5	Compound 5 und 26 hemmen das Wachstum von <i>P. falciparum</i> nur in hohen Konzentrationen	66
3.4.6	Veresterung von Compound 5 und 26 verbessert die Wirkung auf <i>Plasmodium falciparum</i>	68
4	Diskussion	69
4.1	Lokalisation des Glyoxalasesystems in <i>Plasmodium falciparum</i>	69
4.2	Dimerisierung von <i>PfcGloII</i> in Lösung	70
4.3	Katalysemechanismus von <i>PfcGloII</i>	72
4.3.1	<i>PfcGloII</i> ist eines von wenigen Enzymen, das nach einem Theorell-Chance- Mechanismus arbeitet	72
4.3.2	Die Substratbindung/ Produktfreisetzung ist ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt	73
4.3.3	Die Substratbindungsstelle beeinflusst die basischen pK_a^{app} -Werte	75
4.3.4	Durch eine Mutation der Substratbindungsstelle wurde zum ersten Mal die Säure-Base-Katalyse enthüllt	76
4.3.5	Verfeinertes Katalysemodell von <i>PfGloII</i>	77
4.4	Inhibition des Glyoxalase Systems	79
4.4.1	Die neuen Erkenntnisse zur Substratbindung von <i>PfcGloII</i> ermöglichen eine verbesserte Inhibitorentwicklung	80
4.4.2	Inhibition der <i>PfGloI</i> <i>in vitro</i>	80
4.4.3	Wirkung der <i>GloI</i> -Inhibitoren auf <i>P. falciparum</i>	82
	Zusammenfassung	84
	Summary	86
	Literaturverzeichnis	88

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1.1	Weltweite Verbreitung von Malaria.	1
1.2	Lebenszyklus von Plasmodium.	3
1.3	Umstrukturierung des Erythrozyten durch <i>P. falciparum</i>	4
1.4	Entstehung des Apikoplasten durch sekundäre Endosymbiose.	5
1.5	Bildung, Reaktivität und Abbau von Methylglyoxal in infizierten Erythrozyten.	7
1.6	Struktur von GloI.	8
1.7	Mögliche Funktionen der unterschiedlichen Konformationen von <i>PfGloI</i>	9
1.8	Katalysemechanismus hGloI.	10
1.9	Katalysemechanismus hGloII.	12
1.10	Aktives Zentrum von GloII.	13
3.1	Lokalisation der Glyoxalasen in <i>P. falciparum</i>	41
3.2	Kontrolle der GFP-Fusionsproteine mittels Western-Blot	42
3.3	SDS-PAGE der Reinigungsfractionen der verschiedenen <i>PfGloI</i> -Varianten.	44
3.4	Interaktionsstudien mit <i>PfGloI</i> und <i>PfcGloII</i>	46
3.5	Oligomerisierung von <i>PfcGloII</i>	47
3.6	Pull-Down Experimente mit N-terminal getaggtter <i>PfcGloII</i>	49
3.7	Abschätzung der Dissoziationskonstante von <i>PfcGloII</i>	49
3.8	Molekulares Modell der Glutathionbindungsstelle von <i>PfcGloII</i>	52
3.9	Die Aktivität von <i>PfcGloII</i> ist salz- und pH-abhängig.	53
3.10	Produktinhibitionsstudien mit D-Lactat, GSH und GSH-EE.	55
3.11	Enzymkinetische Parameter von cGloII.	56
3.12	pH-Profile und pK-Wert-Bestimmung von <i>PfcGloII</i> WT und Mutanten.	58
3.13	Inhibitor der <i>PfGloI</i> durch Curcumin.	60
3.14	Einfluss der unterschiedlichen Vorinkubationsdauer von MGO und GSH sowie Curcumin auf die Enzymaktivität.	61
3.15	Vergleich der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von <i>PfGloI</i> WT, E345Q und E272Q.	62
3.16	Inhibition der <i>PfGloI</i> durch Methylgerfelin.	63

3.17 Vergleich der Struktur der verbesserten Glutathionderivate Compound 5 und 26 mit dem Produkt der GloI (SDL).	63
3.18 Inhibition von rekombinanter <i>PfGloI</i> mit Compound 5 und 26.	64
3.19 Inhibitionsstudien mit MGFN an <i>P. falciparum</i> in Zellkultur.	66
3.20 Bestimmung des IC_{50} von Compound 5 und 26.	67
3.21 Wirkung von Compound 5 und 26 auf Erythrozyten.	67
3.22 Einfachbestimmung des IC_{50} der Di-tert-butylester von Compound 5 und 26.	68
4.1 Das Glyoxalasesystem aus <i>P. falciparum</i>	69
4.2 Dimerbildung von <i>PfcGloII</i> und mögliche Auswirkungen.	71
4.3 Theorell-Chance-Mechanismus.	72
4.4 Reaktionsreihenfolge von <i>PfcGloII</i>	73
4.5 Verfeinertes Modell des Katalysemechanismus von <i>PfGloII</i>	77
4.6 Alignment des C-Terminus von GloII aus verschiedenen Organismen.	78
4.7 Inhibition von <i>PfGloI</i>	81

Tabellenverzeichnis

1.1 Malariaerreger des Menschen.	2
1.2 IC_{50} und K_i -Werte verschiedener GloI-Inhibitoren.	15
1.3 K_i -Werte verschiedener GloII-Inhibitoren.	16
3.1 Verschiedene <i>PfGloI</i> -Varianten für Kristallisationsexperimente.	43
3.2 Ergebnisse der Vorversuche zur Kristallisation von <i>PfGloI</i>	45
3.3 Mittelwerte der apparenten molekularen Masse von <i>PfcGloII</i> WT und Mutanten.	46
3.4 Kinetische Parameter für <i>PfcGloII</i> WT und Mutanten.	51
3.5 Parameter aus Abb. 3.12 C sowie pK_a^{app} -Werte aus Abb. 3.12 D.	59

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
× g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
β-ME	β-Mercaptoethanol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
A	Absorption
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
ca.	zirka
cm	Zentimeter
CD	Circulardichroismus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Disuccinimidylsuberat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
fl	Femtoliter (= 10 ⁻¹⁵ l bzw. entspricht 1 μm ³)
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

GloI	Glyoxalase I
GloII	Glyoxalase II
hGloII	humane, zytosolische Glyoxalase II
cGloII	Glyoxalase II im Zytosol von <i>Plasmodium falciparum</i>
tGloII	Glyoxalase II im Apikoplasten von <i>Plasmodium falciparum</i>
GSH	Glutathion, reduziert
GSH-EE	Ethylester von Glutathion
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
h $dhfr$	humane Dihydrofolatreduktase
His ₆	6× Histidin-Tag
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IC ₅₀	Konzentration, bei der 50% Inhibition erreicht werden
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
k_{cat}	katalytische Konstante, Wechselzahl
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K_i	Dissoziationskonstante Inhibitor
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knock-Out (Gen-Abschaltung)
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MGFN	Methylgerfelin
MGO	Methylglyoxal
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
N-	Amino-
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
ProtA / pA	Protein A
PDB	Protein Data Bank
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDL	S-D-Lactoylglutathion
sec	Sekunde
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBS	Tris buffer saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>tk</i>	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenprozent (Volumen/Volumen)
w/v	Gewichtsprozent (Gewicht/Volumen)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist auch noch heutzutage, über 100 Jahre nach der Entdeckung des verursachenden Erregers *Plasmodium*, eine der bedeutendsten und schwerwiegendsten Infektionskrankheiten weltweit. Besonders betroffen von dieser Krankheit sind Länder in den tropischen und subtropischen Gebieten. Nach aktuellen Schätzungen der WHO verstarben dort 2009 781.000 Kinder und Erwachsene an den Folgen ihrer Infektion mit Parasiten der Gattung *Plasmodium*. Insgesamt infizierten sich ca. 225 Millionen Menschen mit Malaria, wobei der überwiegende Anteil der Fälle (80 - 90 %) in Afrika gezählt wurde [114]. Besonders Klein-

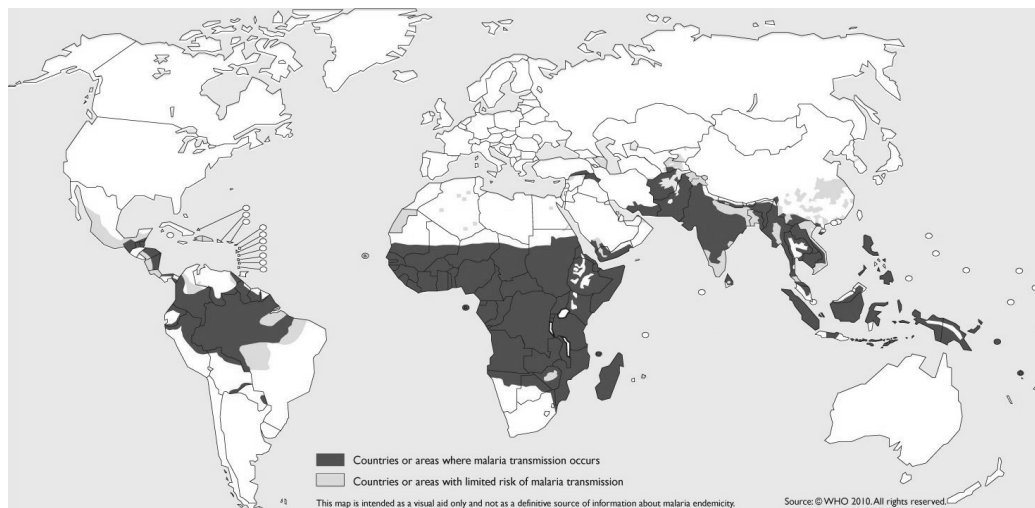


Abbildung 1.1: Weltweite Verbreitung von Malaria (© WHO 2010).

kinder im Alter bis zu fünf Jahren sind von dieser seit mehreren Jahrhunderten bekannten Krankheit betroffen. Bereits in der Antike gab es Berichte von Patienten mit den für Malaria charakteristischen Fieberschüben, die vorwiegend in Sumpfgebieten lebten. Über 2500 Jahre lang herrschte die Idee vor, dass diese Krankheit von den giftigen Ausdünstungen (ital. mal'aria = schlechte Luft) aus den sumpfigen Böden verursacht wird. Nach der Entdeckung von Mikroorganismen als Ursache für Infektionskrankheiten im späten 19. Jahrhundert

verabschiedete man sich von dieser Theorie und es begann eine intensive Suche nach dem entsprechenden Erreger. 1880 gelang Alphonse Laveran die Entdeckung des Parasiten *Plasmodium* im Blut von an Malaria erkrankten Patienten. Kurz darauf folgte ein weiterer Durchbruch mit der Erkenntnis, dass weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles* für die Übertragung von Mensch zu Mensch verantwortlich sind [29].

1.1.1 Erreger der Malaria

Malaria wird von einzelligen, eukaryotischen Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen. Von den über 100 bekannten Arten werden nur vier für die Erkrankung des Menschen in Betracht gezogen: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* [58,101,109]. Vor kurzem wurde über die Entdeckung einer fünften humanpathogenen Art, *Plasmodium knowlesi*, diskutiert. Obwohl diese Art primär für die Erkrankung von Affen verantwortlich ist, kommt es in Südostasien vermehrt zu einer Erkrankung von Menschen [30,58,109].

Erkrankung	Erreger	Eigenschaften und Symptomatik
Malaria tropica	<i>Plasmodium falciparum</i>	hohe Letalität, schwere Anämie, asynchrones Fieber, Blutstadien erscheinen nach 8 - 25 Tagen, infizierte Erythrozyten können kleine Blutgefäße verschließen und zerebrale Malaria auslösen
Malaria tertiana	<i>Plasmodium vivax</i>	weiteste geographische Verbreitung, dormante Leberstadien, leichte (bis schwere) Anämie, synchrones Fieber alle 48 h, Blutstadien erscheinen nach 8 - 27 Tagen
	<i>Plasmodium ovale</i>	Vorkommen vor allem in Westafrika, dormante Leberstadien, synchrones Fieber alle 48 h, Blutstadien erscheinen nach 9 - 17 Tagen
Malaria quartana	<i>Plasmodium malariae</i>	weltweites, aber seltenes Vorkommen, synchrones Fieber alle 72 h, Blutstadien erscheinen nach 15 - 30 Tagen

Tabelle 1.1: Malariaerreger des Menschen. Zusammenfassung aus [101,109,112]

Plasmodien durchlaufen einen komplizierten Lebenszyklus (Abb. 1.2), der in verschiedene Phasen eingeteilt werden kann: Nach dem Stich einer *Anopheles*-Mücke gelangen bis zu hundert Sporozoiten [58] mit dem Speichel des Insekts in subkutanen Gewebe. Von dort wandern sie über die menschliche Blutbahn in die Leber und befallen Hepatozyten, in denen sie für 9 - 16 Tage verbleiben. In dieser Zeit werden mittels asexueller Replikation mehrere

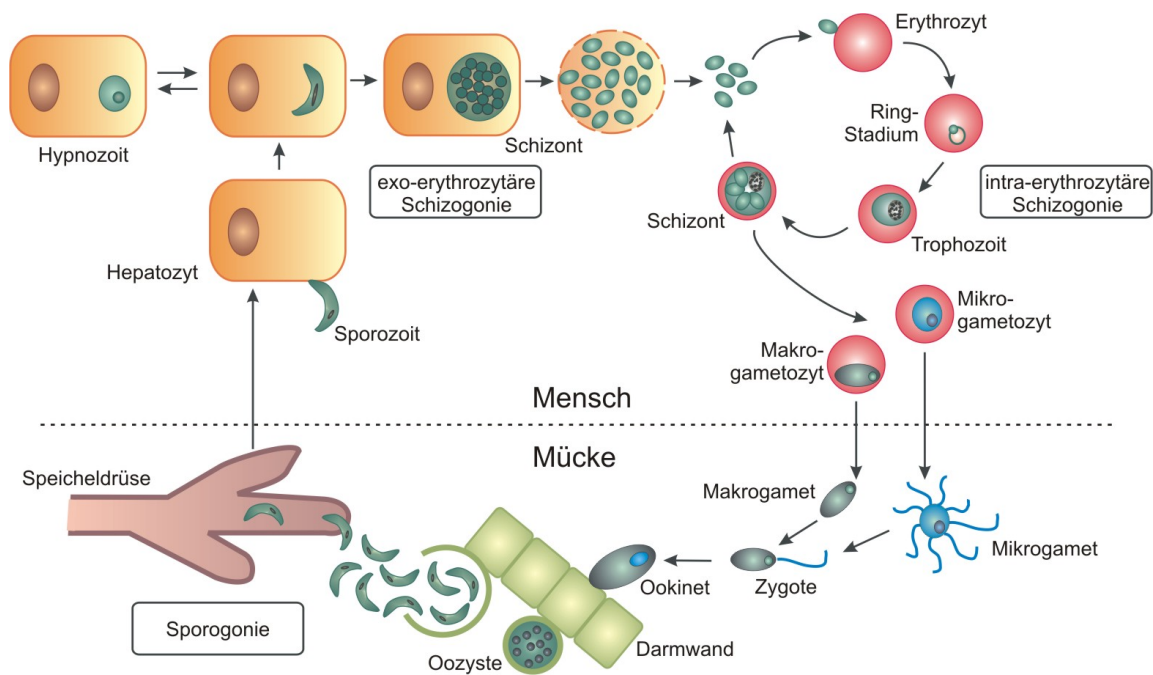


Abbildung 1.2: Lebenszyklus von Plasmodium. Dabei liegt ein haplohomophasischer Generationswechsel [108] vor, bei dem alle Stadien außer der Zygote haploid sind.

hunderttausend Merozoiten gebildet, die nach dem Platzen der Leberzelle in den Blutstrom freigesetzt werden (*exo-erythrozytäre Schizogonie*) [58,78,101]. Bei *P. vivax* und *P. ovale* kann es vorkommen, dass sich dormante Leberstadien (Hypnozoiten) ausbilden, die mehrere Wochen bis Jahre unbemerkt vom Immunsystem in der Leberzelle überleben, und spontan eine erneute Erkrankung mit Malaria auslösen können [78,101,110].

Die freigesetzten Merozoiten dringen in Erythrozyten ein und nisten sich innerhalb des Wirtszellplasmas in einer Vakuole ein. In einem Rhythmus von 48 - 72 h wachsen und vermehren sich die Parasiten asexuell in dieser parasitophoren Vakuole, bis die roten Blutkörperchen platzen, neu gebildete Merozoiten freigelassen werden und diese erneut Erythrozyten infizieren (*intra-erythrozytäre Schizogonie*) [58,66,101]. Während dieses Zyklus durchlaufen die Parasiten verschiedene Stadien: Nach der Invasion flacht der Parasit zu einer bikonkaven Scheibe ab, beginnt mit der Nährstoffaufnahme aus dem Erythrozyten sowie mit der Umstrukturierung der Wirtszelle [11]. Das Ring-Stadium wächst weiter zum Trophozoiten, ein Stadium, das durch einen hohen Stoffwechselumsatz gekennzeichnet ist. So steigt z.B. die Aufnahme von Glucose und die Glykolyserate stark an und der Parasit baut große Mengen an Hämoglobin in die einzelnen Aminosäurebestandteile ab. Das dabei entstehende toxische Häm wird zu Hämozoin polymerisiert und in der Nahrungsvakuole gelagert [11,101]. Zusätzlich werden bei *P. falciparum* spezielle Proteine über die Maurerschen

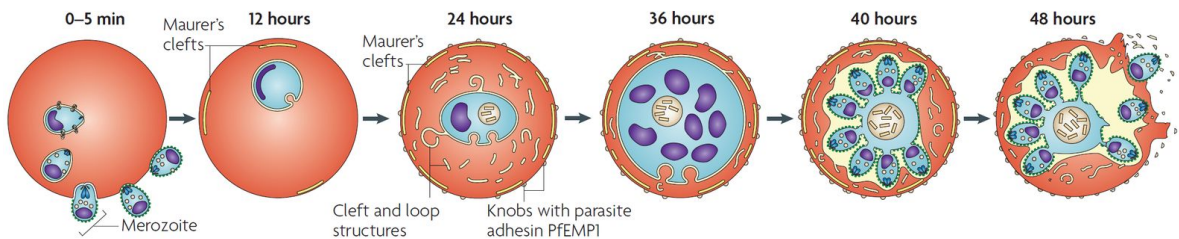


Abbildung 1.3: Umstrukturierung des Erythrozyten durch *P. falciparum* [66]. Merozoiten dringen in den Erythrozyten ein und entwickeln sich innerhalb der parasitophoren Vakuole über das Ring-Stadium (0 - 12 h) zum Trophoziten (nach ca. 24 h) und später zum Schizonten (40 - 48 h). Nach ca. 24 h werden membrangebundene Strukturen im Zytoplasma des Erythrozyten sichtbar und es bilden sich knopfähnliche Verformungen auf der Membran. PfEMP1: *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1.

Spalten in die Nähe oder an die Oberfläche des Erythrozyten exportiert [11,66]. Eines dieser Proteine ist PfEMP1, das für das Anheften an die Endothelmembran von Blutgefäßen verantwortlich ist und so den Parasiten vor einer Immunantwort in der Milz schützt (Abb. 1.3). Das letzte Stadium, der Schizont, entsteht durch multiple Zellkernteilung. Am Ende enthält der reife Schizont 16 - 32 Merozoiten, die nach Lyse des Erythrozyten freigesetzt werden [11,66].

Ein kleiner Teil der Merozoiten differenziert sich nach einigen Runden intra-erythrozytärer Schizogonie zu Mikro- und Makrogametozyten. Bei einer Blutmahlzeit werden 10 bis 1000 Gametozyten [58] von der Stechmücke aufgenommen und formen sich im Mitteldarm zu Mikro- und Makrogameten um. Die Gameten fusionieren zur Zygote, die als Ookinete die Darmwand durchbricht. Auf der Epithelinnenseite entwickelt sich anschließend die Oozyste, in der durch Meiose und anschließende asexuelle Replikation eine große Anzahl an Sporozoiten ausgebildet werden (*Sporogonie*). Nach dem Platzen der Oozysten wandern die Sporozoiten über die Hämolymphe zur Speicheldrüse und gelangen durch einen Stich erneut in den Wirt [29,101].

1.1.2 Behandlung und Resistenzentwicklung

Für die klinischen Symptome sind ausschließlich die intra-erythrozytären Stadien verantwortlich, da mit der Lyse der Erythrozyten Zellbestandteile in die Blutbahn gelangen und das charakteristische Fieber auslösen. Erschwerend kommt bei *P. falciparum* hinzu, dass die Anheftung infizierter Erythrozyten an prävenöse Kapillarwände eine Verengung von Mikrogefäßen hervorruft. Die Obstruktion von Blutgefäßen im Gehirn führt zur zerebralen Malaria, die ohne unverzügliche Behandlung tödlich endet. Grundsätzlich ist Malaria bei einer raschen und adäquaten Behandlung heilbar [101,112].

Eines der ersten weitverbreiteten Medikamente gegen Malaria war Chloroquin, ein synthetisches Derivat von Chinin. Chloroquin und andere 4-Aminoquinoline beeinträchtigen die Entgiftung von freiem, toxischen Häm zu unlöslichem, nicht-toxischen Hämозoinkristallen. Im Gegensatz zu *P. falciparum*, bei dem sich eine weltweite Resistenz gebildet hat, kann *P. vivax* noch mit Chloroquin behandelt werden. Inzwischen wurden aber auch die ersten resistenten *P. vivax* Parasiten in Südostasien entdeckt. Da die gestörte Entgiftung sehr effektiv zum Absterben der Parasiten führt, bleibt die Hämpolymerisation ein aussichtsreiches Ziel bei der Entwicklung neuer Antimalaria-Wirkstoffe [58,109,112]. Das einzige breit angewandte Medikament, das gegen dormante Hypnozoiten von *P. vivax* wirkt, ist das 8-Aminoquinolin Primaquin. Die wesentlichen Nachteile dieses Wirkstoffes liegen zum einen darin, dass dieser täglich für 14 Tage eingenommen werden muss und zum anderen, dass in Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase defizienten Patienten eine Hämolyse ausgelöst wird. In endemischen Gebieten weisen jedoch bis zu 20 % der Bevölkerung diese Defizienz auf [109,110].

Derzeit sind Artemisin und dessen Derivate mit die wichtigsten Medikamente gegen Malaria. Die Artemisinderivate schlagen schneller auf Blutstadien an als andere Antimalaria-Wirkstoffe und besitzen außerdem Wirkung gegen Gametozyten, wodurch die Übertragung verringert wird. Der Wirkmechanismus der Artemisin-Derivate beruht vermutlich auf der Aktivierung der Endoperoxid-Struktur durch Fe^{2+} , das ebenfalls beim Hämoglobinabbau anfällt. Um eine Resistenzentwicklung zu vermeiden, werden diese Wirkstoffe im Rahmen einer Kombinationstherapie verabreicht. Trotzdem gibt es erste Warnungen, dass sich entlang der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha resistente Parasiten entwickeln könnten [109,112].

1.1.3 Der Apikoplast

In Kombination mit Antimalaria-Wirkstoffen werden gelegentlich auch Antibiotika eingesetzt, die ihre Wirkung im Apikoplasten entfalten. Dieses Organell bakteriellen Ursprungs ist durch sekundäre Endosymbiose entstanden und hat somit typischerweise drei bis vier Membranen [64,107]. Im Laufe der Evolution verlor dieses Plastid seine Fähigkeit zur Photo-

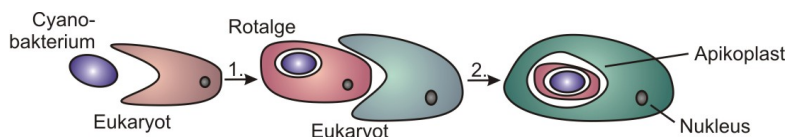


Abbildung 1.4: Entstehung des Apikoplasten durch sekundäre Endosymbiose (nach [64]).

synthese, behielt aber eine eigene Ausstattung für DNA-Replikation, Transkription und Translation [58,112]. An diese Mechanismen setzen Antibiotika wie Clindamycin (Replikation) oder Rifampicin (Transkription) an. Charakteristisch für die Gabe dieser Medikamente ist, dass das Wachstum der Parasiten erst im nächsten Zyklus der asexuellen Vermehrung gestoppt wird. Eine weitere Funktion des Apikoplasten ist die Fettsäure- und Isoprenoidbiosynthese. Medikamente wie Fosmidomycin greifen in letzteren Stoffwechsel ein und sorgen für ein sofortiges Absterben der Parasiten. Da der Apikoplast während des gesamten Lebenszyklus des Erregers erhalten bleibt, könnten sich diese Wirkstoffe sowohl gegen Leber- als auch Blutstadien richten [58,64,112].

1.2 Das Glyoxalasesystem

Malariaparasiten benötigen für ihre schnelle Entwicklung, Zellteilung und Vermehrung im Erythrozyt eine erhöhte Menge an Energie in Form von ATP. Infolge der gestiegenen Glykolyserate nahm der Glucoseverbrauch in infizierten roten Blutkörperchen um das bis zu 75-fache zu [88]. Messungen der L-Lactatkonzentration in infizierten und uninfizierten Erythrozyten bestätigten dieses Bild. In der ersten Hälfte des intra-erythrozytären Vermehrungszyklus erhöhte sich die Produktion von L-Lactat um das 24-fache, während der zweiten Hälfte sogar um das 37-fache. Außerdem wiesen alle glykolytischen Enzyme aus dem Parasiten eine höhere spezifische Aktivität als die Enzyme aus dem Erythrozyten auf [103]. Während der Glykolyse entsteht aber auch das toxische Nebenprodukt Methylglyoxal aufgrund der spontanen Eliminierung des Phosphats von Dihydroxyacetonphosphat oder Glycerinaldehyd-3-phosphat (Abb. 1.5). Während der Triosephosphatisomerase-Reaktion werden ca. 0.1 - 0.4 % der Triosen in Methylglyoxal umgewandelt (Abb. 1.5) [92,94]. Weiterhin entstehen Methylglyoxal und andere elektrophile 2-Oxoaldehyde wie Glyoxal beim Ketonkörpermetabolismus, beim Abbau von Threonin, bei der Lipidperoxidation und bei der Fragmentierung glykierter Proteine [93]. 2-Oxoaldehyde sind bereits in niedrigen Konzentration hochreaktiv und modifizieren unter anderem den Guanylrest in DNA und RNA. Dadurch kommt es zu Mutationen im Erbgut oder sogar bis zum Auslösen der Apoptose. 2-Oxoaldehyde reagieren ebenfalls mit Cystein-, Lysin- und Arginin-Seitenketten in Proteinen (Abb. 1.5). Diese modifizierten Proteine führten z.B. in Monozyten und Makrophagen zur rezeptorvermittelten Endozytose und zum lysosomalen Proteinabbau [94,95].

Die Umwandlung von Methylglyoxal (MGO) über das Zwischenprodukt S-D-Lactoylglutathion (SDL) in D-Lactat wird von zwei aufeinanderfolgenden Enzymen, Glyoxalase I und II, und Glutathion als Coenzym bewältigt (Abb. 1.5) [38,93,95]. Zum ersten Mal wurde

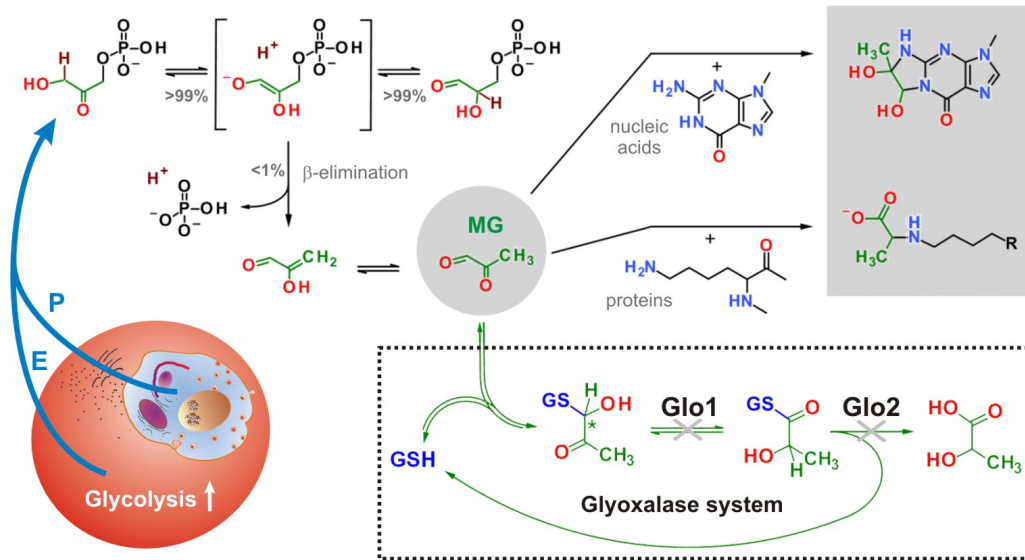


Abbildung 1.5: Bildung, Reaktivität und Abbau von Methylglyoxal in infizierten Erythrozyten (aus [V.3]). Weitere Details siehe Text. E: Erythrozyt, P: Parasit, GSH: Glutathion, Glo1: Glyoxalase I, Glo2: Glyoxalase II.

die Umwandlung von Methylglyoxal in Lactat 1913 von Dakin & Dudley sowie von Neuberg beschrieben [35,75], die davon ausgingen, dass diese Reaktion von einem einzelnen Enzym durchgeführt wird. Erst 1951 konnte Racker zeigen, dass zwei unterschiedliche Enzyme an der Umwandlung von Methylglyoxal beteiligt sind [79]. Inzwischen ist bekannt, dass das für die Entgiftung so wichtige Glyoxalasesystem bis auf wenige Ausnahmen (z. B. *Trypanosoma brucei*) in allen Organismen vorhanden ist [48,95]. Auch der Malariaparasit ist aufgrund seiner hohen Glykolyserate stark auf das Glyoxalasesystem angewiesen, um das vermehrt gebildete Methylglyoxal in harmloses D-Lactat umzuwandeln. Im Vergleich zu uninfizierten Erythrozyten stieg in der ersten Hälfte des Vermehrungszyklus die Produktion von D-Lactat um das 18-fache und während der zweiten Hälfte sogar um das 30-fache. Zudem stieg die spezifische Aktivität von Glyoxalase I bzw. Glyoxalase II aus *P. falciparum* um das 2 - 3-fache im Vergleich zu den Enzymen aus dem Erythrozyt. Die Inhibition dieses Systems (Abb. 1.5) könnte sich somit als vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Entwicklung neuer Antimalaria-Wirkstoffe eignen [103].

In *P. falciparum* wurden drei Glyoxalasen identifiziert: eine Glyoxalase I [56] und eine Glyoxalase II im Zytosol des Parasiten sowie eine weitere Glyoxalase II, die aufgrund ihrer N-terminalen Signalsequenz vermutlich in den Apikoplasten transportiert wird [1].

1.2.1 Glyoxalase I

Glyoxalase I (E.C. 4.4.1.5) ist eine glutathionabhängige Isomerase. Methylglyoxal oder andere 2-Oxoaldehyde reagieren spontan mit reduziertem Glutathion und bilden dabei ein Hemithioacetal. Glyoxalase I katalysiert die Umwandlung beider diastereomeren Hemithioacetale zu einem Glutathionthioester (siehe Abb. 1.5) und beugt somit einer Anreicherung von Methylglyoxal in der Zelle vor [38,94,96].

Struktur und Funktion der Glyoxalase I

Glyoxalase I (GloI) aus verschiedenen Organismen kann in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: kleinere homodimere Isoenzyme wie in Mensch [22] oder *E. coli* [51] und größere monomere Isoenzyme wie in *P. falciparum* [56] oder Hefe [46] (Abb. 1.6 links). Die Kristallstruktur humaner GloI (hGloI) zeigt, dass jedes Monomer aus zwei Domänen besteht, die vermutlich das Ergebnis einer Genduplikation sind. Dabei interagiert die N-terminale Domäne einer Untereinheit mit der C-terminalen Domäne der anderen Untereinheit und bildet demzufolge zwei strukturell identische aktive Zentren (A und A') [22]. Im Gegensatz dazu

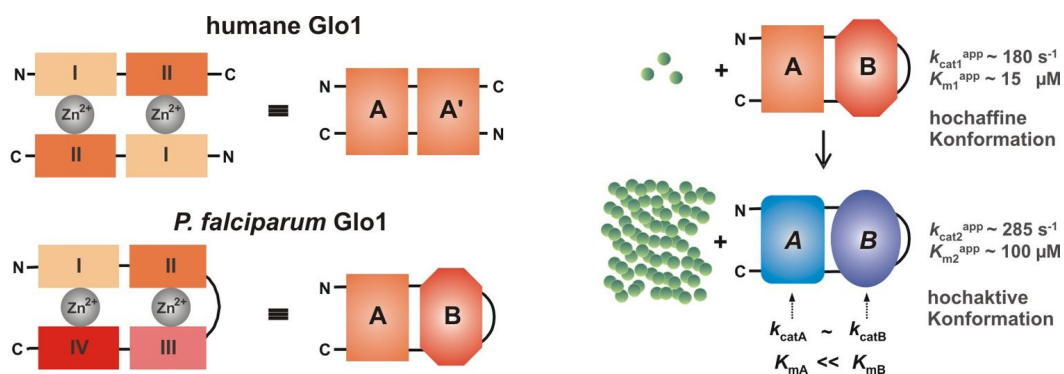


Abbildung 1.6: Struktur von GloI (aus [V.3]). Humane, homodimere GloI besitzt zwei strukturell identische aktive Zentren, während die monomere GloI aus *P. falciparum* über zwei verschiedene aktive Zentren verfügt. Beide aktiven Zentren weisen eine unterschiedliche Substrataffinität auf und liegen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in unterschiedlichen Konformationen vor.

weist das monomere Isoenzym aus *P. falciparum* zwei unterschiedliche aktive Zentren auf (A und B) [38]. Mehrere Studien in Hefe und *P. falciparum* unterstützen dabei die Hypothese, dass die großen monomeren GloI durch eine zweite Genduplikation und anschließende Fusion entstanden sind [46,56]. Gegenwärtig liegt keine Kristallstruktur von *P. falciparum* GloI (*PfGloI*) vor. Sequenzalignments und daraus entstandene molekulare Modelle deuten jedoch darauf hin, dass sich die Struktur dieser monomeren Glyoxalase erheblich von den bekannten Strukturen homodimerer Glyoxalasen unterscheidet. So fehlen z. B. bei *PfGloI* die entsprechenden ersten 24 Aminosäurereste der humanen GloI [1]. Zudem besitzt *PfGloI* auf-

grund seiner monomeren Struktur eine Linkersequenz zwischen den beiden Untereinheiten, die im homodimeren Enzym nicht vorkommt.

Die Besonderheit der monomeren *PfGloI* besteht in der allosterischen Kopplung ihrer zwei unterschiedlichen aktiven Zentren [38]. Obwohl die Wechselzahl (k_{cat}) beider aktiven Zentren bei gesättigter Substratkonzentration sehr ähnlich ist, weist das aktive Zentrum A eine hohe Substrataffinität und das aktive Zentrum B eine niedrige Substrataffinität auf. Außerdem agieren beide aktive Zentren nicht unabhängig voneinander, da die Substratbindung an ein aktives Zentrum auch die Konformation des anderen Zentrums beeinflusst (allosterischer Effekt). Aufgrunddessen liegt das Enzym bei niedrigen Substratkonzentrationen in einer hochaffinen Konformation vor und wechselt bei einem Anstieg der Substratkonzentration in eine hochaktive Konformation (Abb. 1.6 rechts). Ein möglicher physiologischer

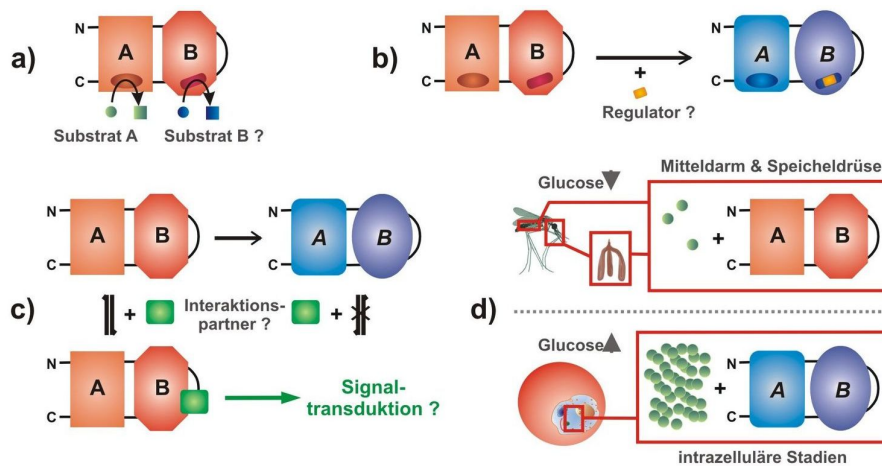


Abbildung 1.7: Mögliche Funktionen der unterschiedlichen Konformationen von *PfGloI* (aus [V.3]).

Vorteil monomerer *GloI* ist ein breiteres Substratspektrum (Abb. 1.7 a). Während ein aktives Zentrum seine ursprüngliche Funktion beibehält, kann sich das andere Zentrum an neue Substratbedingungen anpassen. Außerdem könnte ein Substrat(analogon) oder ein regulatorisches Molekül an das zweite Zentrum binden und dadurch die Aktivität des Enzyms beeinflussen (Abb. 1.7 b). Andererseits könnte eine der beiden Konformationen eine Interaktion mit einem weiteren Protein veranlassen und somit die Signaltransduktion beeinflussen (Abb. 1.7 c). Darüberhinaus könnte die allosterische Kopplung eine Anpassung an die verschiedenen Umweltbedingungen während des Lebenszyklus von *P. falciparum* erlauben (Abb. 1.7 d). Stadien, z.B. im Moskito, die geringen 2-Oxoaldehydkonzentrationen ausgesetzt sind, benötigen eine hohe Affinität für ein effektives Arbeiten des Enzyms. Dagegen profitieren Stadien mit höheren 2-Oxoaldehydkonzentrationen, z.B. im Erythrozyt, von der gesteigerten Enzymaktivität [38].

Katalysemechanismus der Glyoxalase I

Glyoxalase I gehört der Superfamilie der VOC (vicinal oxygen chelate) Metalloenzyme an. Gemeinsames Merkmal dieser Familie ist, dass sie gepaarte $\beta\alpha\beta\beta$ -Motive aufweisen, die für die Metallkoordination zuständig sind [7]. Im Falle der homodimeren hGloI wird Zn^{2+} im aktiven Zentrum von den Aminosäuren Gln33 und Glu99 der N-terminalen Domäne der ersten Untereinheit und von den Aminosäuren His126' und Glu172' der C-terminalen Domäne der zweiten Untereinheit koordiniert [22]. Analog dazu erfolgt die Zn^{2+} -Bindung in der monomeren *Pf*GloI in den beiden Zentren durch die Aminosäuren Gln18, Glu91, His299 und Glu345 bzw. Gln182, Glu 272, His115 und Glu161 [56]. Das Metallion ist an der Substratbindung beteiligt und stabilisiert den Endiol-Übergangszustand. Die Substratbindung wird zusätzlich durch die Wechselwirkung weiterer Aminosäuren mit dem Glutathionrest erleichtert. Dabei interagieren bei hGloI Arg37 und Arg122 mit der Carboxygruppe des γ -Glutamat [22] (Arg22/Arg295 bzw. Arg186/Arg111 in *Pf*GloI [38]). Außerdem besitzt hGloI eine flexible Schleife, die nach Substratbindung das aktive Zentrum verschließt [23]. Diese Ergebnisse stützen die allgemeine Auffassung, dass der katalytische Reaktionsmechanismus über geschützten Protonentransfer von C-1 zu C-2 und ein Endiol-Intermediat abläuft. Basierend auf den Kristallstrukturen der humanen GloI [22,23], wurde ein theoretisches Modell des Katalysemechanismus aufgestellt (Abb. 1.8): Wie bereits erwähnt, kann GloI beide diastereomere *S*- und *R*-Hemithioacetale umwandeln, dabei entsteht aber nur ein

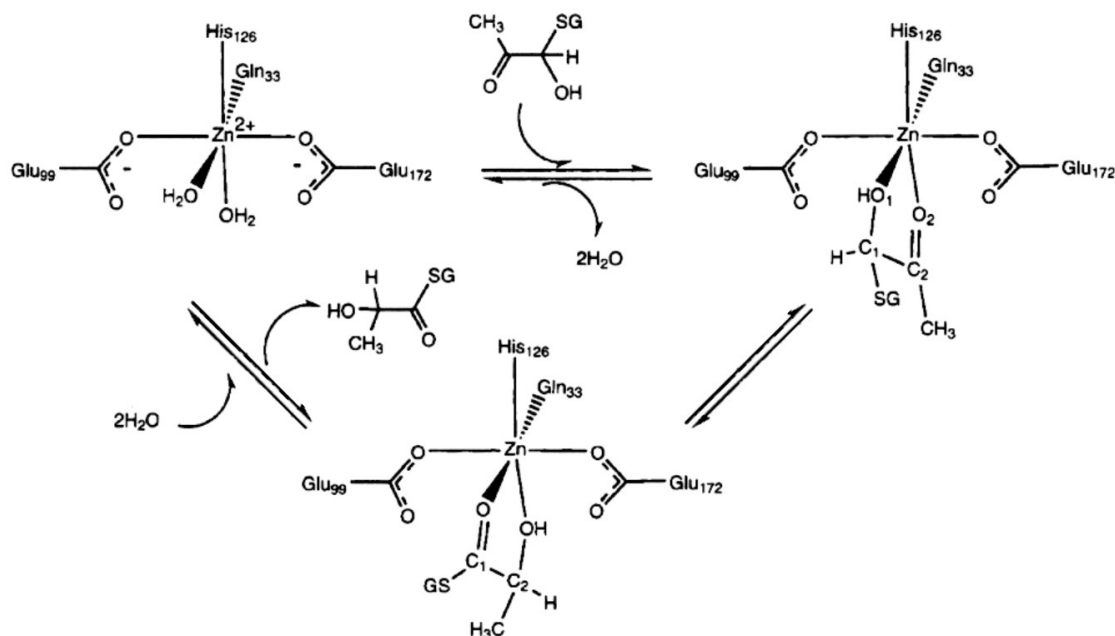


Abbildung 1.8: Katalysemechanismus hGloI (modifiziert aus [54]).

stereoisomerer *R*-Thioester. Zwei unabhängige theoretische Studien [54,82] kamen zu dem Schluss, dass beim *S*-Diastereomer Glu172 und beim *R*-Diastereomer Glu99 für die Deprotonierung von C-1 zuständig sind. In beiden Fällen entsteht dasselbe *cis*-Endiol-Intermediat. Der anschließende Protonentransfer auf C-2 wird von Glu172 durchgeführt und resultiert in der Bildung des Thioesters *R-S-2*-Hydroxyacylglutathion .

1.2.2 Glyoxalase II

Glyoxalase II (EC 3.2.1.6) ist eine Thioesterase. Sie katalysiert die Hydrolyse von *S-2*-Hydroxyacylglutathionen wie *S-D*-Lactoylglutathion zu den entsprechenden 2-Hydroxycarbonsäuren wie *D*-Lactat (siehe Abb. 1.5). Gleichzeitig wird Glutathion, das während der Glyoxalase I Reaktion verbraucht wurde, wieder freigesetzt und somit regeneriert [1,95]. Glyoxalase II weist eine breite Substratspezifität für Glutathionthioester auf, zeigt dabei aber eine hohe Spezifität für den Glutathionanteil, wohingegen die Hydroxygruppe am C2-Atom eine untergeordnete Rolle spielt. Andere Thioester oder Carbonsäureester können hingegen von der Glyoxalase II nicht gespalten werden [93,102].

Glyoxalase II findet man vorwiegend im Zytosol der Zelle, jedoch gibt es auch Berichte über GloII in anderen Organellen wie Mitochondrien [17,28,68,93]. Bislang ist die genaue Funktion dieser zusätzlichen Isoenzyme unklar. In *P. falciparum* wurden ebenfalls zwei Isoenzyme gefunden: das erste befindet sich im Zytosol (*PfcGloII*), während das zweite Isoenzym eine mögliche Signalsequenz für den Apikoplasten trägt (*PftGloII*) [1].

Struktur der Glyoxalase II

Glyoxalase II (GloII) ist Mitglied der Superfamilie der Metallohydrolasen, die eine β -Lactamase-Faltung aufweisen. Dieses Faltungsmotiv besteht aus einem vierlagigen β -Sandwich und befindet sich in der N-terminalen Domäne von GloII. Die C-terminale Domäne hingegen ist für GloII einzigartig und besteht aus fünf α -Helices [24]. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist das hochkonservierte Zinkbindungsmotif THXHXD [70], das auch bei den Glyoxalasen II aus *P. falciparum* gefunden wurde [1]. Die Kristallstruktur der humanen GloII (hGloII) [24] zeigte, dass die beiden Zinkbindestellen am Rand des β -Sandwich angeordnet sind und das erste Zinkion von den Aminosäuren His54, His56 sowie His110 und das zweite Zinkion von Asp58, His59 sowie His173 koordiniert wird. Zusätzlich interagiert ein Wassermolekül mit den beiden Zinkionen. Neben diesem katalytischen Zentrum gab es noch die Substratbindungsstelle, die vorwiegend aus Aminosäuren in der C-terminalen Domäne gebildet wird. Der Glutathionanteil wurde dabei über seinen Glycin- und Cysteinrest fest an das Enzym gebunden, während das γ -Glutamat keine spezifische Interaktion

mit dem Protein aufwies [24]. Bereits eine frühere Studie ließ darauf schließen, dass das γ -Glutamat nicht für die Bindung benötigt würde [2]. In unmittelbarer Nähe zum Glycin- und Cysteinrest befanden sich drei basische Aminosäuren (Arg249, Lys252 und Lys143) und zwei aromatische Aminosäuren (Tyr145 und Tyr175) [24]. Für die Aminosäure Tyr175 wurde bereits gezeigt, dass diese ausschließlich für die Substratbindung zuständig ist und nicht, wie zuvor vermutet, zusätzlich an der Hydrolyse beteiligt ist [83].

Katalysemechanismus der Glyoxalase II

Der erste Katalysemechanismus, der für GloII postuliert wurde, involvierte einen nukleophilen Angriff der Imidazolgruppe eines Histidins auf das C1-Atom des Thioesters [10]. Erst

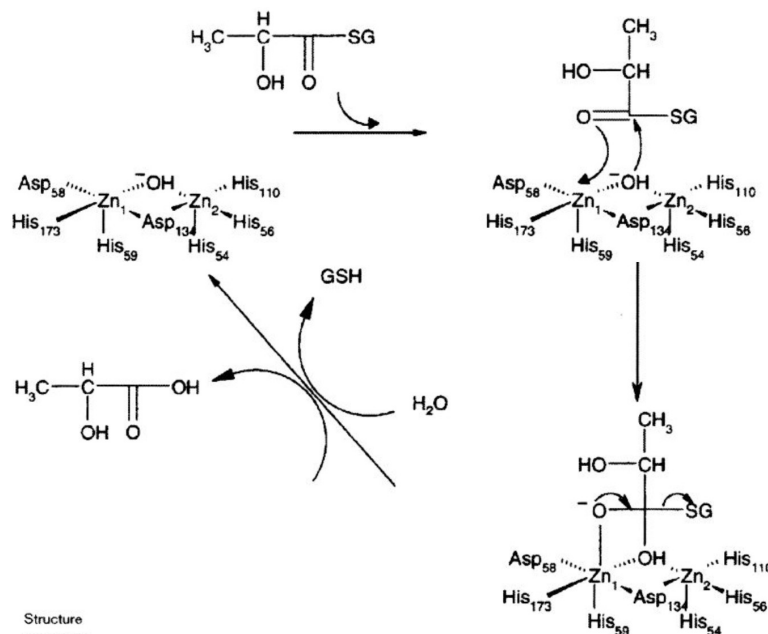


Abbildung 1.9: Katalysemechanismus hGloII (aus [24]).

mit Erscheinen der Kristallstruktur von hGloII [24] wurde die Theorie aufgestellt, dass der nukleophile Angriff durch ein Zn^{2+} -aktiviertes Hydroxidion ausgeführt wird. Die Interaktion des Wassermoleküls mit den beiden Zinkionen senkt vermutlich den pK_a soweit, dass ein Hydroxidion ausgebildet wird. Dieses greift das C1-Atom an und dabei bildet sich ein negativ geladenes, tetraedrisches Intermediat. Da keine Aminosäuren in der Nähe sind, um diesen Übergangszustand zu stabilisieren, übernimmt diese Aufgabe wahrscheinlich das erste Zinkion, indem es beide Sauerstoffatome koordiniert. Um die Reaktion zu vervollständigen, muss die Thioesterbindung gelöst und das Glutathion protoniert werden. Dabei ist es möglich, dass das Glutathion bis zur Protonierung vom zweiten Zinkion stabilisiert wird (Abb. 1.9) [24].

Vergleich der aktiven Zentren der humanen GloII und der *Pf*GloII Isoenzyme

Anhand der Kristallstruktur von hGloII und Sequenzvergleich wurden Strukturmodelle der *Pf*GloII Isoenzyme angefertigt (Abb. 1.10). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren, die für die Koordination der Zinkionen zuständig sind, hochkonserviert sind und die Zinkbindestellen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Jedoch scheinen sich

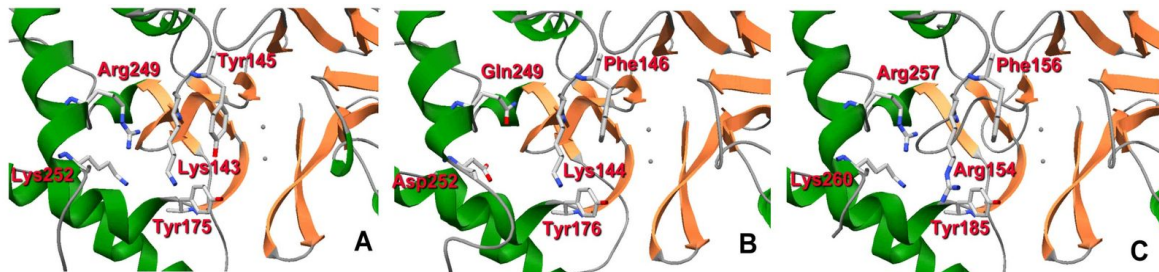


Abbildung 1.10: Aktives Zentrum von GloII (aus [1]). A: humane GloII B: *Pft*GloII C: *Pfc*GloII

die Aminosäuren, die für die Bindung des Glutathionanteils verantwortlich sind, bei den drei GloII-Enzymen zu unterscheiden. Im Vergleich zu hGloII und *Pfc*GloII ist bei *Pft*GloII vermutlich ein Aspartat- und Glutaminrest an der Substratbindung beteiligt. Weiterhin ist bei *Pfc*GloII an Position 154 der Lysinrest durch einen Argininrest ersetzt worden (Position 143 bei hGloII) [1]. In *Arabidopsis thaliana* führte der Austausch dieses Lysinrestes zu Alanin zu einem Aktivitätsverlust von 55% [115], während *Pfc*GloII eine vier- bis sechsfach höhere katalytische Effizienz als *Pft*GloII oder hGloII aufweist [1].

1.3 Inhibition des Glyoxalasesystems

Die toxische Wirkung von Methylglyoxal führte schon früh zu der vielversprechenden Idee, dass die Inhibition des Glyoxalase-Systems einen geeigneten therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Krebs oder Malaria darstellen könnte. Aufgrund des anti-proliferativen Effekts von Methylglyoxal auf Tumorzellen schlugen Vince und Wadd bereits 1969 vor, dass sich Inhibitoren der Glyoxalase I für die Therapie von Krebs eignen könnten [106]. Die Entdeckung, dass mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten vermehrt D-Lactat produzierten und Parasitenextrakt eine erhöhte spezifische Aktivität beider Glyoxalasen aufwies, führte zu der Hypothese, dass die Inhibition des Glyoxalase-Systems auch einen Einfluss auf das Wachstum von Parasiten nehmen könnte [103].

1.3.1 Inhibition der Glyoxalase I

Die ersten Inhibitoren, die von Vince *et al.* entwickelt und getestet wurden, waren verschiedene *S*-Alkyl- und *S*-Arylglutathionderivate. Die höchste Wirksamkeit gegen GloI (aus Hefe) zeigte dabei *S-p*-Bromobenzylglutathion [105,106]. Der Nachteil von *S-p*-Bromobenzylglutathion besteht allerdings darin, dass dieses wie Glutathion und viele seiner Derivate nur schwer die Plasmamembran durchdringt und zudem von γ -Glutamyltranspeptidase gespalten und inaktiviert wird. Anderson *et al.* [6] untersuchten den Monoethylester von Glutathion und konnten zeigen, dass dieser Glutathionester resistent gegen die Spaltung von γ -Glutamyltranspeptidase ist, die Plasmamembran leichter passiert und im Zytosol rasch in Glutathion umgewandelt wurde. Deswegen wurde ein Diethylester von *S-p*-Bromobenzylglutathion erstellt. Dieser hemmte nun das Wachstum von HL-60 Tumorzellen [65] und auch von *P. falciparum* [97] (Tab. 1.2).

Weitere Glutathionderivate, die sich als erfolgversprechende Inhibitoren erwiesen haben, sind *S*-(*N*-Aryl-*N*-hydroxycarbamoyl)glutathionderivate, die das Endiol-Intermediat nachahmen. Ein Vorteil dieser Gruppe ist, dass sie strukturelle Analoga zum *S*-2-Hydroxyacylglutathion sind, dem Substrat der GloII, und somit beide Enzyme inhibieren können. Der effektivste Inhibitor war dabei das *S-N*-Hydroxy-*N*-(bromophenyl)carbamoylglutathion [74]. Diethylester der *S*-(*N*-Aryl-*N*-hydroxycarbamoyl)glutathionderivate zeigten zudem eine zytostatische und zytotoxische Wirkung auf L1210 und B16 Tumorzellen [59]. Diese Klasse von Inhibitoren (*S-N*-Hydroxy-*N*-(phenyl)carbamoylglutathion, *S-N*-Hydroxy-*N*-(chlorophenyl)carbamoylglutathion und *S-N*-Hydroxy-*N*-(bromophenyl)carbamoylglutathion) wurde ebenfalls an rekombinanter *Pf*GloI und in Zellkultur getestet [1] (Werte siehe Tab. 1.2).

Wie bereits erwähnt, liegt der Nachteil aller Glutathionderivate darin, dass sie aufgrund des Glutathionanteils anfällig für eine Spaltung durch γ -Glutamyltranspeptidasen sind. Um diese Inaktivierung zu verhindern, wurden diese Wirkstoffe weiterentwickelt und die labile γ -Glutamylpeptidbindung durch ein robustes Harnstoffisoster ersetzt [104]. Diese Modifikation schützt sowohl *S*-Arylglutathionderivate als auch *S*-(*N*-Aryl-*N*-hydroxycarbamoyl)glutathionderivate vor der Spaltung, verändert aber nicht die inhibitorische Effizienz [72,104]. Weitere chemische Modifikationen führten kürzlich zu der Entdeckung der ersten Inhibitoren mit einer starken Bindung im niedrigen nanomolaren Bereich [73].

Eine interessante Alternative zu Glutathionderivaten sind Wirkstoffe, die ebenfalls den Endiolübergangszustand nachahmen, aber keine Derivate des Glutathions sind und dadurch resistent gegen die Spaltung durch γ -Glutamyltranspeptidasen sind. Die ersten Substanzen dieser Art, die getestet wurden, waren Naphtoquinone sowie Cumarine (an hGloI) und Flavone sowie Tropolone (an GloI aus Hefe). Diese Sustanzen hemmten GloI im mittleren und

Inhibitor	<i>P. falciparum</i>		andere Organismen	
	K_i (μM)	IC_{50} (μM)	K_i (μM)	IC_{50} (μM)
<i>S-p</i> -Bromobenzylglutathion	20 ^[1]	5 ^[97]	0.08 - 0.27 ^[3,5,8]	8 ^[65] (HL60)
<i>S-N</i> -Hydroxy- <i>N</i> -bromophenylcarbamoylglutathion	0.06 ^[1]	-	0.014 ^[74]	3 ^[59] (L1210)
<i>S-N</i> -Hydroxy- <i>N</i> -chlorophenylcarbamoylglutathion	0.11 ^[1]	30 ^[1]	0.046 ^[74]	7 ^[59] (L1210)
Curcumin	?	5 ^[81] / 25 ^[34]	5 ^[86]	8 ^[86] (LPS-BC)
Methylgerfelin	?	?	0.23 ^[60]	3 ^[60] (MBMM)

Tabelle 1.2: IC_{50} und K_i -Werte verschiedener GloI-Inhibitoren. Die IC_{50} -Werte der Glutathionderivate wurden mit den jeweiligen Diethylestern bestimmt. HL60: human promyelocytic leukemia cells, L1210: mouse lymphocytic leukemia cells, LPS-BC: lipopolysaccharide-stimulated blood cells, MBMM: mouse bone marrow-derived macrophages.

niedrigen mikromolaren Bereich [19,40]. Tropolon-Derivate wurden auch in *P. falciparum* Zellkultur getestet und zeigten dabei teilweise eine Wirkung im niedrigen mikromolaren Bereich [12]. Flavone und andere Polyphenole wie Curcumin (aus der Pflanze *Curcuma longa*) wurden später auf ihre Wirkung auf hGloI sowie auf verschiedene Tumorzelllinien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Curcumin hGloI inhibiert und *in vivo* die Konzentration von Methylglyoxal erhöht, während die Konzentrationen von Glutathion und ATP sinken. Infolge dieser Konzentrationsänderungen kam es zum programmierten Zelltod [86]. Curcumin inhibierte ebenfalls das Wachstum von *P. falciparum*, jedoch wurde dieser Effekt nicht dem Glyoxalase-System zugeordnet [34,81] (Tab. 1.2). Ein weitere aussichtsreiche Substanz ist Methylgerfelin, ein Derivat des Gerfelins aus dem Pilz *Beauveria felina*, das als Inhibitor der Osteoklastogenese entdeckt wurde. Diese Wirkung scheint über die kompetitive Inhibition der GloI vermittelt zu werden [60] (Tab. 1.2).

1.3.2 Inhibition der Glyoxalase II

In *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass auch GloII (im Cytosol und in den Mitochondrien) benötigt wird, um einen optimalen Schutz vor toxischem Methylglyoxal zu erreichen. Nach der Zugabe von exogenem Methylglyoxal zu GloII-defizienten Hefestämmen kam es zu einem erheblichen Verlangsamung des Wachstums [17].

Auch bei GloII waren die ersten getesteten Inhibitoren *S*-Alkyl- und *S*-Arylglutathionderivate. *S*-Alkylglutathionderivate wie *S*-Methyl- oder *S*-Hexylglutathion zeigten keine

hemmende Wirkung auf GloII [102]. Auch die meisten *S*-Arylglutathionderivate, teilweise mit Modifikation an der Aminogruppe des Glutamats, wirkten nicht sehr effektiv. *S-p*-Bromobenzylglutathion inhibierte GloII im hohen mikromolaren Bereich, während *S*-Benzoxycarbonylglutathion einen K_i im niedrigen mikromolaren Bereich aufwies [2] (Tab. 1.3). Auf *P. falciparum* Zellkultur zeigte letztere Substanz kaum Wirkung [12], jedoch könnte der Grund dafür an der labilen γ -Glutamylpeptidbindung und/oder der fehlenden Veresterung liegen. Am besten eignete sich von den *S*-Arylglutathionderivaten *N,S*-di-benzoxycarbonyl-

Inhibitor	K_i (μM)
<i>S-p</i> -Bromobenzylglutathion	658 [2]
<i>S</i> -Benzoxycarbonylglutathion	13 [2]
<i>N,S</i> -di-benzoxycarbonylglutathion	6.3 [2]
<i>S</i> -Nitrobenzoxycarbonylglutathion	1.2 [4]
<i>N,S</i> -bisfluorenylmethoxycarbonylglutathion	0.75 [76]

Tabelle 1.3: K_i -Werte verschiedener GloII-Inhibitoren.

glutathion [2] oder *S*-Nitrobenzoxycarbonylglutathion [4] zur Inhibition von GloII (Tab. 1.3). Obwohl diese Substanzen hauptsächlich als Inhibitoren von GloII angesehen wurden, konnte auch eine ähnliche, teilweise sogar bessere Wirkung gegen GloI nachgewiesen werden [3,4]. Der stärkste Inhibitor bisher ist *N,S*-bisfluorenylmethoxycarbonylglutathion (Tab. 1.3). Dieser Inhibitor wurde auch als Diester auf C-51 (rat chloroleukaemia) Zellen getestet und zeigte je nach verwendetem Ester eine IC_{50} -Konzentration von 3 bis 100 μM [76].

S-(*N*-Aryl-*N*-hydroxycarbonyl)glutathionderivate wurden entwickelt, um sowohl GloI als auch GloII zu inhibieren. Diese Substanzen wirkten als kompetitive Inhibitoren der GloII und erreichten K_i -Werte zwischen 1.2 und 11 μM [74]. Bei Messungen mit den Isoenzymen aus *P. falciparum* ergab sich ein ähnliches Bild; *Pfc*GloII wurde mit einem K_i im Bereich von 0.5 und 6 μM und *Pft*GloII im Bereich von 20 und 185 μM gehemmt [1].

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Glyoxalasen aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* näher zu charakterisieren. Dabei teilte sich dieses Projekt in mehrere Fragestellungen auf:

(1) Wo sind die einzelnen Enzyme des Glyoxalasesystems von *P. falciparum* lokalisiert? Neben der Glyoxalase I wurden zwei Isoenzyme der Glyoxalase II identifiziert. Das erste Isoenzym wurde zusammen mit Glyoxalase I im Zytosol vermutet, während dem zweiten

Isoenzym eine mögliche N-terminale Signalsequenz für den Transport in den Apikoplasten zugeordnet wurde. Ein Teil dieser Arbeit befasste sich deshalb mit der Bestimmung der subzellulären Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Glyoxalasen aus *P. falciparum*.

(2) Welche Proteinstruktur haben die einzelnen Glyoxalasen von *P. falciparum*? Bislang ist keine Kristallstruktur der Glyoxalasen von *P. falciparum* publiziert worden. Besonders die Struktur der monomeren *PfGloI* im Vergleich zur homodimeren *hGloI* ist dabei von Interesse, da ein Sequenzalignment auf signifikante strukturelle Unterschiede deutet. Die Ermittlung der optimalen Kristallisationsbedingungen für *PfGloI* und *PfcGloII* stellte einen weiteren Teil dieser Arbeit dar. Außerdem war unklar, ob *GloI* mit *GloII* interagiert und dadurch die Umwandlung von toxischem Methylglyoxal erleichtert. Ein weiteres Ziel war somit die Untersuchung möglicher Protein-Protein-Interaktionen mittels verschiedener Methoden, unter anderem durch Pull-Down-Experimente oder chemische Proteinquervernetzung.

(3) Wie läuft die Katalyse von *cGloII* im Detail ab? Welche Aminosäurereste sind an der Bindung des Glutathionanteils beteiligt und welchen Einfluss hat die Bindung auf die Katalyse? Was ist die genaue Funktion von Arg154 in *PfcGloII*? Ist der Austausch von Lysin zu Arginin in *PfcGloII* für die vier- bis sechsfach höhere katalytische Effizienz im Vergleich zu *PftGloII* oder humane *GloII* verantwortlich? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden rekombinante *PfcGloII* WT und verschiedene Mutanten für eine detaillierte Analyse des Katalysemechanismus enzymkinetisch charakterisiert.

(4) Eignet sich das Glyoxalasesystem aus *P. falciparum* als Ziel für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Malaria? In letzter Zeit wurden neue, äußerst wirksame Inhibitoren der *GloI* identifiziert. Da *PfGloI* zwei unterschiedliche aktive Zentren aufweist, war es von besonderem Interesse, ob diese neuen Inhibitoren an eines oder an beide Zentren binden können und welche Auswirkungen die allosterische Kopplung auf die Inhibition haben könnte. In einem Teil der Arbeit wurde deshalb die Wirkung dieser neuen Inhibitoren auf *P. falciparum* in Zellkultur sowie auf rekombinante *PfGloI* untersucht. Zudem wurde mit den Vorarbeiten für Knock-Out Studien an *P. falciparum* begonnen. Hierfür wurden die entsprechenden Konstrukte kloniert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung, Firma
Autoklav	Varioclav [®] 400E, H + P Labortechnik
Geldokumentation	E.A.S.Y 440K + UV-Transilluminator UVT-28L, Herolab
Blotapparaturen	PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter, Peqlab Mini Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad
Brutschränke	Infors AG Heraeus, Thermo Scientific
Chromatographiesystem	Äkta Explorer, GE Healthcare
CD-Spektropolarimeter	Jasco J-810 Spektropolarimeter
Elektroporationssystem	Gene Pulser, Bio-Rad
Entwicklermaschine	Curix 60 [®] , Agfa-Gevaert
Feinwaagen	Sartorius
Gelkammern	Pe-R.Tec Peter Reiser Werkstatt Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis Cell, Bio-Rad
ICP-AES-Spektrometer	Varian Vista RL CCD-Simultan AES-ICP Spektrometer und Software ICP expert
Inkubatoren	Mytron
Inkubator Kristallisation	RUMED
Kolbenhubpipetten	PIPETMAN [®] P, Gilson
Magnetrührer	MR-Hei Standard, Heidolph Instruments
Multikanalpipetten	Research Pro, Eppendorf
Mikroskop	Axiostar Plus, Carl Zeiss
Quantifizierung	Image Scanner und Software Image Master 1D, Amersham Biosciences
Pipettierhilfe	Accu-jet [®] pro, Brand
pH-Meter	Basic meter PB-11, pH-Glasmembranelektrode PY-P10, Sartorius
Peristaltische Pumpe	P-1, GE Healthcare
Reinstwasseranlage	PureLab Plus, ELGA Labwater
Rotator	PTR-30, Grant-bio
Schüttler	Duomax 1030, Heidolph Instruments
Spannungsversorgung	Power Supply EPS 601, GE Healthcare

Gerät	Gerätebezeichnung, Firma
SPR-Photometer	Biacore X und Biacore X control software, GE Healthcare
Sterilbänke	Bakterienzellkultur: gelaire [®] BSB 3A, Plasmodien-Zellkultur: gelaire [®] BSB 6, Flow Laboratories
Thermostate	Thermomixer comfort, Eppendorf MBT 250, Kleinfeld Labortechnik
Thermozykler	Mastercycler gradient, Eppendorf
Tischzentrifuge	5417R, Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonoplus HD 2070, BANDELIN electronic
UV/Vis-Photometer	V-650 Spektrophotometer und Spectra Manager, JASCO
Vortex-Schüttler	Heidolph Instruments
Wasserbad	Julabo 7A, JULABO Labortechnik
Zentrifugen	Beckman Coulter Instruments

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Firma	Chemikalien (p.A.) und Verbrauchsmaterialien
Applichem	Ampicillin, Methanol, Imidazol
BD	Kanamycin, Hefeextrakt, Trypton
Bio-Rad	anti-mouse HRP Konjugat, APS, Bradfordreagenz, Poly-Prep Chromatography Columns
Carl Roth	Agar, Ethidiumbromid, LB & LB-Agar (Luria/Miller) komplett, Tris
c.c.pro	Gentamycin, Hypoxanthin
Corning	48-Well Zellkulturplatte
DAKO	anti-rabbit-Cy3
Fermentas	dNTPs, MW protein marker unstained, Pfu DNA Polymerase
Fischer-Sehner	WB Filme Fuji Super RX (13x18)
GE Healthcare	IgG-Sepharose 6 Fast Flow, HMW und LMW Gelfiltrationsstandard
Gerbu	MOPS
Gibco	Kanamycin, RPMI 1640
Greiner	96 well CrystalQuick, Röhrchen (15 und 50 ml), Zellkulturschalen (94 × 16 mm)
Hellma	Quarzglasküvetten
Invitrogen	Albumax II, Hoechst 33258
Metabion	Primer
New England Biolabs	100 bp und 1 kb DNA-Leiter, Crimson-Taq-, Phusion- und Taq-Polymerase, Restriktionsenzyme, Shuffle T7, T4 DNA Ligase
Novagen	<i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>E. coli</i> NovaBlue
Qiagen	NeXtal Suites, Penta-His Antikörper, <i>E. coli</i> XL1-Blue, Ni-NTA-Agarose
Peske	Kryoröhrchen
Pierce	DSG, DSS (Lagerung im Exsikkator bei 4°C)
Roche	DNase I, Proteinase K

Firma	Chemikalien (p.A.) und Verbrauchsmaterialien
Sarstedt	Reaktionsgefäße, Serologische Pipetten, Halbmikroküvetten, Petrischalen
Serva	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 30%(w/v), Agarose, BSA Fraktion V, IPTG, Lysozym, Ponceau S, SDS, TEMED
Sigma-Aldrich	β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Curcumin, Ethanol (absolut), Glutaraldehyd, Glycerin, GSH, Luminol, MES, Methylglyoxal, RbCl, RNase A, <i>p</i> -Cumarinsäure, <i>S</i> -Hexylglutathion, <i>S</i> -Hexylglutathion-Agarose, <i>S</i> -D-Lactoylglutathion, Tween-20
Steinbrenner	Pipettenspitzen

Alle übrigen Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Merck bezogen. Ethanol, Isopropanol und Methanol wurden von der Chemikalienausgabe der LMU München bezogen.

2.1.3 Bakterienstämme

Folgende *E. coli* Stämme wurden zur Klonierung oder Proteinexpression verwendet:

Name	Beschreibung
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'</i> [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>Z</i> Δ <i>M15::Tn10</i>] (Tet ^R)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacI</i> ^q <i>Z</i> Δ <i>M15 Tn10</i>] (Tet ^R)
Shuffle T7	<i>F'</i> <i>lac, pro, lacI</i> ^Q / Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> Δ (<i>phoA</i>) <i>PvuII phoR ahpC* galE</i> (or <i>U</i>) <i>galK</i> λ <i>att::pNEB3-r1-cDsbC</i> (Spec ^R , <i>lacI</i> ^q) Δ <i>trxB rpsL150</i> (Str ^R) Δ <i>gor</i> Δ (<i>malF</i>)3
BL21 (DE3)	<i>F'</i> <i>ompT hsdS_B</i> ($r^-_B m^-_B$) <i>gal dcm</i> (DE3)

2.1.4 Primer

Folgende Primer wurden zur Klonierung oder ortsgerichteten Mutagenese verwendet:

Name und Schnittstelle	Sequenz
ProtA-His-s	5'-GGATCCGAATTCGAGCTCGACGTCGACAAGCTTGC-3'
ProtA-His-as	5'-GCAAGCTTGTGCGACGTCGAGCTCGAATTCGGATCC-3'
pET28-ProtA-NcoI-s	5'-CATGCCATGGTGGACAACAAATTC AAC-3'
pET28-ProtA-BamHI-as	5'-CTAGGGATCCGTTGACTTCCCGG-3'
pet28-PfGloI-s-NcoI	5'-CATGCCATGGCACAAGAAATATCAAATTTAGTAAAG-3'
pet28-PfGloI-as-XhoI	5'-CCCGCTCGAGTTTTGCAATAAATGAAGTGTC-3'
PfGloI-110-277-NcoI-s	5'-CATGCCATGGATAGAGGATTTGGACATATTGC-3'
PfGloI-110-277-XhoI-s	5'-CCCGCTCGAGATGATTGTGTGTTAATTCTAGAACG-3'
PfGloI-111-277-BamHI-s	5'-CGCGGATCCAGAGGATTTGGACAATTTGCATTTAATTG-3'
PfGloI-111-277-HindIII-as	5'-CCCCAAGCTTCTAATGATTGTGTGTTAATTCTAGAACGGG-3'
PfGloI-3-s-KO-NcoI	5'-GACTCCATGGCGTTCTAGAATTAACACACAATCATGGTAC-3'
PfGloI-3-as-KO-AvrII	5'-GACTCCTAGTTATTTTGCAATAAATGAAGTGCCCGTTG-3'

Name und Schnittstelle	Sequenz
PfGloI-5-s-KO-SpeI	5'-GACTACTAGTATTGCACAAGAAATATCAAATTTAGTAAAGAAG-3'
PfGloI-5-as-KO-BamHI	5'-GACTGGATCCGACTATTATGATTATATGTAAGTTCCAAGC-3'
PfGloI-GFP-s-BamHI	5'-GACTGGATCCATGGCACAAGAAATATCAAATTTAGTAAAG-3'
PfGloI-GFP-as-AvrII + <i>Linker</i>	5'-GACTCCTAGGacctgctgcTTTTGCAATAAATGAAGTGCCCGTTG-3'
PfcGloII-3-s-KO-EcoRI	5'-GACTGAATCTGGGTGTGGAAGATTTTTGAAGGAAGTGC-3'
PfcGloII-3-as-AvrII	5'-GACTCCTAGGTAAAAATTTATTTTTAATTGTCTTAATTTATC-3'
PfcGloII-5-s-KO-SpeI	5'-CGCAACTAGTATTAAGGTATTGTATTATATAAATAAATG-3'
PfcGloII-5-as-KO-BamHI	5'-GACTGGATCCTACTTTATCTGGTCTACTGGGTCTATAGAAGC-3'
PfcGloII-GFP-s-BamHI	5'-GACTGGATCCATGAAGCCATGCGCACAAAGTACTTTGTAGTGC-3'
PfcGloII-GFP-as-AvrII + <i>Linker</i>	5'-GACTCCTAGGacctgctgcAAAAATTTTAAATTTGTCTTAATTTATC-3'
PfcGloII R154K s	5'-GTTTATAGCTGGGTGTGGAATTTTTTTGAAGGAAGTGC-3'
PfcGloII R154K as	5'-GCACTTCCTTCAAAAAATTTCCACACCCAGCTATAAAC-3'
PfcGloII R154M s	5'-GTTTATAGCTGGGTGTGGAATTTTTTTGAAGGAAGTGC-3'
PfcGloII R154M as	5'-CCTTTGCACTTCCTTCAAAAAACATTTCCACACCCAGCTATAAAC-3'
PfcGloII R257D s	5'-GAAATAAAAAATTTAGATAAATTAGATCAATTAATAAATAATTTTTAAGAGC-3'
PfcGloII R257D as	5'-GCTCTTAAAAATTTTAAATTTGATCTAATTTATCTAATTTTTTATTC-3'
PfcGloII K260Q s	5'-GATAAATTAAGACAATTACAAAATAATTTTTAAGAGCTCGG-3'
PfcGloII K260Q as	5'-CCGAGCTCTTAAAAATTTTGTAAATGTCTTAATTTATC-3'
PfcGloII R257Q/K260Q s	5'-GATAAATTAACAACAATTACAAAATAATTTTTAAGAGCTCGG-3'
PfcGloII R257Q/K260Q as	5'-CCGAGCTCTTAAAAATTTTGTAAATGTCTTAATTTATC-3'
PfcGloII D62N s	5'-GCACACATCATATATAATCATTTCAGGTGGAATATTCG-3'
PfcGloII D62N as	5'-CGAATATTCCACCTGAATGATATAATGATGATGTGTGC-3'
PfcGloII H183Q s	5'-GGAAACATTAATATATGCGGACAAGAGTATACCC-3'
PfcGloII H183Q as	5'-GGGTATACTTTGTCCGCAATATATAATGTTCC-3'
PftGloII-5-s-KO-SpeI	5'-GACTACTAGTATTAGATTTCTTAAAACATTTTCTTTAAATTTGTC-3'
PftGloII-5-as-BamHI	5'-GACTGGATCCATCAACAACAATACCTTCCTCTTTATCATC-3'
PftGloII-3-s-KO-EcoRI	5'-GACTGAATTCGATAATTTAAAATTTGCTTTAACTGTTGATAG-3'
PftGloII-3-as-AvrII	5'-GACTCCTAGGTATGAGGCTTTAAAATTTATCCTTCATTAATC-3'
PftGloII-GFP-s-BamHI	5'-GACTGGATCCATGAGATTTCTTAAAACATTTTCTTTAAATTTGTC-3'
PftGloII-GFP-as-AvrII + <i>Linker</i>	5'-GACTCCTAGGacctgctgcTGAGGCTTTAAAATTTATCCTTCATTAATCTTAATATG-3'

2.1.5 Plasmide und Konstrukte

Plasmid/Konstrukt	Beschreibung	Herkunft
pQE30	Amp ^R , N-terminaler MRGSH ₆ GS(His)-Tag, T5-Promoter	Qiagen
pET-28	Kan ^R , N- und C-terminaler His ₆ -Tag, T7-Tag, T7-Promoter	Novagen
pET-28-ProtA	Kan ^R , N-terminaler ProtA-Tag, T7-Promoter	diese Arbeit
pET-28-ProtA _{His}	Kan ^R , ProtA mit C-terminalem His ₆ -Tag, T7-Promoter	diese Arbeit
pQE30 <i>GLOI</i>	<i>PfGloI</i> (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), N-terminaler His-Tag	[56]
pET-28 <i>GLOI</i>	<i>PfGloI</i> (<i>Nco</i> I/ <i>Xho</i> I), C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pQE30 <i>GLOI</i> ₁₁₁₋₂₇₇	<i>PfGloI</i> AS 111-277 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pET-28 <i>GLOI</i> ₁₁₀₋₂₇₇	<i>PfGloI</i> AS 110-277 (<i>Nco</i> I/ <i>Xho</i> I), C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pET-28-ProtA <i>GLOI</i>	<i>PfGloI</i> (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), N-terminaler ProtA-Tag	diese Arbeit
pQE30 <i>cGLOII</i>	<i>PfcGloII</i> (<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I), N-terminaler His-Tag	[1]
pET-28-ProtA <i>cGLOII</i>	<i>PfcGloII</i> (<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I), N-terminaler ProtA-Tag	diese Arbeit

Plasmid/Konstrukt	Beschreibung	Herkunft
pQE30 tGLOII-N	<i>PftGloII</i> Δ AS 1-56 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), N-terminaler His-Tag	[1]
pET-28-ProtA tGLOII-N	<i>PftGloII</i> Δ AS 1-56 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), N-terminaler ProtA-Tag	diese Arbeit
pARL-1a	<i>hdhfr</i> zur positiven Selektion, crt-Promoter	[31] *
pHH ₂	<i>hdhfr</i> zur positiven Selektion, GFP, hsp86-Promoter	[107] *
pHTK	<i>hdhfr</i> zur positiven Selektion, <i>tk</i> zur negativen Selektion	[41] *
pARL <i>GLOI-GFP</i>	Expression von <i>PfGloI</i> (<i>Xho</i> I), C-terminales GFP	diese Arbeit
pARL <i>cGLOII-GFP</i>	Expression von <i>PfcGloII</i> (<i>Xho</i> I), C-terminales GFP	diese Arbeit
pARL <i>tGLOII-GFP</i>	Expression von <i>PftGloII</i> (<i>Xho</i> I), C-terminales GFP	diese Arbeit
pHH ₂ <i>GLOI-GFP</i>	Expression von <i>PfGloI</i> (<i>Bam</i> HI/ <i>Avr</i> I) mit C-terminalem GFP	diese Arbeit
pHH ₂ <i>cGLOII-GFP</i>	Expression von <i>PfcGloII</i> (<i>Bam</i> HI/ <i>Avr</i> I) mit C-terminalem GFP	diese Arbeit
pHH ₂ <i>tGLOII-GFP</i>	Expression von <i>PftGloII</i> (<i>Bam</i> HI/ <i>Avr</i> I) mit C-terminalem GFP	diese Arbeit
pHTK-GloI	Einführung eines <i>PfGLOI</i> knock-out	diese Arbeit
pHTK-cGloII	Einführung eines <i>PfcGLOII</i> knock-out	diese Arbeit
pHTK-tGloII	Einführung eines <i>PftGLOII</i> knock-out	diese Arbeit

* freundlicherweise von Prof. Alan Cowman zur Verfügung gestellt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Präparation aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte im kleinen Maßstab (Minipräparation) mittels Alkalischer Lyse (nach Birnboim und Doly [15]). Dazu wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur abzentrifugiert (16000 × g, 1 min) und das Pellet in 100 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2-Puffer wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig fünfmal invertiert und bis zur erfolgreichen Lyse der Bakterien bei RT inkubiert (maximal 5 min). Danach wurde das Lysat mit 150 µl eiskaltem P3-Puffer versetzt, vorsichtig durch Invertieren gemischt und der entstandene Niederschlag durch Zentrifugation (16000 × g, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Der klare Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Hilfe von 600 µl Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (16000 × g, 5 min, 4 °C) wurde das DNA-Pellet mit 600 µl eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol (bei -20 °C gelagert) gewaschen, wie zuvor abzentrifugiert und unter Rotlicht vollständig getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 µl sterilem H₂O_{dd} gelöst. Im großen Maßstab (Maxipräparation) wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System nach Angaben des Herstellers isoliert.

P1-Puffer 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.1 mg/ml RNase A (Lagerung 4 °C)

P2-Puffer 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer 3 M Kaliumacetat/HAc, pH 5.2 (Lagerung 4 °C)

2.2.2 Polymerasekettenreaktion und ortsgerichtete Mutagenese

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente oder die Einführung von Punktmutationen (= ortsgerichtete Mutagenese) verwendet. In ein Gesamtvolumen von 50 µl wurden DNA-Template, Primer, dNTPs, Puffer und Polymerase nach den Konzentrationsangaben des Herstellers zusammenpipettiert. Um unerwünschte Effekte wie Fehlhybridisierung der Primer zu verhindern, wurde der PCR-Ansatz bis zum Start der PCR auf Eis gehalten und erst in den Thermozykler gegeben, sobald die Starttemperatur von 95 °C erreicht wurde. Die PCR wurde üblicherweise nach folgendem Schema durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	primerbedingt	30 - 60 sec	20 - 25×
Elongation	68 °C	polymerasebedingt	
	68 °C	5 min	

Zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur wurde mit dem Programm OligoCalc (auf <http://www.justbio.com>) die Schmelztemperatur T_m der verwendeten Primer ermittelt und bei der ersten PCR wurden drei Ansätze mit einer Annealingtemperatur von $T_m \pm 5$ °C getestet. Die Elongationsdauer der PCR berechnete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der verwendeten Polymerase. Bei Verwendung einer Polymerase ohne proofreading-Aktivität wurden ca. 0.5 - 1 min/kb und bei Verwendung einer Polymerase mit proofreading-Aktivität ca. 1 - 2 min/kb kalkuliert (die genauen Werte wurden jeweils aus den Angaben des Herstellers entnommen).

2.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Aufreinigung wurden DNA-Fragmente durch horizontale Agarosegelelektrophorese in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße wurden Gele einer Konzentration von 1 - 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer unter Zusatz von 1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 6× Ladebuffer versetzt und zusammen mit

Größenstandards (1 kb DNA-Leiter oder 100 bp DNA Leiter) auf das Agarosegel aufgetragen. Die Trennung wurde bei einer angelegten Feldstärke von 5 - 10 V/cm (bezogen auf den Abstand der Elektroden) durchgeführt. Der Nachweis der DNA-Banden im Agarosegel erfolgte mittels UV-Detektion. Zur Aufreinigung präparativ verdauter DNA-Fragmente bzw. amplifizierter DNA wurde diese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des Promega Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

1 × TAE 40 mM Tris/HAc, 1 mM EDTA, pH 7.6

6 × Ladepuffer 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Orange G, 40 % (v/v) Glycerin

2.2.4 DNA-Restriktionsverdau

Der DNA-Restriktionsverdau wurde mit den Restriktionsenzymen und den entsprechenden Puffern und Zusätzen der Firma New England Biolabs durchgeführt. Bei einem analytischen Restriktionsverdau wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl entweder 15 µl gereinigte PCR oder 0.2 - 1 µg Plasmid-DNA und 4 - 20 U der entsprechenden Restriktionsenzyme eingesetzt. Für einen präparativen Ansatz wurden entweder 40 µl gereinigte PCR oder 1 - 5 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl verdaut. Bei einem Einfachverdau (1 Enzym) wurde der Ansatz 1 - 2 h lang bei 37 °C inkubiert, bei einem Doppelverdau (2 Enzyme) wurde der optimale Puffer für beide Enzyme ermittelt (NEB Double Digest Finder, <http://www.neb.com>) und 2 - 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde beim präparativen Verdau entsprechend der eingesetzten DNA-Menge verlängert. Der Restriktionsverdau wurde anschließend entweder auf einem Agarosegel analysiert oder mit dem Promega Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System von den Restriktionsenzymen gereinigt.

2.2.5 Ligation

Die Ligation von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl entweder mit Hilfe der T4 DNA Ligase oder der Quick Ligase nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers. Für die Ligation wurden 50 - 100 ng Vektor mit dem 10-fachen molaren Überschuss an Insert eingesetzt. Der 10-fache molare Überschuss wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = \frac{10 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]}$$

2.2.6 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Alle Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden vor Gebrauch entweder steril filtriert oder autoklaviert. *E. coli* XL1-Blue wurde in Anwesenheit von 10 µg/ml Tetrazyklin angezogen, während *E. coli* BL-21 ohne Antibiotikum inkubiert wurde.

Elektrokompetente *E. coli* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden bei -80 °C aufbewahrte Zellen aufgetaut, in 100 ml LB überführt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 wurden die Zellen 5 min auf Eis abgekühlt, in einen gekühlten, sterilen Zentrifugenbecher umgefüllt und anschließend abzentrifugiert (2600 × g, 5 min, 4 °C). Danach wurde das Pellet in 100 ml eiskaltem H₂O_{dd} resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 100 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, in 50 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* wurde nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Dazu wurden bei -80 °C aufbewahrte Zellen aufgetaut, in 250 ml LB überführt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 wurden die Zellen 5 min auf Eis abgekühlt, in einen gekühlten, sterilen Zentrifugenbecher umgefüllt und anschließend abzentrifugiert (2600 × g, 5 min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 75 ml eiskaltem TFBI resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension erneut abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml eiskaltem TFBII resuspendiert und diesmal für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten Bakterienzellen in 50 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TFBI 30 mM Kaliumacetat/HAc pH 5.8, 10mM CaCl₂, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂,
15 % (v/v) Glycerin

TFBII 10 mM Hepes/KOH pH 6.5, 10 mM RbCl, 15 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin

2.2.7 Transformation kompetenter *Escherichia coli*

Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Elektroporation von *E. coli* Bakterien wurde ein Aliquot elektrisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0.5 - 5 µl DNA (Plasmid oder Ligationsansatz) gemischt und für

5 min inkubiert. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in eine sterile, gekühlte Elektroporationsküvette (0.2 cm Elektrodenabstand) pipettiert und einem elektrischen Puls von 2,5 kV bei einem Widerstand von 400 Ω und einer Kapazität von 25 μ F ausgesetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort mit 500 μ l SOC-Medium versetzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 bis 45 min bei 37 °C geschüttelt.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 - 3 μ l Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen hitzeschockbehandelt (40 sec bei 42 °C) und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 250 μ l SOC-Medium zu den Zellen gegeben und 45 - 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Selektion positiver Transformanden

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension kurz abzentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 μ l verworfen und die Zellen im verbliebenen Medium resuspendiert. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum (Stamm 3D7) wurde in RPMI-Medium bei einem Hämatokrit von 3.5 % in Zellkulturschalen bis zu einer maximalen Parasitämie von 10 % kultiviert (nach Trager und Jensen [100]). Es wurde Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe A verwendet und die Kultur bei 5 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂, 80 % Feuchte inkubiert. Das RPMI-Medium wurde täglich gewechselt bzw. bei hoher Parasitämie wurde die Kultur auf die gewünschte Parasitämie verdünnt. Sofern nur ein Wechsel des RPMI-Mediums nötig war, wurde das alte Medium vorsichtig über den sedimentierten Erythrozyten abgenommen, das gleiche Volumen frisches, auf 37 °C temperiertes Medium zugegeben und die Erythrozyten vorsichtig resuspendiert. Zum Verdünnen einer hohen Parasitämie wurde frisches, vorgewärmtes RPMI-Medium in einer neuen Kulturschale vorgelegt, das der Verdünnung entsprechende Volumen der alten Kultur zugefügt und mit frischen Erythrozyten versetzt, um wieder einen Hämatokrit von 3.5 % zu erhalten.

RPMI-Medium RPMI 1640 + 0.2 mM Hypoxanthin, 2.7 μ g/ μ l Gentamycin,
0.45 % (w/v) Albumax II (Lagerung bei 4 °C)

2.3.2 Bestimmung der Parasitämie und Morphologie

Zur Bestimmung der Parasitämie und zur Unterscheidung der einzelnen Parasitenstadien wurden Blutaustriebe angefertigt. Dafür wurde eine 1 ml Pipette schräg abgeflammt, die Kulturschale leicht gekippt und vom Erythrozytenbelag ein Tropfen mit Hilfe der Pipette abgenommen. Dieser Tropfen wurde auf einen Objektträger (mit geschliffenem Rand) übertragen und mit einem weiteren Objektträger, der im Winkel von 30 - 45° angelegt wurde, ausgestrichen. Der Ausstrich wurde anschließend für 1 min in Methanol fixiert, an der Luft getrocknet und in 5 % (v/v) Giemsa-Lösung für 30 min angefärbt. Danach wurde der angefärbte Ausstrich kräftig mit entionisiertem H₂O gespült, trocken getupft und bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Zur Bestimmung der Parasitämie wurde innerhalb des Zählrasters die Anzahl der (einlagigen) Erythrozyten sowie die Anzahl der infizierten Erythrozyten ermittelt und an mehreren Stellen im Ausstrich wiederholt, bis insgesamt ca. 600 bis 900 Erythrozyten gezählt wurden.

Parasitämie (%) = $100 \times \text{Anzahl Erythrozyten}_{\text{infiziert}} / \text{Anzahl Erythrozyten}_{\text{gesamt}}$

2.3.3 Sorbitol-Synchronisation

Parasiten wurden mit leichten Abweichungen [80] nach der Methode von Lambros und Vanderberg [63] mit Sorbitol synchronisiert. Dafür wurde zuerst das Sorbitol (5 % (w/v), sterilfiltriert) für 5 min bei 37 °C im Wasserbad aufgewärmt. Währenddessen wurden die infizierten Erythrozyten durch Zentrifugation (250 × g, 5 min, RT) geerntet. Anschließend wurde das Pellet im zehnfachen Volumen Sorbitol für 30 sec kräftig resuspendiert, für 8 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und danach nochmals für 15 sec kräftig gemischt. Die Erythrozyten wurden erneut abzentrifugiert (250 × g, 5 min, RT), der Überstand mit den lysierten Erythrozyten entfernt und das Pellet mit 10 ml RPMI gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 14 ml RPMI resuspendiert und in eine frische Kulturschale ausgesät.

2.3.4 Saponin-Lyse

Bei der Saponin-Lyse (modifiziert nach Hsiao *et al.* [55]) wurde die Erythrozytensuspension abzentrifugiert (250 × g, 5 min, RT) und das Pellet in 4.5 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 0.5 ml 0.2 % (w/v) Saponin (in PBS) folgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Eine erfolgreiche Lyse wurde durch den Wechsel von trüb zu klar sichtbar. Danach wurden die lysierten Erythrozyten zentrifugiert (570 × g, 3 min, RT) und das Parasitenpellet

zweimal in 5 ml PBS gewaschen (Zentrifugation $570 \times g$, 3 min, RT), bis der Überstand nicht mehr rötlich erschien. Das Pellet wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 1 ml PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation ($2000 \times g$, 2 min, RT) wurde das Pellet im entsprechenden Puffer gelöst oder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

1 × PBS 1.84 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4

2.3.5 Einfrieren von Parasiten

Zum Einfrieren [80] von *P. falciparum* wurden synchronisierte Parasiten im Ringstadium bei einer Parasitämie von mindestens 5 % verwendet. Die infizierten Erythrozyten wurden durch Zentrifugation ($250 \times g$, 5 min, RT) geerntet und das Pellet wurde tropfenweise im gleichen Volumen Einfrierlösung resuspendiert. Je 500 - 600 μl wurden zügig in ein Kryoröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfrierlösung 28 % (v/v) Glycerin, 0.65 % (w/v) NaCl, 3 % (w/v) Sorbitol, sterilfiltriert
(Lagerung bei -20°C)

2.3.6 Auftauen von Parasiten

Für das Auftauen der Parasiten [80] wurden zuerst die bei -20°C gelagerten Lösungen A - C und RPMI im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Danach wurde das Kryoröhrchen mit den infizierten Erythrozyten aus dem Stickstofftank entnommen und für 2 - 3 min im Wasserbad (RT) aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt in ein 50 ml Röhrchen überführt und tropfenweise mit 0.2 ml Lösung A versetzt. Danach wurde tropfenweise und unter vorsichtigem Schütteln das neunfache Volumen an Lösung B zugefügt. Die Zellen wurden abzentrifugiert ($250 \times g$, 5 min, RT) und das Erythrozytenpellet wiederum tropfenweise mit dem neunfachen Volumen an Lösung C resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml RPMI-Medium gewaschen, nochmals zentrifugiert, in 14 ml RPMI-Medium aufgenommen und in eine frische Kulturschale überführt. Zudem wurden 0.5 ml frische Erythrozyten der Kultur zugegeben, um eine ausreichende Versorgung mit Erythrozyten zu gewährleisten.

Lösung A 12 % (w/v) NaCl, sterilfiltriert

Lösung B 1.6 % (w/v) NaCl, sterilfiltriert

Lösung C 0.9 % (w/v) NaCl, 0.2 % (w/v) Glucose, sterilfiltriert

2.3.7 Zellkultur-Experimente mit Glyoxalase Inhibitoren

Die Wirkung verschiedener Glyoxalase Inhibitoren auf *P. falciparum* wurde durch Auszählen von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen und/oder mittels Lactat-Dehydrogenase-Assay bestimmt. Dabei wurden sowohl synchronisierte (im Ring-Stadium) als auch asynchrone Parasiten verwendet.

Zur Bestimmung des IC_{50} mittels Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen wurden 48-Well Platten vorbereitet. Pro Well wurden 150 μ l RPMI-Medium vorgelegt und der Inhibitor stufenweise verdünnt. Anschließend wurden 150 μ l infizierte Erythrozyten mit einer Parasitämie von 0.5 % und einem Hämatokrit von 3 % (= End-Hämatokrit 1.5 %) hinzupipettiert. Als Kontrolle dienten infizierte Erythrozyten ohne Inhibitor sowie uninfizierte Erythrozyten mit und ohne Inhibitor. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden Blutaussstiche angefertigt und die Parasitämie bestimmt. Um die Wirkung des Inhibitors auf Erythrozyten zu ermitteln, wurden uninfizierte Erythrozyten in einer Neubauer-Kammer ausgezählt sowie der Überstand photometrisch bei 405 nm auf die Freisetzung von Hämoglobin untersucht.

Für den Lactat-Dehydrogenase-Assay (nach Makler *et al.* [67]) wurden 92-Well Platten vorbereitet. Pro Well wurden 100 μ l RPMI-Medium vorgelegt und der Inhibitor stufenweise verdünnt. Anschließend wurden 100 μ l infizierte Erythrozyten mit einer Parasitämie von 0.4 % und einem Hämatokrit von 4 % (= End-Hämatokrit 2 %) hinzupipettiert. Als Kontrolle dienten infizierte Erythrozyten ohne Inhibitor sowie mit einer stufenweisen Verdünnung des Dihydrofolatreduktaseinhibitors WR99210 (1 μ M bis 0.5 nM). Zusätzlich wurden unbehandelte uninfizierte Erythrozyten verwendet, um die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase aus Erythrozyten abziehen zu können. Die Platten wurden dann für 72 h inkubiert, da sich Trophozoiten besser für die Messung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität eignen.

2.3.8 Transfektion und Selektion

Die Transfektion der pHH₂- und der pARL-GFP Konstrukte erfolgte in Zusammenarbeit mit Jude Przyborski (Marburg) durch Elektroporation infizierter Erythrozyten der Blutgruppe 0 (nach [43]). Anschließend wurde mit 2.5 nM WR99210 auf positive GFP-Transfektanden selektioniert.

Die Transfektion der pHTK-Konstrukte erfolgte in Zusammenarbeit mit Cecilia Sanchez (Heidelberg) durch Elektroporation inizierter Erythrozyten der Blutgruppe A (nach [31]). Die Selektion auf einen erfolgreichen Knock-out wird derzeit von Romy Alisch (Heidelberg) weitergeführt.

2.3.9 Immunfluoreszenzanalyse und Live-Cell-Imaging

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die mit GFP-Konstrukten infizierten Erythrozyten leicht abgewandelt nach Tonkin *et al.* [98] fixiert. Es wurden 20 - 100 μ l Erythrozyten durch Zentrifugation ($400 \times g$, 5 min) geerntet, in 1 ml Fixierlösung resuspendiert und unter leichtem Schütteln für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert ($400 \times g$, 1 min) und in 1 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min (RT, Roller) wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Quenching Puffer resuspendiert und wiederum für mindestens 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Erythrozyten in 1 ml Blockierlösung für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation über Nacht in 1 ml Erstantikörperlösung (rabbit anti-ACP, 1:500 in Blockierlösung, bereitgestellt von Prof. McFadden). Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und 3×10 min in PBS gewaschen. Danach wurde für mindestens 2 h (RT) in 1 ml Zweitantikörper (anti-rabbit-Cy3, 1:2000 in Blockierlösung) inkubiert. Die Erythrozyten wurden erneut abzentrifugiert und 3×10 min in PBS gewaschen. Im letzten Waschschrift wurden $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hoechst 33258 zugefügt. Anschließend wurden Bilder von lebenden (bei 37°C) oder immunfixierten Zellen (bei RT) von Jude Przyborski mit einem Zeiss Cell Observer aufgenommen, die einzelnen Bilder wurden in Image J64 (version 1.43b, von <http://rsb.info.nih.gov/ij>) importiert, zu 8-bit Grauskalierung konvertiert, einer Hintergrundsubtraktion unterzogen und anschließend überlagert. Zur Erstellung der Abbildungen wurden die TIF-Dateien von Jude Przyborski in Powerpoint (Microsoft) zusammengestellt und die Folie wieder als TIF-Datei exportiert. Es wurde keine Gammakorrektur auf die Bilder angewandt und alle Ergebnisse wurden in Übereinstimmung mit Rossner und Yamada [84] präsentiert.

Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd, 0.0075 % Glutaraldehyd in $1 \times$ PBS
Permeabilisierungspuffer	0.1 % (v/v) Triton X-100 in $1 \times$ PBS
Quenching Puffer	125 mM Glycin in $1 \times$ PBS
Blockierlösung	3 % (w/v) BSA in $1 \times$ PBS

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

Das Kulturmedium wurde je nach verwendetem Plasmid mit folgenden Antibiotika-Konzentrationen (AB) versetzt: Für pQE30-Plasmide wurden $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und für

pET-28-Plasmide wurden 25 µg/ml Kanamycin verwendet. Alle verwendeten Puffer wurden bei 4 °C gelagert. Alle Reinigungsfraktionen wurden auf Eis aufgefangen und gelagert.

Expression in *E. coli*

Für die Expression wurde ein Klon von einer frischen LB_{AB}-Platte im entsprechenden LB-Medium unter der Sterilbank angeimpft (1 Klon/2 L Kultur) und bei 37 °C im Schüttler (130 rpm) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vorkultur in der jeweiligen Verdünnung zu insgesamt 2 L LB-Medium gegeben und bei der für die Expression geeigneten Temperatur unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.3 wurde ZnSO₄ (Endkonzentration: 1 mM) zugegeben. Sobald eine OD₆₀₀ von 0.5 erreicht wurde, wurde mit IPTG in der gewünschten Endkonzentration induziert. Nach Ablauf der entsprechenden Expressionsdauer wurden die Bakterienzellen geerntet (4000 × g, 15 min, 4 °C). Das Zellpellet von 2 L Kultur wurde im entsprechenden eisgekühlten Puffer resuspendiert, in 50 ml Röhrchen umgefüllt, erneut abzentrifugiert (4000 × g, 10 min, 4 °C) und bei -20 °C gelagert.

Konstrukt	LB-Medium + Temperatur	Verdünnung Vorkultur	Induktion + Dauer	Puffer zum Resuspendieren
pQE30 <i>GLOI</i> pET-28 <i>GLOI</i> pQE30 <i>GLOI</i> ₁₁₁₋₂₇₇ pET-28 <i>GLOI</i> ₁₁₀₋₂₇₇	LB _{AB} -Mg-MOPS, 30 °C	1:50 - 1:100	0.3 mM IPTG, über Nacht	MOPS Puffer I
pET-28-ProtA _{His} pET-28-ProtA <i>GLOI</i> pET-28-ProtA c <i>GLOII</i> pET-28-ProtA t <i>GLOII</i> -N pQE30 c <i>GLOII</i> pQE30 t <i>GLOII</i> -N	LB _{AB} , 37 °C	1:20 - 1:40	0.5 mM IPTG, 4 h	MOPS-Puffer A

LB-Mg-MOPS 5 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 8 mM MgSO₄, 10 mM MOPS, pH 7.5

MOPS-Puffer I 10 mM MOPS, pH 7.8

MOPS-Puffer A 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7.8

Zellaufschluss

Das Zellpellet von 2 L Kultur wurde in 10 ml des entsprechenden eisgekühlten Puffers resuspendiert und mit 10 mg Lysozym und einer Spatelspitze DNase versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis (unter Rühren) wurde das Zelllysat noch mit Ultraschall behandelt und anschließend abzentrifugiert (30500 × g, 30 min, 4 °C).

rekombinantes Protein	Puffer zum Resuspendieren	Einstellungen Ultraschall
His-GloI, ProtA-GloI	MOPS-Puffer I	3 × 10 sec mit 10 sec Pause, 30 % Leistung, Pulsstufe 3
His-cGloII	MOPS-Puffer B1	4 × 10 sec mit 10 sec Pause, 30 % Leistung, Pulsstufe 4
ProtA-cGloII	MST-Puffer	4 × 10 sec mit 10 sec Pause, 30 % Leistung, Pulsstufe 4

MOPS-Puffer B1 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7.8

MST-Puffer 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20, pH 7.8

Reinigung von His-GloI oder ProtA-GloI

Nach der Zentrifugation wurde das Zellysate mit 10 M NaOH auf pH 7.8 eingestellt und 2 × langsam auf mit MOPS-Puffer I voräquillibrierte S-Hexylglutathionagarose aufgetragen, gefolgt von einem Waschschriff mit 10 Säulenvolumen MOPS-Puffer II. Eluiert wurde mit 3 × 2 ml 5 mM S-Hexylglutathion (gelöst in MOPS-Puffer II, pH auf 7.8 nachgestellt). ProtA-GloI wurde weiter mittels Gelfiltration gereinigt. His-GloI wurde anschließend 2 × langsam auf mit MOPS-Puffer III voräquillibrierte Ni-NTA-Agarose aufgetragen, gefolgt von einem Waschschriff mit 10 Säulenvolumen MOPS-Puffer III. Eluiert wurde mit 3 × 1.5 ml MOPS-Puffer IV.

MOPS-Puffer II 10 mM MOPS, 200 mM NaCl, pH 7.8

MOPS-Puffer III 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8.0

MOPS-Puffer IV 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, 125 mM Imidazol, pH 8.0

Reinigung von His-cGloII oder ProtA_{His}

Nach der Zentrifugation wurde das Zellysate 2 × langsam auf mit MOPS-Puffer B1 voräquillibrierte Ni-NTA-Agarose aufgetragen, gefolgt von einem Waschschriff mit 10 Säulenvolumen MOPS-Puffer B2. Eluiert wurde mit 3 × 1.5 ml MOPS-Puffer B3.

MOPS-Puffer B2 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.8

MOPS-Puffer B3 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, 125 mM Imidazol, pH 7.8

Reinigung von ProtA-cGloII

Der Überstand wurde 2 × langsam auf mit MST voräquillibrierte IgG-Sepharose aufgetragen, gefolgt von einem Waschschriff mit 10 Säulenvolumen MST-Puffer. Danach wurde die IgG-Sepharose für 1 h bei 4 °C mit einem Überschuß an ProtA_{His} (in MOPS-Puffer B3) inkubiert,

um die Glyoxalase kompetitiv zu eluieren. Das Eluat wurde anschließend 1:10 verdünnt und auf eine mit MOPS-Puffer B1 äquilibriumierte Ni-NTA-Agarose aufgetragen, um ProtA_{His} zu entfernen. Der Durchlauf mit ProtA-cGloII wurde aufgefangen und ProtA_{His} konnte nach Elution mit MOPS-Puffer B3 wiederverwendet werden.

Gelfiltration

Je nach Bedarf wurden die Proteine noch mittels Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Dafür wurden die jeweiligen Eluate aufkonzentriert, abzentrifugiert (16000 × g, 30 min) und auf eine mit dem entsprechenden Puffer äquilibriumierte HiLoad 16/60 Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml/min und es wurden Fraktionen von 3 ml gesammelt.

GloI Gelfiltrationspuffer 10 mM MOPS, pH 7.8

cGloII Gelfiltrationspuffer 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7.2

2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde leicht modifiziert nach Bradford [18] durchgeführt. Anstelle einer Kalibriergerade wurde eine hyperbolische Kalibrierkurve verwendet. Für die Kalibrierkurve wurde eine 1 mg/ml BSA-Stammlösung angesetzt, von der 0 bis 14 µg (in 2 µg Schritten) in insgesamt 800 µl H₂O/Küvette eingesetzt wurden. Von der zu untersuchenden Probe wurden bis zu 50 µl eingesetzt, um eine Absorption zwischen 0.1 und 1.0 zu erreichen. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde die Probe dreimal bestimmt. Im Abstand von 15 sec wurden 200 µl Bradfordreagenz in die Küvetten mit den Kalibrier- und Probenlösungen pipettiert und gut gemischt. Nach einer Inkubation von exakt 10 min wurde in den gleichen Zeitabständen die Absorption bei 595 nm gemessen. Anschließend wurden die BSA-Proteinmengen gegen die gemessene Absorption aufgetragen und die Hyperbelparameter ($y=a*x/(b+x)$) mit dem Programm SigmaPlot10 ermittelt. Mit Hilfe der Parameter wurde aus dem Mittelwert der Absorption des unbekanntes Proteins die Proteinmenge bzw. die Proteinkonzentration bestimmt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteingemische wurden durch vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt [62]. Je nach Probenanzahl wurden dazu Minigele (10 Taschen, 8 cm × 6 cm) oder Standardgele (bis zu 21 Taschen, 14 cm × 9 cm) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C im Heizblock aufge-

kocht. Bei Bedarf wurde 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol zum Laemmli-Puffer zugegeben, um Disulfidbrücken zu spalten oder eine Neubildung zu verhindern. Die Trennung wurde in SDS-Laufpuffer für 1 h (Minigel) bzw. 1.5 - 2.5 h (Standardgel) durchgeführt. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 30 mA angelegt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden im Gel entweder durch Coomassie-Färbung nachgewiesen oder mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

SDS-Laufpuffer 25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3
2× Laemmli-Puffer 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin,
0.1 % (w/v) Bromphenolblau

2.4.4 Coomassie-Blau-Färbung

Der Nachweis der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte durch Färbung mit Coomassie-Blau (modifiziert nach Fairbanks [42]). Dazu wurde das SDS-Gel in Färbelösung für ca. 45 sec in der Mikrowelle aufgeköcht, um den Färbevorgang zu beschleunigen, und für 5 - 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das SDS-Gel in Entfärbelösung wiederum für ca. 45 sec aufgeköcht und bis zum gewünschten Färbegrad unter Schütteln entfärbt.

Färbelösung 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0.05 % (w/v) Coomassie Blau R
Entfärbelösung 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig

2.4.5 Western-Blot

Für den immunologischen Nachweis wurden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen [99]. Dazu wurden zuerst vier Whatman Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran (auf Gelgröße zurechtgeschnitten) sowie das SDS-Gel für 5 min in Transferpuffer äquillibriert. Anschließend wurden die Filterpapiere, die Membran und das Gel in der entsprechenden Reihenfolge zusammengelegt. Für Minigele wurde das sogenannten Wet-Blot-Verfahren verwendet, bei dem das Gel-Membran Sandwich in eine Blotkassette eingelegt wird. Der Transfer erfolgte in einem mit Transferpuffer gefüllten Tank (Bio-Rad Mini Trans Blot) bei 100 V für 1 h. Für Standardgele wurde das sogenannte Semi-Dry-Verfahren verwendet. Hier wurde das Gel-Membran Sandwich in einen Elektrobloetter (Peqlab) bei 250 mA (pro Gel) für 1.5 h geblottet. Nach dem Transfer wurden die immobilisierten Proteine mittels Ponceaurotfärbung sichtbar gemacht. Dafür wurde die Membran für 5 min in Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend kurz in Wasser geschwenkt.

Transferpuffer (Wet-Blot)	20 % (v/v) Methanol, 150 mM Glycin, 20 mM Tris
Transferpuffer (Semi-Dry-Blot)	20 % (v/v) Methanol, 150 mM Glycin, 20 mM Tris, 0.08 % (w/v) SDS
Ponceau-Lösung	0.2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure

2.4.6 Immundetektion von Proteinen

Der Nachweis der rekombinanten Glyoxalase Proteine erfolgte mit dem Penta-His Antikörper und dem dazugehörigem Qiagen Protokoll (Protokoll 7 aus „QIAexpress Detection and Assay Handbook 10/2002“). Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierlösung 1 geschwenkt und 2×10 min in TBS-TT sowie 1×10 min in TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit Penta-His Antikörper inkubiert (1:3000 in Blockierlösung 1 verdünnt) und wiederum 2×10 min in TBS-TT sowie 1×10 min in TBS gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit anti-Maus HRP Konjugat (1:5000 in Blockierlösung 2 verdünnt) für 1 h bei RT. Die Membran wurde dann 3×10 min in TBS-TT gewaschen und für 1 min in ECL-Lösung inkubiert. Danach wurde die Membran in einer Kassette zwischen zwei transparente Folien gelegt und ein Fuji-Röntgenfilm zur Detektion der Chemilumineszenz für 1 sec bis 10 min aufgelegt.

Blockierlösung 1	3 % (w/v) BSA in TBS
Blockierlösung 2	10 % (w/v) Milchpulver in TBS
TBS	10 mM Tris-HCl, 0.9 % (w/v) NaCl, pH 7,4
TBS-TT	10 mM Tris-HCl, 0.9 % (w/v) NaCl, pH 7,4, 0.05 % (v/v) Tween 20, 0.2 % (v/v) Triton X-100

2.4.7 Chemische Proteinquervernetzung (Crosslinking)

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden Crosslinking-Experimente mit Glutaraldehyd oder Disuccinimidylsuberat (DSS) durchgeführt. Für alle Versuche wurde MOPS-Puffer B3 verwendet und es wurden verschiedene Bedingungen untersucht (Konzentration des Crosslinkers, Inkubationsdauer, Temperatur oder Salzkonzentration). Beim Crosslinking mit Glutaraldehyd wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l rekombinantes Protein mit Glutaraldehyd gemischt und die Reaktion nach festen Zeitpunkten mit 5 μ l 1 M Tris pH 7.8 gestoppt. Beim Crosslinking mit DSS wurde ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 50 μ l rekombinantes Protein mit DSS gemischt und die Reaktion nach festen Zeitpunkten mit 2.5 μ l 1 M Tris pH 7.8 gestoppt. Da DSS in löslicher Form schnell an Aktivität verliert, wurde es immer erst kurz vor Zugabe zur Reaktion in DMSO gelöst und so

schnell wie möglich hinzugefügt. Die Proben mit den chemisch quervernetzten Proteinen wurden anschließend mit 25 µl Laemmli (mit 5 % β-ME) versetzt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.4.8 Pull-Down Experimente

Zellaufschluss

Bakterienzellpellets (von 1 L Kultur) mit His- oder ProtA-getaggtter Glyoxalase wurden jeweils in 5 ml des entsprechenden Puffers resuspendiert, mit 5 mg Lysozym und einer Spatelspitze DNase versetzt und unter Rühren auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde das Zelllysat mit Ultraschall behandelt (4 × 10 sec mit 10 sec Pause, 30 % Leistung, Pulsstufe 4) und anschließend abzentrifugiert (30500 × g, 30 min, 4 °C).

Puffer für IgG-Sepharose Pull-Down MST-Puffer

Puffer für Ni-NTA Pull-Down MOPS-Puffer B1

Pull-Down mittels an IgG-Sepharose gebundene Glyoxalase

Zum Nachweis einer Interaktion wurden beiden Überstände miteinander vereinigt, für 10 min auf Eis inkubiert und 2 × auf mit MST-Puffer äquilibrierte IgG-Sepharose (0.25 ml) aufgetragen. Die IgG-Sepharose Säule wurde mit 2.5 ml MST Puffer und mit 0.5 ml IgG-Waschpuffer gewaschen. Die ProtA-getaggte Glyoxalase wurde mit 5 × 0.5 ml IgG-Elutionspuffer eluiert und mittels SDS-PAGE wurde untersucht, in welchen Fraktionen sich die (kleinere) His-getaggte Glyoxalase befand.

IgG-Waschpuffer 5 mM Ammoniumacetat pH 5.0

IgG-Elutionspuffer 500mM HAc pH 3.4

Pull-Down mittels an Ni-NTA-Agarose gebundene Glyoxalase

Bei Verwendung von His-GloI als Interaktionspartner musste His-GloI erst über S-Hexylglutathionagarose vorgereinigt werden (siehe Reinigung von GloI S. 32). Erst nach dem Waschen der Ni-NTA-Agarose wurde das Zelllysat mit ProtA-cGloII 2 × auf die Säule aufgetragen. Der anschließende Wasch- und Elutionsschritt erfolgte wie bei der Verwendung von His-cGloII als Interaktionspartner. Hierbei wurden die beiden Überstände miteinander vereinigt, für 10 min auf Eis inkubiert und auf mit MOPS-Puffer B1 äquilibrierte Ni-NTA-Agarose (0.5 ml) aufgetragen. Die Ni-NTA Säule wurde mit 5 ml MOPS-Puffer B2 gewaschen

und die His-getaggte Glyoxalase wurde mit 5×0.5 ml MOPS-Puffer B3 eluiert. Mittels SDS-PAGE wurde untersucht, in welchen Fraktionen sich die (größere) ProtA-getaggte Glyoxalase befand.

2.4.9 Analytische Gelfiltration

Die apparente molekulare Masse der gereinigten Proteine wurde auf einer HiLoad 16/60 Superdex 200 Gelfiltrationssäule analysiert. Die Säule wurde zuvor bei 4 °C mit dem HMW und LMW Gelfiltrationsstandard kalibriert und anschließend mit 50 mM MOPS, 300 mM NaCl pH 7.2 äquillibriert. Vor dem Auftragen wurde die Proteinlösung aufkonzentriert und abzentrifugiert ($16000 \times g$, 30 min). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit der Software UNICORN3.21 ausgewertet.

2.4.10 Analytische Ultrazentrifugation und CD-Spektroskopie

Analytische Ultrazentrifugation und CD-Spektroskopie wurden von der Microchemistry Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried) durchgeführt. Die zu untersuchenden rekombinanten Proteine wurden dafür wie zuvor beschrieben mittels Affinitätschromatographie sowie anschließender Gelfiltration gereinigt.

2.4.11 SPR-Spektroskopie

Die SPR-Spektroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit Thorsten Pirch (LMU Mikrobiologie, Service unit bioanalytics). ProtA-cGloII und His-cGloII wurden nach der Reinigung aufkonzentriert und abzentrifugiert ($19600 \times g$, 30 min, 4 °C), um Aggregate zu entfernen. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer A (filtriert und entgast) verwendet. Die Interaktionsversuche wurden mit verschiedenen Sensorchips (NTA, CM3 und C1) durchgeführt.

2.4.12 Metallionenanalyse

Die Bestimmung des Metallionengehalts wurde von Helmut Hartl (Zentrale Analytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU) mittels optischer Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES) durchgeführt. Die zu untersuchenden His-cGloII Proteine (WT und Mutanten) wurden dafür wie zuvor beschrieben (siehe S. 32) über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Als Negativkontrolle diente Elutionspuffer ohne Protein.

2.4.13 Kristallisation

Für Kristallisationsversuche wurden die zu untersuchenden rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatographie sowie anschließender Gelfiltration gereinigt. Nach der Gelfiltration wurden die Eluate stark aufkonzentriert und danach ultrazentrifugiert (55000 rpm, 30 min, 4°C), um Aggregate und andere störende Partikel zu entfernen. Zum Testen der geeigneten Konditionen wurde das sogenannte Sitting Drop Verfahren verwendet. Dazu wurden in eine 96-Well Platte mit Hilfe eines Masterblocks und einer Multikanalpipette 80 µl der zu untersuchenden NeXtal Suites in das entsprechende Reservoir-Well pipettiert. Anschließend wurde 1 µl Protein in das Sitting Drop-Well pipettiert und danach mit 1 µl Puffer aus dem jeweiligen Reservoir-Well vermischt. Danach wurde die Platte mit durchsichtigem Klebeband verschlossen und bei 20 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden die Platten unter dem Mikroskop auf die Bildung von Proteinkristallen untersucht. Folgende NeXtal Suites wurden getestet: Classics, Classics Lite, pH Clear I und II, AmSO₄ sowie Cations und Anions.

2.5 Enzymkinetische Messungen

Die graphische Auswertung sowie die Bestimmung der kinetischen Parameter V_{\max} , K_{cat} , K_m und K_i wurde mit dem Programm SigmaPlot 10.0 (Systat Software) durchgeführt.

2.5.1 Glyoxalase I Assay und Inhibition

Der Glyoxalase I Assay (nach [38]) beruht auf dem photometrischem Nachweis der enzymatischen Bildung von S-D-Lactoylglutathion bei 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}} = 3.37 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Das für die Reaktion benötigte Hemithioacetal (HTA) bildet sich nicht-enzymatisch aus Methylglyoxal (MGO) und reduziertem Glutathion (GSH) mit einer Dissoziationskonstante von 3 mM. Da die Konzentration von freiem GSH im Gleichgewicht konstant bei 0.1 mM bleiben soll, folgt daraus:

$$K_d = \frac{[\text{MGO}] \cdot [\text{GSH}]}{[\text{HTA}]} = 3 \text{ mM} \quad \rightarrow \quad [\text{MGO}] = 30 \cdot [\text{HTA}]$$

Damit können die Anfangskonzentrationen von MGO und GSH in Abhängigkeit von der gewünschten Substratkonzentration berechnet werden:

$$[\text{MGO}]_{\text{Anfang}} = [\text{MGO}] + [\text{HTA}] = 31 \cdot [\text{HTA}]$$

$$[\text{GSH}]_{\text{Anfang}} = [\text{GSH}] + [\text{HTA}] = 0.1 \text{ mM} + [\text{HTA}]$$

Das Photometer und der Assay Puffer wurden vor den Messungen auf 30 °C temperiert. An jedem Messtag wurden die benötigten Stammlösungen an GSH (10 mM) und MGO (100 mM) frisch in Assay Puffer angesetzt. Für die Messung wurde dann vortemperierter Assay Puffer in der Küvette vorgelegt und die entsprechenden Volumina MGO und GSH zupipettiert. Anschließend wurde die Küvette in das temperierte Photometer gestellt und der Strahlengang mit einem Papier abgedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 4:20 min wurde das Papier aus dem Strahlengang entfernt und ein Nullabgleich durchgeführt. Bei 4:30 min wurde mit dem Aufzeichnen einer 30 sec langen Basislinie begonnen, gefolgt vom Start des Assays durch Enzymzugabe. Insgesamt erfolgte also die Bildung des Hemithioacetals während einer Vor-Inkubationszeit von 5 min in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Sofern Messungen mit Inhibitor durchgeführt wurden, erfolgte die Zugabe des jeweiligen Inhibitors bei 4:00 min.

GloI Assay Puffer 50 mM MOPS, pH 7.0

2.5.2 Glyoxalase II Assay

Der Glyoxalase II Assay (modifiziert nach Uotila [102]) beruht auf dem photometrischem Nachweis des enzymatischen Abbaus von S-D-Lactoylglutathion ($\epsilon_{240\text{nm}} = 3.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 240 nm. Das Photometer und der Assay Puffer wurden vor den Messungen auf 25 °C temperiert. Für die Messung wurde dann vortemperierter Assay Puffer in der Küvette vorgelegt und das Substrat SDL hinzugefügt. Anschließend wurde die Küvette in das temperierte Photometer gestellt, nach 10 sec der Nullabgleich durchgeführt und nach 15 sec mit dem Aufzeichnen einer 30 sec langen Basislinie begonnen, gefolgt vom Start des Assays durch Enzymzugabe (Gesamtvolumen 1 ml). Bei Inhibitionsstudien wurde der jeweilige Inhibitor nach dem Substrat in die Küvette pipettiert.

GloII Assay Puffer 100 mM MOPS, pH 6.8

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation der Glyoxalasen in *Plasmodium falciparum*

Analysen der DNA-Sequenzen von *PfGloI* und *PfcGloII* ergaben, dass diese Proteine keinerlei Signalsequenz aufweisen und somit voraussichtlich im Zytosol des Parasiten verbleiben. Dagegen besitzt *PftGloII* eine N-terminale Signalsequenz, die auf einen Transport in den Apikoplasten hindeutet [1]. Bei der Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für einen Transport wurde mit verschiedenen Programmen jedoch ein geringer Wert berechnet. So ergab z. B. die Abschätzung mit PATS 1.2.1 [116] einen Wert von 0.26 (von 1.0). Um genaue Informationen über die tatsächliche Lokalisation der Glyoxalasen zu erhalten, wurden C-terminale Fusionsproteine mit GFP erstellt und in den Blutstadien von *P. falciparum* exprimiert.

3.1.1 *PfGloI* und *PfcGloII* befinden sich im Zytosol des Parasiten

Fluoreszenzaufnahmen lebender Parasiten mit *PfGloI*-GFP (3D7^{GloIG}) oder *PfcGloII*-GFP (3D7^{cGloIIG}) zeigten ein GFP-Signal über den kompletten Körper der Zelle (mit Ausnahme der Nahrungsvakuole) und bestätigten die erwartete zytosolische Lokalisation (Abb. 3.1 A).

3.1.2 *PftGloII* ist im Apikoplasten lokalisiert

Im Gegensatz dazu wiesen Fluoreszenzaufnahmen lebender Zellen (Abb. 3.1 B) mit *PftGloII*-GFP (3D7^{tGloII}) ein klar abgegrenztes Signal auf, das eine Lokalisation im Apikoplasten vermuten ließ. Um die Lokalisation zu bestätigen, wurden die 3D7^{tGloII}-Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen das Acyl-Carrier-Protein (ACP), einem Marker für den Apikoplasten, inkubiert. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten deutlich eine Kolo­kalisierung des GFP-Signals mit dem ACP-Signal sowohl in Trophozoiten (Abb. 3.1 C obere Reihe) als auch in Schizonten (Abb. 3.1 C untere Reihe). *PftGloII* ist somit die erste Glyoxalase, deren Lokalisation in einem Plastiden experimentell bestätigt wurde.

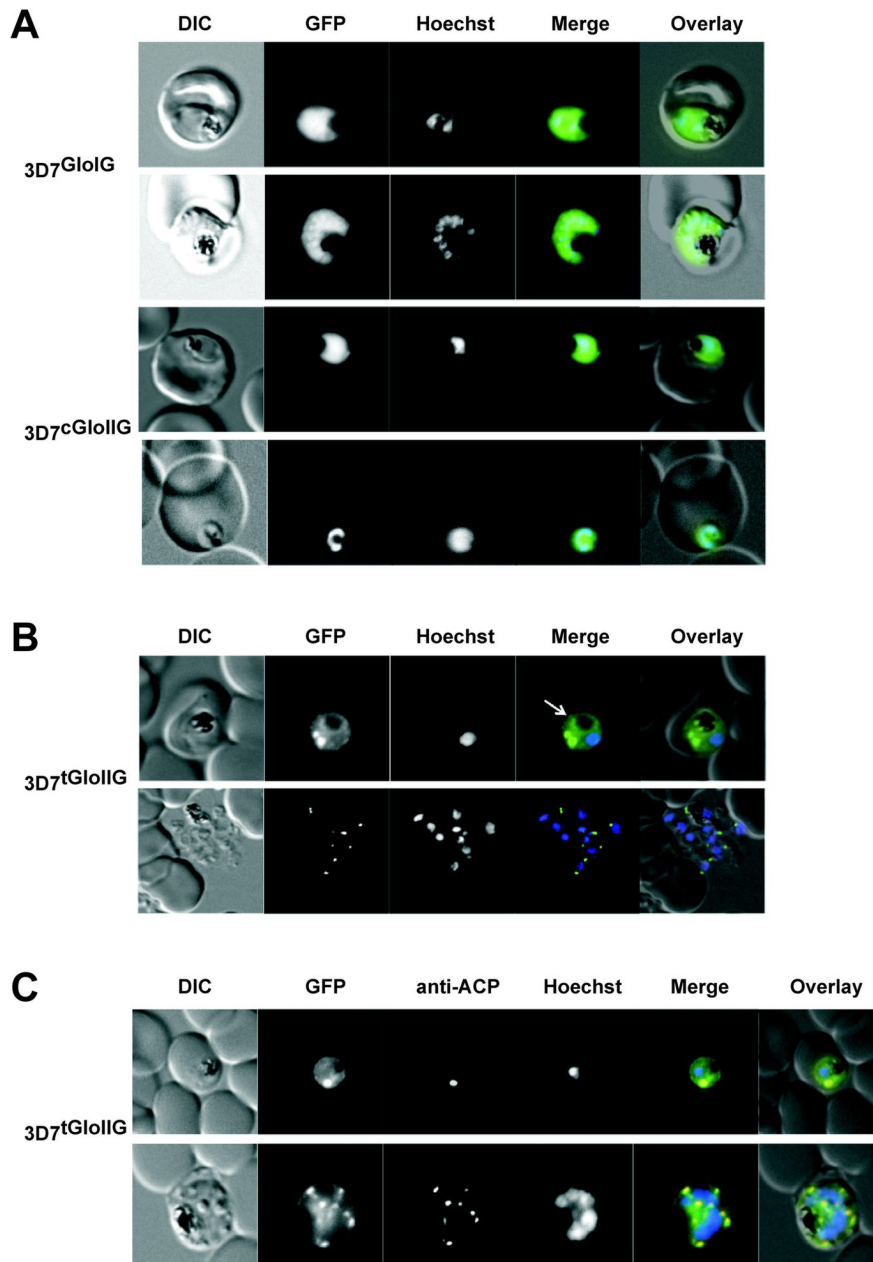


Abbildung 3.1: Lokalisation der Glyoxalasen in *P. falciparum* [V.2]. A) Lokalisation von *PfGloI* und *PfcGloII* im Zytosol von *P. falciparum*. B) Live-Cell-Imaging von Erythrozyten, die mit 3D7^{tGloII} infiziert wurden. In einigen Erythrozyten wurde ein zusätzliches, schwächeres GFP-Signal um den Parasiten detektiert. Aufgrund der Überexpression des GFP-Fusionsproteins könnte der Import in den Apikoplasten überlastet sein und *PftGloII* anstelle dessen über die standardmäßige Sekretion in das Lumen der parasitophoren Vakuole transportiert werden (weißer Pfeil). C) Immunfixierte Erythrozyten, die mit 3D7^{tGloII} infiziert wurden. Eine Kolokalisation des GFP-Signals mit dem ACP-Signal ist sowohl in Trophozoiten (obere Reihe) als auch in Schizonten (untere Reihe) deutlich erkennbar.

3.1.3 Kontrolle der GFP-Fusionsproteine mittels Western-Blot

Zur Kontrolle der Fusionsproteine wurden Proteinextrakte von 3D7^{GloIG}, 3D7^{cGloII} und 3D7^{tGloII} mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Antikörpern gegen GFP detektiert. Die berechnete molekulare Masse der jeweiligen Fusionsproteine stimmte genau mit den detektierten Signalen überein. Bei *PftGloII* konnte zusätzlich eine etwas kleinere Bande beobachtet werden, die vermutlich auf eine Prozessierung des Vorläuferproteins im Laufe des Proteinimports zurückgeführt werden kann. Bei ca. 26 kDa konnte eine weitere Bande detektiert werden. Diese ist wahrscheinlich das Ergebnis der öfters beobachteten Degradation des GFP-Fusionsproteins [107]. Ein vermehrter Abbau des überexprimierten Fusionsproteins liefert ebenfalls eine Erklärung für den Fluoreszenzhintergrund in Abb. 3.1 B + C.

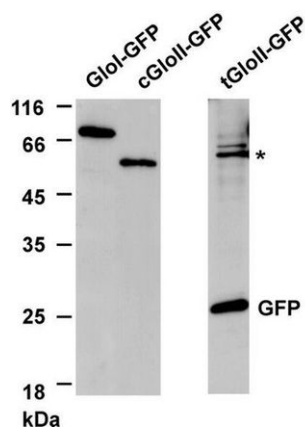


Abbildung 3.2: Kontrolle der GFP-Fusionsproteine mittels Western-Blot [V.2]. Berechnete molekulare Masse der Fusionsproteine: *PfGloI* = 69.9 kDa, *PfcGloII* = 57.7 kDa und *PftGloII* = 65.5 kDa. Die importierte und um die N-terminale Signalsequenz verkürzte *PftGloII* ist mit einem Stern markiert.

3.2 Struktur- und Interaktionsstudien

3.2.1 Kristallisationsversuche mit *PfGloI* und *PfcGloII*

Bislang gibt es keine Röntgenkristallstruktur von *PfGloI* oder *PfcGloII*. Besonders die Struktur der monomeren *PfGloI* ist dabei von Bedeutung, da ein Sequenzvergleich mit der homodimeren hGloI auf signifikante Unterschiede deutet. Ein vollständiges Modell von *PfGloI* basierend auf der Struktur von hGloI konnte nicht erstellt werden, da es einen Abstand von etwa 2.5 nm zwischen den Resten Met184 und Ser26' von hGloI gibt, die im Alignment [1] mit Lys172 und Tyr174 von *PfGloI* gepaart werden. Außerdem fehlen in *PfGloI* zwischen Lys172 und Asn173 die zu Met1-Pro25 homologen Reste der humanen GloI. Zudem besitzt die C-terminale Hälfte von *PfGloI* im mittleren Bereich eine 18 Aminosäure lange Insertion im Vergleich zum humanen Protein [1].

Kristallisation von *PfcGloII*

Die Kristallisationsexperimente von rekombinanter *PfcGloII* WT wurden dadurch erschwert, dass *PfcGloII* WT während der Gelfiltration in einem salzfreien bzw. salzarmen Puffer aggregierte. Auch die Zugabe von 1 mM ZnSO₄ bei 50 mM NaCl führte lediglich zu weniger Aggregation. Kristallansätze wurden deshalb nach einem Gelfiltrationslauf mit 50 mM MOPS, 200 mM NaCl, pH 7.8 angesetzt. Dabei wurde *PfcGloII* WT in einer Konzentration von 3 mg/ml eingesetzt und die NeXtal Suites Classics, Classics Lite, pH Clear I und pH Clear II bei 20 °C getestet, jedoch wuchsen unter keiner Bedingung Kristalle heran. Eine Proteinpräzipitation wurde in unterschiedlichem Maße bei den untersuchten NeXtal Suites beobachtet: bei Classics präzipitierte *PfcGloII* WT bei 42 % der Pufferbedingungen, bei pH Clear I und II bei 32 % der Bedingungen und bei Classics Lite bei lediglich 17 %.

Kristallisation von *PfGloI*

Bei der Kristallisation von rekombinanter *PfGloI* wurden verschiedene Strategien verfolgt, indem unterschiedliche Proteinvarianten exprimiert und kristallisiert werden sollten (Tab. 3.1). Eine Strategie war die Umklonierung von *PfGloI* WT in pET-28, um eine höhere Ausbeute durch die Expression unter dem T7 Promoter zu erzielen. Jedoch führte weder die Expression

Variante	Beschreibung
GloI E272Q (pQE30)	Vorteil gegenüber WT: wesentlich höhere Ausbeute, in An- und Abwesenheit von S-Hexylglutathion (Stabilisierung?)
GloI WT (pET-28)	T7 Promoter (stärker als T5 Promoter in pQE30), höhere Ausbeute?
GloI WT AS 110-277	verkürztes Protein, nur die beiden inneren Domänen, Verbindungsstück zum Monomer bleibt erhalten, in pQE30 und pET-28
ProtA-GloI (pET-28)	erhöhte Ausbeute und Stabilität durch das Anfügen eines größeren Tags?

Tabelle 3.1: Verschiedene *PfGloI*-Varianten für Kristallisationsexperimente.

von *PfGloI* WT (pET-28) in BL21 (DE3) (Abb. 3.3 A obere Reihe) noch BL21-CodonPlus (DE3)-RIL oder in Rosetta-gami 2 (DE3) zu einer höheren Ausbeute im Vergleich zur Expression von *PfGloI* WT (pQE30) in XL1-Blue (Abb. 3.3 A untere Reihe). Die erzielte Proteinmenge von *PfGloI* WT (pET-28) war mit 5 bis 20 µg pro Liter Kultur sogar niedriger als von *PfGloI* WT (pQE30) mit 75 bis 100 µg pro Liter Kultur.

Eine weitere Überlegung war die Expression und Kristallisation eines verkleinerten Proteins, um die eventuell zu hohe Flexibilität von *PfGloI* WT zu verringern und dadurch die Kristallbildung zu erleichtern. Zu diesem Zweck wurden die beiden inneren Domänen II und III (siehe Abb. 1.6) von *PfGloI* ausgewählt, da bei dieser Variante die Aminosäuren

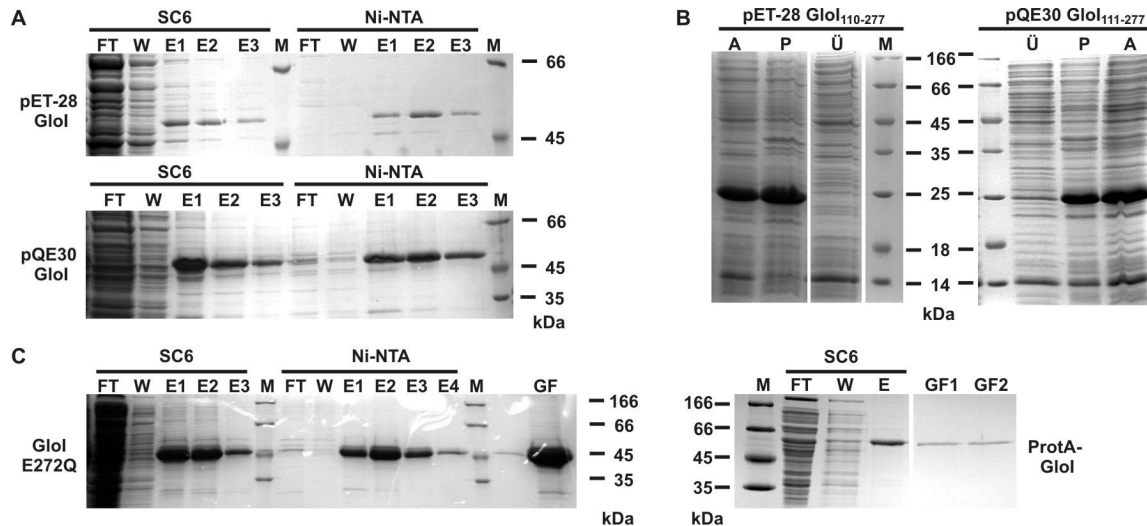


Abbildung 3.3: SDS-PAGE (15 %) der Reinigungsfractionen der verschiedenen *PfGloI*-Varianten. A) Vergleich der Aufreinigung von *PfGloI* WT (pET-28) und *PfGloI* WT (pQE30). SC6: S-Hexylglutathionagarose, Ni-NTA: Ni-NTA-Agarose, M: Marker, FT: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Elution. B) Löslichkeit der rekombinanten, verkürzten *PfGloI*-Proteine. A: Gesamtzellaufschluss, P: Pellet und Ü: Überstand nach Zentrifugation. Es ist deutlich zu erkennen, dass *PfGloI* vollständig im Pellet verbleibt. Eine Aufreinigung von löslicher verkürzter *PfGloI* war weder über S-Hexylglutathionagarose noch über Ni-NTA-Agarose möglich (nicht im Bild) C) Aufreinigung von GloI E272Q und ProtA-GloI. GF: Gelfiltration.

erhalten bleiben, die für die Verbindung zum Monomer zuständig sind. Nachdem dieser Strukturanteil beim humanen Homodimer nicht vorhanden ist, sind Informationen darüber von besonderem Interesse. Jedoch wurde weder pET-28 GloI₁₁₀₋₂₇₇ noch pQE30 GloI₁₁₁₋₂₇₇ in BL21(DE3) bzw. XL-Blue in löslicher Form bei 30 °C oder 37 °C exprimiert (Abb. 3.3 B).

Im Gegensatz dazu wurde GloI E272Q und ProtA-GloI erfolgreich in XL1-Blue bzw. BL21 (DE3) exprimiert und 0.5 bis 3.5 mg (je 6 Liter Kultur) für die Kristallisationsexperimente aufgereinigt (Abb. 3.3 C). Die Vorversuche wurden mit den NeXtal Suites Classics, Classics Lite, pH Clear I und II, AmSO₄, Cations und Anions im sogenannten „sitting drop“-Verfahren durchgeführt. Bei GloI E272Q wurde S-Hexylglutathion (SC6) als Additiv verwendet, um eine höhere Stabilität zu erreichen. Für die Puffer pH Clear F11, F12, E12, pH Clear H6, Classics Lite D6 und Cations F7 wurden zusätzlich Verfeinerungen getestet, indem die Proteinkonzentration (von 1.0 bis 3.5 mg/ml), die Pufferzusammensetzung und/oder der pH (von 7.75 bis 9.0) variiert wurde, um größere Kristalle zu erhalten. Bislang bildeten sich jedoch äußerst kleine, meist igelförmige Kristalle (Tab. 3.2).

Suite	Puffer	Protein + Additiv	mg/ml
pH Clear I F11	0.1 M Tris pH 8.0, 3.2 M Ammoniumsulfat	GloI E272Q + 2 mM SC6	2,5
pH Clear I E12	0.1 M Bicine pH 9.0, 1.6 M Ammoniumsulfat	GloI E272Q + 2 mM SC6	2,5
pH Clear I F12	0.1 M Bicine pH 9.0, 3.2 M Ammoniumsulfat	GloI E272Q + 2 mM SC6	2,5
pH Clear II H6	3.4 M Natriummalonat pH 6.0	GloI E272Q + 2 mM SC6	2,5
Classics Lite D6	0.1 M Natriumphosphat, 0.1 M Kaliumphosphat, 0.1 M MES pH 6.0, 1 M NaCl	GloI E272Q + 2 mM SC6	2,5
AmSO ₄ H8	3 M Ammoniumsulfat, 1 % (v/v) MPD	GloI E272Q + 2 mM SC6	3.5
Cations B7	0.1 M Tris pH 8.5, 3.5 M Ammoniumchlorid	GloI E272Q + 2 mM SC6	3.5
Cations F7	0.1 M Tris pH 8.5, 2.2 M Calciumchlorid	GloI E272Q + 2 mM SC6	3.5
Classics A10	0.2 M Magnesiumchlorid, 0.1 M Hepes-Natriumsalz pH 7.5, 30 % (v/v) Isopropanol	ProtA-GloI	3
Classics Lite A3	0.2 M Magnesiumchlorid, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.7 M 1,6-Hexanediol	ProtA-GloI	3
Classics F1	0.2 M Magnesiumformiat	ProtA-GloI	3

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Vorversuche zur Kristallisation von *PfGloI*. Unter den meisten Pufferbedingungen waren die erhaltenen Kristalle igelförmig, bis auf die Puffer Cations B7 und F7, bei denen die Kristalle eine rechteckige Form annahmen.

3.2.2 *PfGloI* und *PfcGloII* scheinen nicht miteinander zu interagieren

Nachdem die Existenz eines vollständigen Glyoxalase-Systems im Zytosol von *P. falciparum* (siehe 3.1.1) bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob beide Enzyme für eine effiziente Entgiftung eng zusammenarbeiten („substrate shuffling“). Beide Enzyme eluierten zwar gemeinsam von der Gelfiltrationssäule (Abb. 3.4 A + B), jedoch könnte die Überlagerung auch durch die höhere apparente molekulare Masse von *PfcGloII* (siehe 3.2.3) bedingt worden sein. Deswegen wurden Pull-Down Experimente mit Protein A (ProtA) oder His-getaggten *PfGloI*- und *PfcGloII*-Enzymen durchgeführt, um herauszufinden, ob beide zytosolische Enzyme miteinander interagieren. Bei allen Kombinationsmöglichkeiten war es nicht möglich, eine Interaktion zwischen *PfGloI* und *PfcGloII* nachzuweisen (Abb. 3.4 D). Anschließend wurde mit dem neu erstellten ProtA-GloI Fusionsprotein nochmals das Verhalten auf der Gelfiltrationssäule untersucht. Bei diesem Lauf eluierte das nun vergrößerte ProtA-GloI getrennt von His-cGloII (Abb. 3.4 C) und unterstützt somit das Ergebnis der Pull-Down Experimente.

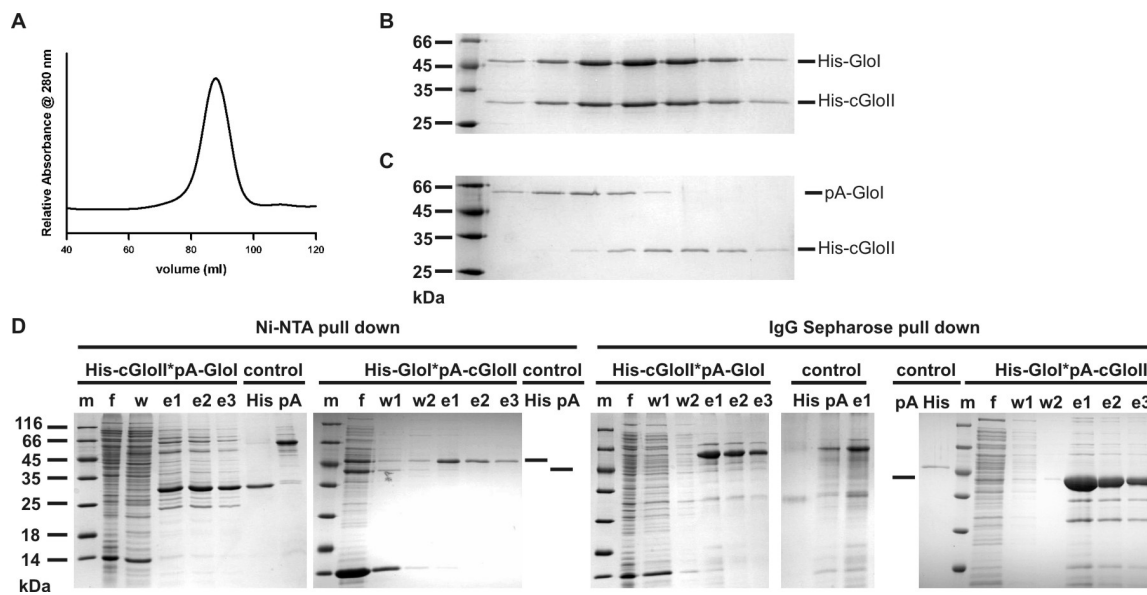


Abbildung 3.4: Interaktionsstudien mit *PfGloI* und *PfcGloII*. A) Gelfiltrationschromatographie mit His-GloI und His-cGloII. His-GloI oder His-cGloII allein auf die Säule aufgetragen ergaben ein gleiches Laufverhalten. B) SDS-PAGE (15 %) der gesammelten proteinhaltigen Fraktionen. C) SDS-PAGE (15 %) der gesammelten proteinhaltigen Fraktionen des Gelfiltrationslauf mit ProtA (pA)-GloI und His-cGloII. D) Pull-Down Experimente mit N-terminal getaggten GloI oder cGloII Proteinen. Eine Interaktion zwischen His- und ProtA-getaggten Protein wurde sowohl über Ni-NTA-Agarose als auch über IgG-Sepharose untersucht. Zum Vergleich wurden die jeweiligen zu untersuchenden Interaktionspartner mit auf das SDS-Gel (15 %) aufgetragen oder angezeichnet. m: Marker, f: Durchlauf, w: Waschfraktion, e: Elution.

3.2.3 *PfcGloII* bildet transiente Homodimere in Lösung

Die Analyse der apparenten molekularen Masse von *PfcGloII* WT und Mutanten mittels analytischer Gelfiltration zeigte, dass alle Mutanten eine geringere apparente molekulare Masse wie WT aufwiesen (Tab. 3.3). Beim Vergleich mit der berechneten molekularen

Enzyme	M_{app} (kDa)	$M_{app}/31.8$ kDa
cGloII WT	45.3 ± 2.0	1.43 ± 0.06
cGloIIR154K	23.2 ± 1.6	0.73 ± 0.05
cGloIIR154M	26.9 ± 8.1	0.85 ± 0.26
cGloIIR257Q	39.0 ± 0.2	1.23 ± 0.01
cGloIIR257D	26.1 ± 2.1	0.82 ± 0.07
cGloIIR260Q	32.0 ± 0.2	1.01 ± 0.01
cGloIIR260D	37.5 ± 2.1	1.18 ± 0.07

Tabelle 3.3: Mittelwerte der apparenten molekularen Masse von *PfcGloII* WT und Mutanten (je zwei bis vier unabhängige Gelfiltrationsläufe). Die theoretische molekulare Masse von rekombinanten His-cGloII WT und Mutanten beträgt 31.8 kDa [V.1].

Masse von *PfcGloII* WT stellte sich zudem heraus, dass *PfcGloII* WT mit einer 1.5-fachen apparenten molekularen Masse eluiert. Eine Missfaltung der mutierten Proteine hätte eine höhere apparente molekulare Masse zur Folge. Eine geringere molekulare Masse könnte

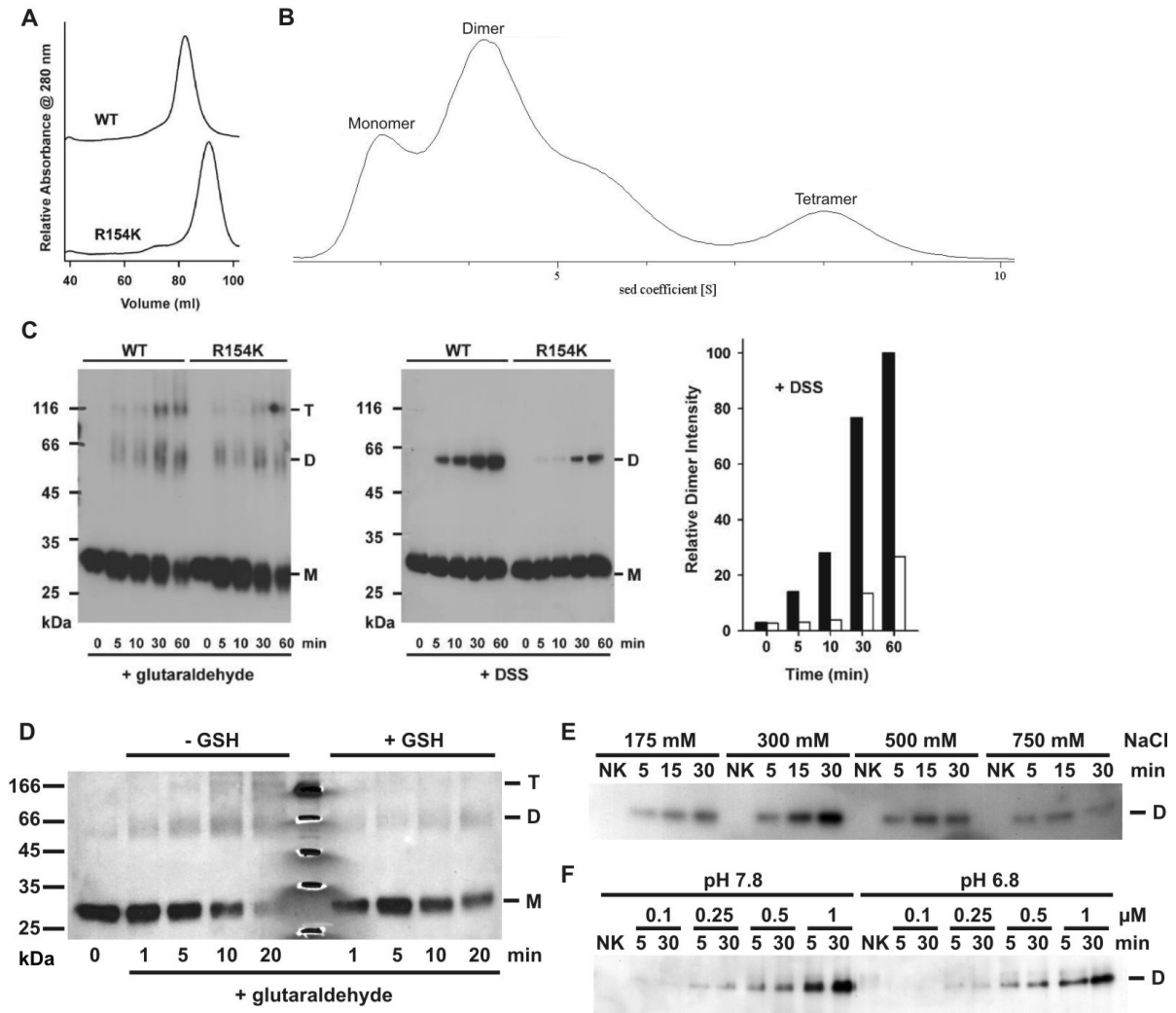


Abbildung 3.5: Oligomerisierung von *PfcGloII*. A) Vergleich der Gelfiltration von *PfcGloII* WT und R154K [V.2]. B) Analytische Ultrazentrifugation von *PfcGloII* WT. C) Crosslinking von *PfcGloII* WT und R154K. 5 - 8 μM *PfcGloII* WT und R154K wurden mit Glutaraldehyd (1000x[cGloII]) oder DSS (130x[cGloII]) bei 4 °C chemisch quervernetzt und mittels SDS-PAGE (12 %) und Western-Blot (Anti-His Antikörper) analysiert. M: Monomer, D: Dimer, T: Tetramer. Die Signale aus den Western-Blots wurden quantifiziert, die relative Intensivität der Dimer-Bande von WT (schwarze Balken) und R154K (weiße Balken) berechnet und gegen die Zeit aufgetragen [V.2]. D) Crosslinking-Experiment von 5.5 μM *PfcGloII* WT mit Glutaraldehyd (1000x[cGloII]) in An- oder Abwesenheit von 5 mM GSH (4 °C). E) Salzabhängigkeit der chemischen Quervernetzung von 1 μM *PfcGloII* WT mit DSS (400x[cGloII]) bei RT. NK: Negativkontrolle mit DMSO. F) Crosslinking unterschiedlicher Proteinkonzentrationen mit DSS (400x[cGloII]) bei zwei verschiedenen pH-Werten (RT).

entweder durch eine geänderte strukturelle Flexibilität oder durch ein geändertes Monomer-Dimer-Gleichgewicht verursacht werden. Da die Oligomerisierung von der Assoziations- und Dissoziationskonstante abhängig ist, kann insbesondere ein schnelles Monomer-Dimer-Gleichgewicht gelegentlich nicht durch analytische Gelfiltration aufgeklärt werden.

Deswegen wurde die Dimerbildung mittels Analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Hierbei konnte eine Oligomerisierung festgestellt werden (Abb. 3.5 B). Infolgedessen wurde untersucht, ob *PfcGloII* WT oder *PfcGloII*^{R154K} durch Glutaraldehyd oder Disuccinimidylsuberat (DSS) chemisch quervernetzt werden können (Crosslinking). Beide Proteine ließen sich erfolgreich durch diese Substanzen quervernetzen, wobei eine längere Inkubation mit Glutaraldehyd außerdem zur Bildung von Tetrameren führte. Da keine Trimere detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass nur α_2 -Oligomere, aber keine α_3 -Oligomere gebildet werden können. Beim Vergleich der Oligomerisierungskinetik von *PfcGloII* WT und *PfcGloII*^{R154K} zeigte sich deutlich, dass *PfcGloII*^{R154K} wesentlich länger für die Quervernetzung benötigt (Abb. 3.5 C). Diese langsamere Quervernetzung deutet darauf hin, dass sich das Gleichgewicht zugunsten der monomeren Form verlagert hat, weshalb die mutierten *PfcGloII*-Enzyme bei der Gelfiltration eine geringere apparente molekulare Masse aufwiesen. Weitere Versuche mit Glutaraldehyd und DSS unter unterschiedlichen Bedingungen deuten darauf hin, dass weitere Faktoren die Oligomerisierung beeinflussen. In Anwesenheit von reduziertem Glutathion verlief die Oligomerisierung langsamer ab (Abb. 3.5 D), wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die Zugabe von GSH die effektive Glutaraldehydkonzentration abgesenkt wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass die chemische Quervernetzung und somit die Dimerisierung salzabhängig ist (Abb. 3.5 E). Eine zu niedrige oder zu hohe Salzkonzentration wirkte sich negativ auf die Dimerisierungsgeschwindigkeit aus. Die höchste Geschwindigkeit wurde bei einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl erreicht. Ein weiterer Faktor war die Proteinkonzentration (Abb. 3.5 F). Bei einer Konzentration unter 250 nM war es unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht mehr möglich, das Dimer chemisch quervernetzen.

Die Dimerisierung wurde außerdem durch Pull-Down Experimente mit zwei unterschiedlich N-terminal getaggten *PfcGloII* Konstrukten nachgewiesen. ProtA-cGloII wurde zusammen mit His-cGloII von einer Ni-NTA-Agarosesäule eluiert, während ProtA-cGloII allein nicht an die Ni-NTA-Säule binden und aufgereinigt werden konnte. Zudem wurde His-cGloII zusammen mit ProtA-cGloII von einer IgG-Sepharosesäule eluiert, während His-cGloII keinerlei unspezifische Bindung an die IgG-Sepharosesäule zeigte (Abb. 3.6). Als nächstes wurde die Dimerisierung von *PfcGloII* mittels SPR-Spektroskopie untersucht, um die Dissoziationskonstante zu ermitteln. Dabei interagierte sowohl His- als auch Prot A-cGloII bereits mit

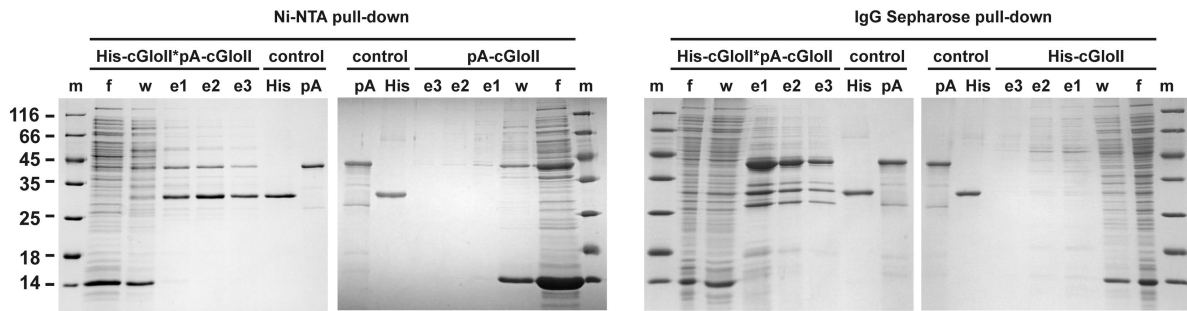


Abbildung 3.6: Pull-Down Experimente mit N-terminal getaggtter *PfcGloII* [V.2]. ProtA-cGloII wurde zusammen mit His-cGloII über eine Ni-NTA-Agarosesäule oder IgG-Sepharosesäule gereinigt und eine Interaktion (= gemeinsame Elution) mittels SDS-PAGE (15 %) analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Reinigung ohne entsprechenden Bindungspartner. m: Marker, f: Durchlauf, w: Waschfraktion, e: Elution.

jedem der verwendeten, noch unbehandelten Sensorchips (NTA, CM3 und C1). Aufgrund der fehlenden Kontrollreferenz konnte über diese Methode die Dissoziationskonstante K_d nicht bestimmt werden. Deswegen wurde ein K_d^{app} von ca. $5 \mu\text{M}$ durch Crosslinking-Experimente mit verschiedenen Proteinkonzentrationen abgeschätzt (Abb. 3.7). Mit Hilfe der Gelfiltrationsstudien, Pull-Down-Experimente, der analytischen Ultrazentrifugation und der chemischen Quervernetzung wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass *PfcGloII* in Lösung in einem Gleichgewicht aus Monomer und Dimer vorliegt.

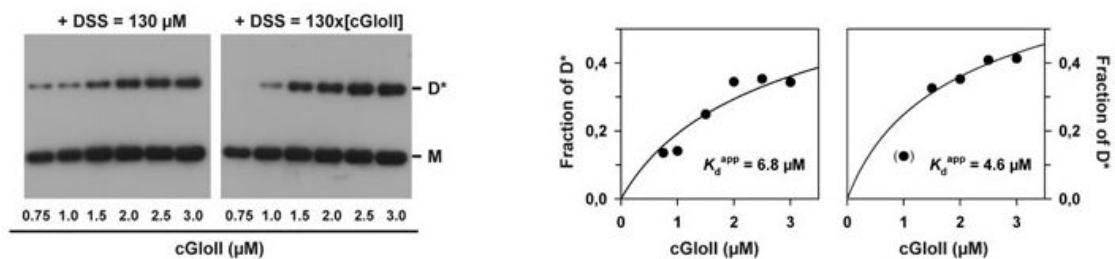


Abbildung 3.7: Abschätzung der Dissoziationskonstante von *PfcGloII* [V.2]. *PfcGloII* WT wurde entweder mit einer festen Konzentration (jeweils links) oder in einem festen Verhältnis (jeweils rechts) an DSS für 10 min bei 37°C chemisch quervernetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (12 %) und Western-Blot (Anti-His Antikörper) analysiert. Die Signale wurden quantifiziert und der Anteil an Dimer gegen die Gesamtproteinmenge aufgetragen. Nicht-lineare Regression (Hyperbel) führte zur Abschätzung der Dissoziationskonstante von ca. 5 bis $7 \mu\text{M}$.

3.3 Katalysemechanismus der Glyoxalase II

3.3.1 Rekombinante *PftGloII* wird in *E. coli* nur unzureichend exprimiert

Bereits bei der initialen Charakterisierung der *PftGloII* wurde lediglich eine Ausbeute von 0.2 mg Protein pro Liter Kultur erzielt [1]. Ausgehend vom in [1] beschriebenen Protokoll (Expression eines Konstrukts ohne N-terminale Signalsequenz (Δ AS 1-56) in *E. coli* M15 für 6 h bei 37°C in modifiziertem LB) wurde versucht, die Expression und Aufreinigung zu reproduzieren und zu verbessern. Jedoch führte die Expression in M15, XL1-Blue oder BL21(DE3) nicht zu einer gesteigerten Proteinmenge, unabhängig davon, ob die Anzucht in LB- oder LB-Mg-MOPS-Medium mit oder ohne Zugabe von ZnSO_4 durchgeführt wurde. Auch die Variation der Temperatur (30°C und 37°C), der IPTG-Konzentration (0.3 bis 1 mM) sowie der Expressionsdauer (6 h bzw. über Nacht) brachten keine Verbesserung. Zudem wurde die Aufreinigung dadurch erschwert, dass *PftGloII* bereits bei einer Konzentration von 25 mM Imidazol von der Ni-NTA-Agarose eluiert wurde und somit nicht in einer für Enzymaktivitätsmessungen notwendigen Reinheit vorlag. Die einzigen vielversprechenden Ansätze waren die Expression des Fusionsproteins ProtA-tGloII in BL21 bzw. die Expression von His-tGloII in NEB Shuffle Zellen, die zu einer erhöhten Menge an löslichem Protein führten. Für die anschließende Reinigung dieser Proteine müssen die entsprechenden Protokolle noch optimiert werden.

3.3.2 Optimierung des Expressions- und Reinigungsprotokolls von *PfcGloII* führt zu einer Steigerung der Enzymaktivität

Das bei der initialen Charakterisierung von *PfcGloII* WT verwendete Expressions- und Reinigungsprotokoll [1] wurde für die ausführliche Studie des Katalysemechanismus verfeinert. Eine halbe Stunde vor Induktion mit IPTG wurde dem LB-Medium 1 mM (final) ZnSO_4 zugegeben. Zudem wurde die Expression des rekombinanten Proteins mit lediglich 0.5 mM IPTG induziert. Als Resultat dieser Änderungen verbesserte sich die Sättigung mit Zinkionen. Statt einem Metallgehalt von 0.05 mol an Zink und 0.26 mol Eisen pro mol Protein [1] waren die rekombinanten *PfcGloII*-Enzyme mit ≥ 2 mol Zink pro mol Protein gesättigt. Weder Mangan noch Kupfer, Molybdän oder Kobalt und lediglich geringe Spuren an Eisen (ca. 0.1 mol) wurden bei der Metallionenanalyse nachgewiesen. Die verbesserte Sättigung von *PfcGloII* WT mit Zinkionen führte zu einer erhöhten Enzymaktivität (3-facher Anstieg von $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ mit S-D-Lactoylglutathion). Im Gegensatz dazu stimmte der ermittelte K_{m} -Wert mit

den vorhergehenden Messungen von rekombinanter *PfcGloII* [1] (Tab. 3.4) oder cGloII aus Parasitenextrakt [103] überein. Die Bindung von Zink an *PfcGloII* scheint außerdem stabil oder geschützt zu sein, da die Inkubation mit einem 1000-fachen Überschuss an EDTA selbst über Nacht lediglich zu einem Aktivitätsverlust von ca. 25 % führte.

Enzym	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (s ⁻¹)		$K_{\text{m}}^{\text{app}}$ (μM)		$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	
cGloII WT [1]	120	(32%)	100 ± 10	(88%)	1.2 × 10 ⁶	(36%)
cGloII WT	375 ± 61	(100%)	114 ± 12	(100%)	3.3 × 10 ⁶	(100%)
cGloII R154K	285 ± 65	(76%)	116 ± 14	(102%)	2.4 × 10 ⁶	(73%)
cGloII R154M	222 ± 48	(59%)	275 ± 34	(241%)	8.1 × 10 ⁵	(25%)
cGloII R257Q	67 ± 32	(18%)	ⁱ 2551 ± 130	(2238%)	3.0 × 10 ⁴	(0.9%)
cGloII R257D	60 ± 30	(16%)	ⁱ 5782 ± 3074	(5072%)	1.1 × 10 ⁴	(0.3%)
cGloII K260Q	171 ± 37	(46%)	ⁱ 4308 ± 1200	(3779%)	4.1 × 10 ⁴	(1.2%)
cGloII K260D	74 ± 43	(20%)	ⁱ 2867 ± 1409	(2515%)	2.6 × 10 ⁴	(0.8%)

Tabelle 3.4: Kinetische Parameter für *PfcGloII* WT und Mutanten. ⁱ Die Genauigkeit der hohen $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ -Werte wird dadurch beeinflusst, dass aufgrund der Eigenabsorption des Substrats bei 240 nm höchstens 0.7 mM S-D-Lactoylglutathion (SDL) im GloII-Assay eingesetzt werden können.

Für eine ausführliche Studie der Substratbindung und des Katalysemechanismus wurde zuerst ein molekulares Modell der Glutathionbindungsstelle (Abb. 3.8) erstellt. Ausgehend von diesem Modell wurden die konservierten Aminosäuren Arg154, Arg257 und Lys260 ausgewählt (siehe auch Abb. 1.10) und mittels ortsgerichteter Mutagenese jeweils durch zwei verschiedene Aminosäuren ersetzt, die nach ihren strukturellen Eigenschaften und ihren Konformationsparametern [26] ausgewählt wurden (weitere Details siehe 4.3.2). Alle rekombinanten Enzyme (WT und Mutanten) wurden in löslicher Form in *E. coli* exprimiert und zwischen 25 und 70 nmol (0.8 bis 2.2 mg) an reinem Protein (Abb. 3.9 A) pro Liter Kultur gewonnen. Gelfiltrationschromatographie (Abb. 3.5 A, Tab. 3.3) und CD-Spektroskopie zeigten (Abb. 3.9 B), dass sowohl WT als auch Mutanten richtig gefaltet sind. Nach der Aufreinigung verlor rekombinante *PfcGloII* innerhalb von 5 Tagen ca. 20 - 50 % an Aktivität, während die Mutanten bereits nach 2 Tagen ca. 30 - 50 % an Aktivität verloren. Ähnliche Aktivitätsverluste wurden bereits bei hGloII beobachtet [102]. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde deshalb immer mit frisch aufgereinigtem Enzym gearbeitet. Der Aktivitätsverlust wurde auch nicht durch die Zugabe von 10 bzw. 20 % Glycerin (final) in den Puffer verzögert. Stattdessen verlor *PfcGloII* ca. 50 % an Aktivität in der sofort darauffolgenden Kontrollmessung.

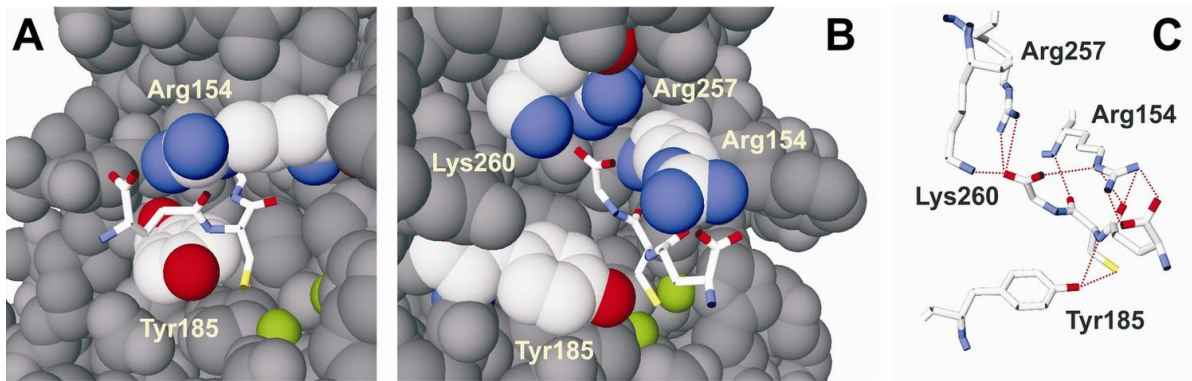


Abbildung 3.8: Molekulares Modell der Glutathionbindungsstelle von *PfcGloII* [V.1]. Die Aminosäuren, die an der Bindung beteiligt sind, sind hervorgehoben. Die Metallionen, die an der Hydrolyse im katalytischen Zentrum beteiligt sind, sind grün. Glutathion ist im Stäbchenmodell dargestellt. A) Seitliche Ansicht. B) Vorderansicht. Die drei Aminosäuren Arg154, Arg257 und Lys260 werden zusätzlich durch das Glutathionrückgrat vom katalytischen Zentrum abgetrennt. C) Mögliche Wasserstoffbrücken zwischen Glutathion und den Heteroatomen der entsprechenden Aminosäuren von *PfcGloII*. Der Abstand der Heteroatome der Seitenketten von Arg257 und Lys260 untereinander beträgt mehr als 4.5 Å. Die Seitenkette von Arg154 befindet sich 10 Å vom katalytischen Zentrum entfernt, während die Seitenketten von Arg257 und Lys260 ca. 11 Å bzw. 13 Å entfernt sind. Außerdem sind Arg257 und Lys260 durch das Glutathionrückgrat vom Reaktionszentrum abgeschirmt. Das Modell wurde basierend auf der Struktur von hGloII (PDB-Eintrag 1QH5) erstellt [24].

3.3.3 Die Aktivität von *PfcGloII* ist salz- und pH-abhängig

Aktivitätsmessungen zeigten, dass sowohl *PfcGloII* WT als auch die Mutanten im Bereich der untersuchten Substratkonzentration einer typischen Michaelis-Menten Kinetik folgten (Abb. 3.9 E). Bei Messungen der Enzymaktivität von *PfcGloII* WT mit einer ansteigenden Salzkonzentration im Assay stellte sich heraus, dass das Enzym mit Anstieg der Salzkonzentration an Aktivität verliert. Die Aktivität sank bei einer Substratkonzentration von 0.4 mM auf unter 50 %, sobald die Salzkonzentration auf 0.4 M erhöht wurde (Abb. 3.9 D). Genauere Untersuchungen enthüllten, dass die katalytische Effizienz bei 0.4 M Salz auf weniger als ein Viertel der Effizienz in salzfreiem Puffer reduziert wurde, da sowohl K_m^{app} anstieg als auch $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ absank (Abb. 3.9 E). Der Verlust der Aktivität wurde nicht durch salzbedingte Proteinpräzipitation bedingt und ähnliches wurde bei hGloII nachgewiesen [102]. Deswegen wurden alle weiteren Untersuchungen in salzfreiem Puffer durchgeführt und selbst beim Einsatz von hohen Enzymkonzentrationen (z.B. für *PfcGloII* R254D) stieg die finale Salzkonzentration nicht über 5 mM.

Zusätzlich wurde das Verhalten von *PfcGloII* WT bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität stark vom verwendeten pH abhängig war. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da saure und basische Reste im Substrat

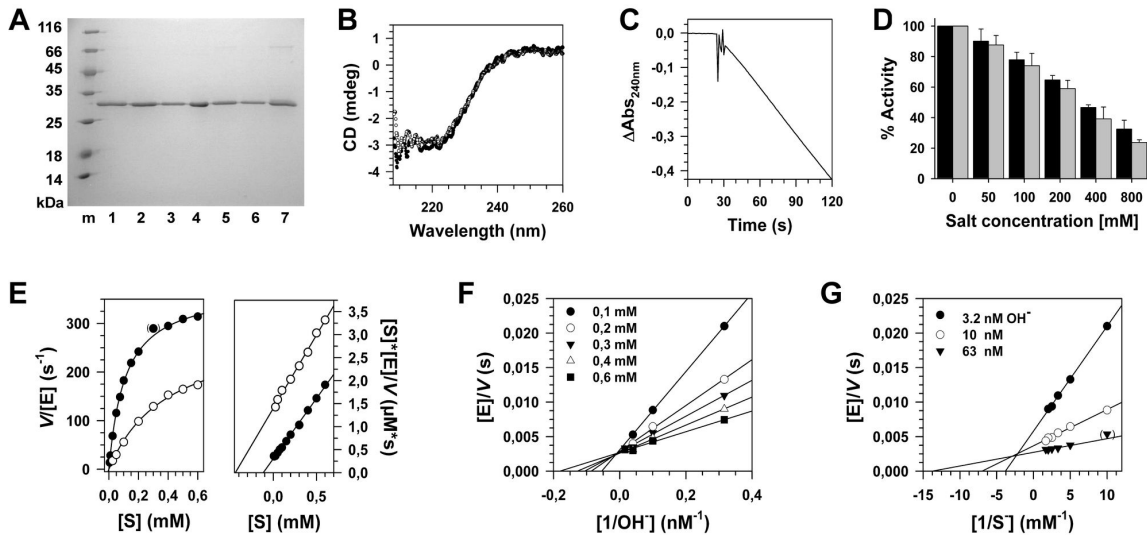


Abbildung 3.9: Die Aktivität von *PfcGloII* ist salz- und pH-abhängig [V.1]. A) Die rekombinanten *PfcGloII*-Enzyme wurden mittels SDS-PAGE (15 %) auf ihre Reinheit untersucht. m: Marker, 1: cGloII WT, 2: cGloII R154K, 3: cGloII R154M 4: cGloII R257D, 5: cGloII R257Q, 6: cGloII K260D, 7: cGloII K260Q. B) CD-Spektrum von 12 μM K260D und WT (offene bzw. geschlossene Kreise). Beide Spektren ließen sich überlagern und deuten darauf hin, dass die verminderte Aktivität der Mutanten nicht durch Fehlfaltung bedingt ist. Der Sekundärstrukturgehalt (26 % α -Helices und 26 % β -Faltblatt) konnte nur abgeschätzt werden, da der verwendete Puffer zu einer starken Absorption bei Wellenlängen unter 210 nm führte. C) Beispiel eines Zeitverlaufs einer einzelnen cGloII-Aktivitätsbestimmung mit 5 nM cGloII WT und 0.4 mM SDL. Bevor durch die Zugabe von Enzym die Messung gestartet wurde, wurde eine Basislinie von 30 sec aufgezeichnet. Es wurde ebenfalls kontrolliert, wie sich der Reaktionsverlauf verhält, wenn die Messung durch Zugabe von Substrat gestartet wird. Dabei wurde kein Unterschied festgestellt. D) Verlust der Enzymaktivität bei steigender Salzkonzentration. Schwarze Balken: KCl, graue Balken: NaCl. E) Die Enzymaktivität folgte einer Michaelis-Menten Kinetik. Die Ergebnisse einer repräsentativen Enzymmessung wurden direkt (links) oder nach Hanes (rechts) aufgetragen. K_m^{app} und $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ lagen in salzfreiem Puffer (geschlossene Kreise) bei $111 \pm 3 \mu\text{M}$ bzw. $374 \pm 3 \text{ s}^{-1}$. Bei Verwendung von 0.4 M NaCl (offene Kreise) im Puffer stieg K_m^{app} auf $402 \pm 30 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ sank auf $297 \pm 12 \text{ s}^{-1}$. F) und G) Ergebnisse eines einzelnen Experiments mit Variation der SDL-Konzentration sowie des pH in doppelt-reziproker Auftragung.

und im aktiven Zentrum vorhanden sind (siehe Abb. 3.8) und postuliert wurde, dass das für die Hydrolyse benötigte nukleophile Hydroxidion aus dem gebundenen Wasser gebildet wird [24]. Wenn nun die SDL-Konzentration von 0.1 bis 0.6 mM sowie der pH von 5.5 bis 6.8 (entspricht einer Hydroxidkonzentration von 3 bis 63 nM) variiert und die erhaltene Reaktionsgeschwindigkeit reziprok gegen die reziproke Hydroxidionkonzentration aufgetragen wurde, ergaben sich gerade Linien. Dabei lag der Schnittpunkt oberhalb der x-Achse sowie äußerst nahe an der y-Achse (Abb. 3.9 F). Auch beim Auftragen der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke SDL-Konzentration ergaben sich gerade Linien,

die einen Schnittpunkt oberhalb der x-Achse und links der y-Achse hatten (Abb. 3.9 G). Nach Bisswanger [16] bilden sich bei Mehrsubstratreaktionen in der doppelt-reziproken Darstellung Geraden mit einem gemeinsamen Schnittpunkt links der y-Achse. Die theoretischen K_m^{app} -Werte für OH^- nahmen bei einem Anstieg der SDL-Konzentration ab und lagen zwischen 20 und 6 nM. Die theoretischen K_m^{app} -Werte für SDL nahmen ebenfalls bei einem Anstieg der OH^- -Konzentration ab und lagen in einem Bereich von 260 bis 75 μM . Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass hier ein Bi-Bi Mechanismus vorliegt, bei dem das Hydroxidion als zweites Substrat beteiligt ist. Eine Unterscheidung, ob ein geordneter oder zufälliger Mehrsubstratmechanismus vorliegt, ist jedoch nur über die Analyse der Produkthemmung möglich [16].

3.3.4 *PfcGloII* arbeitet mittels Theorell-Chance-Mechanismus

Bislang wurden nur zwei Produktinhibitionsstudien für GloII aus *Arabidopsis* [115] und Mensch [102] durchgeführt, die jedoch unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Um mehr über die Produktfreisetzung zu erfahren, wurden nun an *PfcGloII* WT Produktinhibitionsstudien mit D-Lactat, GSH oder dem Ethylester von GSH (GSH-EE) durchgeführt. Bei letzterer Substanz wurde die Carboxylgruppe von Glycin modifiziert. D-Lactat (in millimolarer Konzentration) inhibierte *PfcGloII* kompetitiv, wie deutlich anhand der parallelen Linien im Hanes-Plot (Abb. 3.10 A) sowie dem Schnittpunkt der Geraden auf der y-Achse im Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 3.10 B) zu erkennen ist. Dahingegen wurde eine nicht-kompetitive Inhibition durch GSH oder GSH-EE festgestellt (in einigen Textbüchern wird dieser Typ Inhibition auch als gemischte Inhibition bezeichnet) (Abb. 3.10 A + B). Anhand der Daten aus dem Lineweaver-Burk-Plot wurden Sekundärdiagramme zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten K_i^{slope} und K_i^{int} angefertigt (Abb. 3.10 C). In Übereinstimmung mit dem K_i -Wert aus dem entsprechenden Dixon-Plot (Abb. 3.10 D), konnte für D-Lactat ein K_i^{slope} -Wert von 31 mM bestimmt werden. Dieser Wert gibt üblicherweise an, wie stark die Bindung des Inhibitors an das freie Enzym ist. Für GSH und GSH-EE konnte ein K_i^{slope} -Wert von 3.5 bzw. 14 mM (Abb. 3.10 C + D) und ein K_i^{int} -Wert von 13 bzw. 49 mM (Abb. 3.10 C) bestimmt werden. Nachdem K_i^{slope} niedriger ist als K_i^{int} und der Schnittpunkt der Geraden in Abb. 3.10 B sich über der x-Achse befindet, behindert in diesem Fall das Substrat die Bindung des Inhibitors an das freie bzw. besetzte Enzym und umgekehrt stört der Hemmstoff auch die Substratbindung [16]. Da beide K_i -Werte für GSH-EE ca. vierfach höher sind als für GSH, lässt sich daraus schließen, dass von den beiden Substanzen GSH der stärkere Inhibitor ist.

Aktivitätsmessungen bei verschiedenen pH-Werten (= verschiedene OH^- -Konzentration) führten zu der Theorie, dass hier ein Bi-Bi Mechanismus mit zwei Substraten, dem Thioester

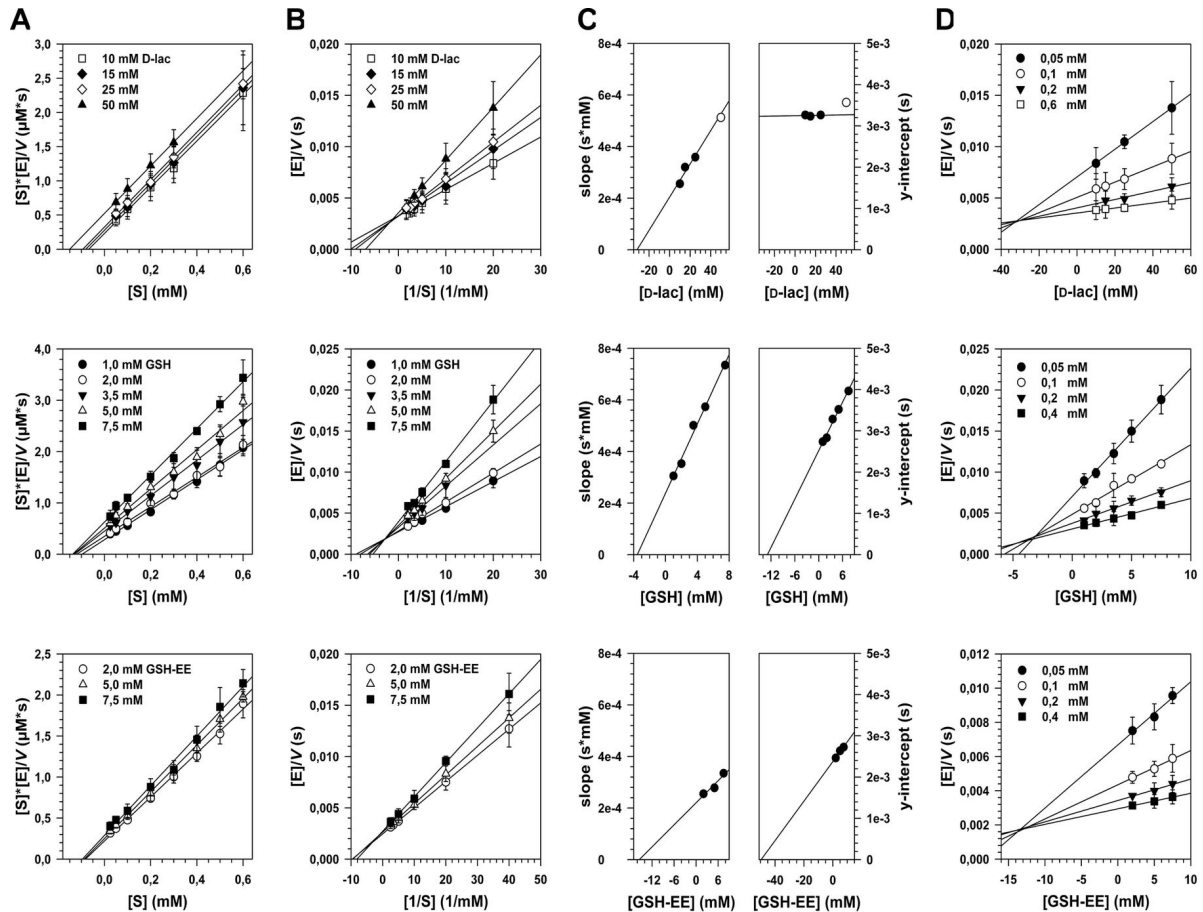


Abbildung 3.10: Produktinhibitionsstudien mit D-Lactat (obere Reihe), GSH (mittlere Reihe) und GSH-EE (untere Reihe) [V.1]. A) Hanes-Plot. B) Lineweaver-Burk-Plot. C) Sekundärdiagramme mit der Steigung bzw. dem y-Achsenabschnitt aus dem Lineweaver-Burk Plot. Die verminderte Aktivität ($k_{\text{cat}}^{\text{app}}$) beim Einsatz von 50 mM Lactat wurde vermutlich durch eine Erhöhung des Salzgehalts durch Inhibitorzugabe ausgelöst (offener Kreis). D) Dixon-Plot.

und dem Hydroxidion, stattfindet. Werden die Inhibitionsmuster unter diesem Gesichtspunkt nach den Angaben in Lehrbüchern zur Enzymkinetik (Segel, pp. 593 - 606 [87] oder nach Bisswanger, Tab. 2.3 [16]) untersucht, können ein Ping-Pong-Mechanismus, ein geordneter und ein iso-geordneter Bi-Bi-Mechanismus ausgeschlossen werden. Stattdessen deuten die Inhibitionsmuster auf einen Theorell-Chance-Mechanismus hin, bei dem D-Lactat zuerst das aktive Zentrum verlässt, gefolgt von GSH. Diese Reihenfolge lässt sich auch durch die gemessenen K_i -Werte bestätigen. Der K_i -Wert von GSH liegt mit ca. 3.5 mM wesentlich niedriger als der K_i -Wert von D-Lactat mit ca. 31 mM und weist somit auf eine stärkere Bindung des GSH an *PfcGloII* hin.

3.3.5 Arg257 und Lys260 sind entscheidend für die Substratbindung

Mutationen der Aminosäuren Arg154, Arg257 und Lys260 hatten einen negativen Einfluss auf die katalytischen Fähigkeiten von *PfcGloII*. Der Austausch von Arg154 zu Lysin hatte keinen Effekt auf K_m^{app} , während der Austausch gegen das ungeladene Methionin zu einem 2.5-fachen Anstieg von K_m^{app} führte. Daraus lässt sich schließen, dass die positiv geladene Seitenkette (unabhängig ob Arginin oder Lysin) an der Substratbindung beteiligt ist. Im Gegensatz dazu hatten die Mutationen von Arg257 und Lys260 einen drastischen Einfluss auf K_m^{app} (Tab. 3.4, Abb. 3.11 C). Der Anstieg von K_m^{app} auf das 20- bis 50-fache zeigte eindrucksvoll, dass diese positiv geladenen Aminosäuren äußerst wichtig für die Substratbindung sind. Zusätzlich wurde eine Doppelmutante (R257Q/K260Q) erstellt, die bis zu einer Enzymkonzentration von 0.5 μM getestet wurde und keinerlei Aktivität zeigte. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Produktinhibitionsstudien, bei denen GSH-EE aufgrund des ungeladenen Ethylesters der ca. vierfach schwächere Inhibitor war. Weiterhin lässt sich erkennen, dass die Affinität von *PfcGloII* R257D zum Substrat aufgrund der negativ geladenen Mutation niedriger ist als bei *PfcGloII* R257Q mit der ungeladenen Mutation. Deswegen scheinen nicht nur Wasserstoffbrücken, sondern vornehmlich ionische Interaktionen für die

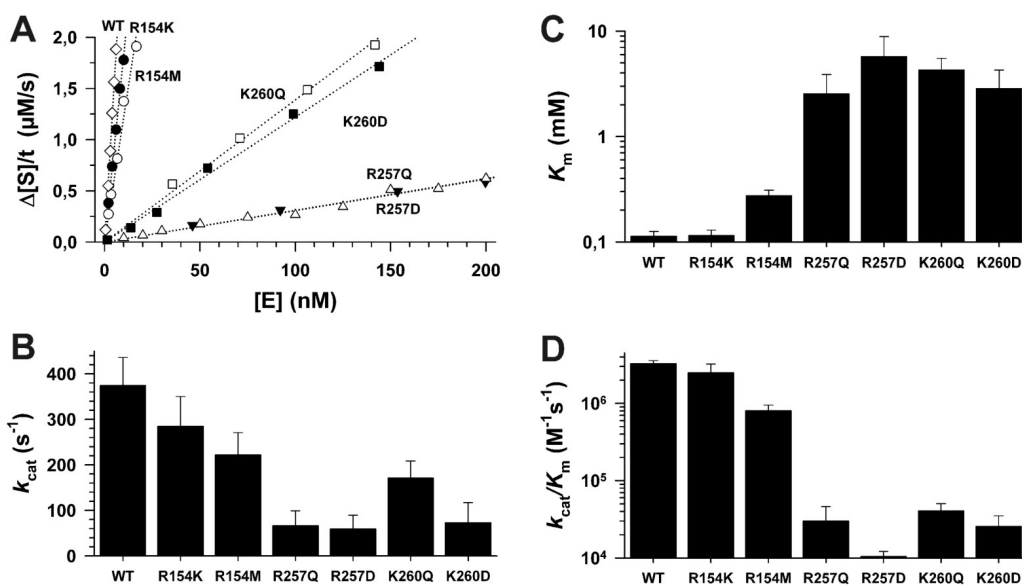


Abbildung 3.11: Enzymkinetische Parameter von cGloII [V.1]. A) Enzymkonzentrationsabhängigkeit. Die gewählten Enzymkonzentrationen von cGloII WT und Mutanten zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter befanden sich alle im linearen Bereich. B) Vergleich von $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$. C) Vergleich von K_m^{app} . D) Vergleich der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_m .

starke Substratbindung verantwortlich zu sein. Die starke ionische Substratbindung erklärt auch die Salzabhängigkeit von cGloII, da geladene Protein- und Substratseitenketten bei hohen Salzkonzentrationen abgeschirmt werden und aufgrund der erniedrigten apparenten Affinität die Reaktionsgeschwindigkeit somit sinkt.

3.3.6 Mutationen der Substratbindungsstelle beeinflussen k_{cat} und verändern die pH-Abhängigkeit

Jede der sechs Mutationen der Substratbindungsstelle hatte ebenfalls einen negativen Effekt auf $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (Tab. 3.4, Abb. 3.11 B), obwohl das Reaktionszentrum strukturell von der Substratbindungsstelle abgetrennt ist (siehe Abb. 3.8). Dabei hatten Mutationen mit dem stärksten Einfluss auf K_{m} zugleich die geringste Aktivität und deuten darauf hin, dass die Substratbindung ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist. Außerdem zeigten sich bei den mutierten *PfcGloII* Enzymen leichte bis drastische Änderungen der pH-Abhängigkeit. Die größte Änderung war in der pH-Abhängigkeit der Mutante *PfcGloII* K260D zu erkennen, bei der die pH-Kurve anstelle des breiten asymmetrischen Verlaufs eine vereinfachte Glockenform annahm (Abb. 3.12 A). Um der Ursache für diese Veränderung auf den Grund zu gehen, wurde das molekulare Modell von *PfcGloII* (Abb. 3.8) auf mögliche strukturelle Änderungen durch die Mutation untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine neu gebildete Salzbrücke zwischen Arg257 und Asp260 die wahrscheinlichste Ursache für die Veränderung ist (Abb. 3.12 B). Durch die Salzbrücke wird die basische Umgebung der Substratbindungsstelle neutralisiert. Im Gegensatz dazu führte die Mutation von Arg257 zu Aspartat im Modell nicht zur Ausbildung einer Salzbrücke. Auch Messungen der pH-Abhängigkeit von *PfcGloII* R257D ergaben keine Änderung des Kurvenverlaufs (Abb. 3.12 A).

Der Vergleich der pH- k_{cat} und pH- $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Profile von *PfcGloII* WT und *PfcGloII* K260D enthüllte zwei wesentliche Ionisierungszustände. Die Messdaten wurden an eine glockenförmige Kurve angepasst [20] und daraus zwei apparente $\text{p}K_{\text{a}}$ -Werte ermittelt (Abb. 3.12 C, Tab. 3.5). Ähnliche Werte wurden auch durch logarithmische Auftragung und graphische Auswertung erhalten (Abb. 3.12 D, Tab. 3.5). Sowohl *PfcGloII* WT als auch die Mutante *PfcGloII* K260D hatten einen sauren $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ von ca. 6 und einen alkalischen $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ von ca. 8.5 in den k_{cat} -Auftragungen. Bei den $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Auftragungen konnte ein leicht erhöhter saurer $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ von ca. 6 ermittelt werden, wohingegen der alkalische $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ auf ca. 7.5 absank. Der saure $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ könnte dabei der Bildung des Hydroxidion im katalytischen Zentrum zugeordnet werden (Details siehe 4.3.4), während der basische $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Wert vermutlich der Substratbindungsstelle zugeordnet werden kann (Details siehe 4.3.3).

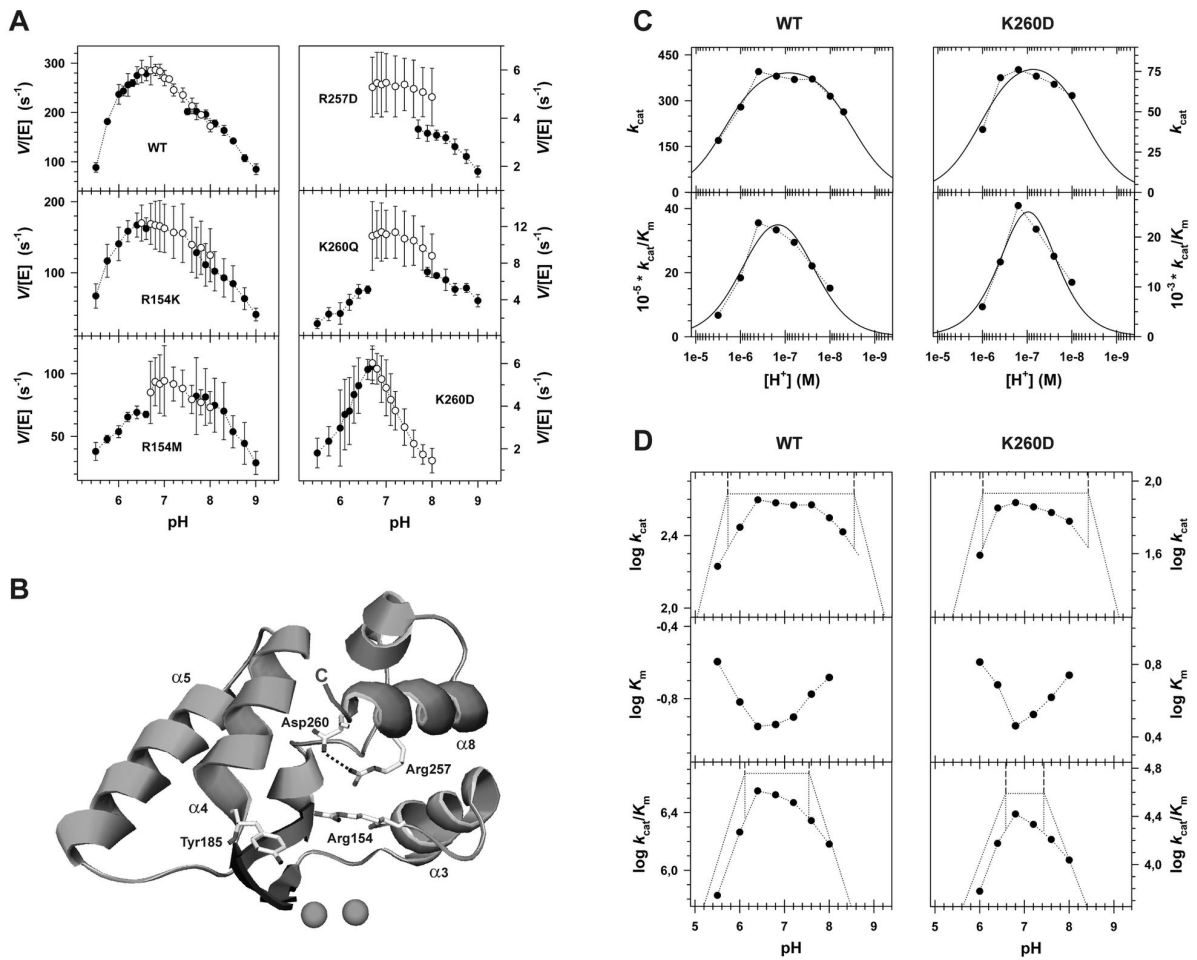


Abbildung 3.12: pH-Profil und pK-Wert-Bestimmung von *PfcGloII* WT und Mutanten [V.1]. A) pH-Aktivitätsabhängigkeit bei 0.4 mM Substrat bei 25 °C. Drei verschiedene Puffer mit entweder 100 mM MES (pH 5.5–6.7), 100 mM MOPS (pH 6.5–8.0) oder 100 mM Tris (pH 7.5–9.0) wurden für die Messungen verwendet. B) Modell der Ausbildung einer neuen Salzbrücke zwischen Arg257 und Asp260 in der Mutante *PfcGloII* K260D. C) pH- k_{cat} und pH- k_{cat}/K_m -Profile für *PfcGloII* WT (links) und *PfcGloII* K260D (rechts). Die Kurven wurden mittels der Gleichungen $k_{\text{cat}}' = k_{\text{cat}}/(1+[H^+]/K_1+K_2/[H^+])$ (obere Diagramme) und $k_{\text{cat}}/K_m = (k_{\text{cat}}'/K_m')/(1+[H^+]/K_3+K_4/[H^+])$ (untere Diagramme) [20] angepasst und die Werte für die Parameter durch nicht-lineare Regression in SigmaPlot 10.0 bestimmt (siehe Tab. 3.5). D) pH- $\log k_{\text{cat}}$, pH- $\log K_m$ und pH- $\log k_{\text{cat}}/K_m$ -Profile für *PfcGloII* WT (links) und *PfcGloII* K260D (rechts). Geraden mit einer Steigung von 0 wurden bei $\log k_{\text{cat}}'$ und $\log k_{\text{cat}}'/K_m'$ anhand der Werte aus (C) gezogen. Geraden mit einer Steigung von +1 und -1 wurden so angelegt, dass sich der Schnittpunkt beider Geraden an jener Stelle befindet, an der der Abstand vom Schnittpunkt zu den Messdaten 0.3 (log2) beträgt [20]. Die dadurch abgeschätzten $\text{p}K_a^{\text{app}}$ -Werte sind jeweils an der x-Achse angedeutet sowie in Tab. 3.5 aufgelistet.

	cGloII WT		cGloII K260D	
k_{cat}'	$420 \pm 17 \text{ s}^{-1}$		$86 \pm 9 \text{ s}^{-1}$	
K_1	$2.3 \pm 0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (pH 5.6)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 5.7$)	$1.1 \pm 0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (pH 6.0)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 6.0$)
K_2	$3.2 \pm 0,7 \times 10^{-9} \text{ M}$ (pH 8.5)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 8.6$)	$5.1 \pm 2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ (pH 8.3)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 8.4$)
$k_{\text{cat}}'/K_{\text{m}}'$	$4.9 \pm 0.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$		$4.1 \pm 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	
K_3	$7.3 \pm 3.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ (pH 6.1)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 6.1$)	$1.9 \pm 1.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ (pH 6.7)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 6.6$)
K_4	$2.9 \pm 1.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ (pH 7.5)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 7.6$)	$4.8 \pm 3.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ (pH 7.3)	($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}} = 7.4$)

Tabelle 3.5: Parameter aus Abb. 3.12 C sowie $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Werte (in Klammern) aus Abb. 3.12 D. Die ermittelten $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Werte stehen dabei in sehr guter Übereinstimmung mit den ermittelten K_{1-4} -Werten.

Obwohl bei jeder Auswertung jeweils zwei $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Werte bestimmt wurden, ist aus den Kurven dennoch ersichtlich, dass die Anpassung an eine einfache, glockenförmige Kurve nicht optimal ist. Daher ist es gut möglich, dass mehr als zwei relevante Ionisierungszustände vorliegen. Zusätzlich lassen die unterschiedlich geformten Kurven von *PfcGloII* WT und der Mutante *PfcGloII* K260D, trotz der ähnlichen $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Werte, darauf schließen, dass die Mutation einer der basischen Aminosäurereste einen erheblichen Einfluss auf einen kinetisch bedeutenden $\text{p}K_{\text{a}}$ -Wert hat.

3.4 Inhibitionsstudien *in vitro* und *in vivo*

In letzter Zeit wurden neue Inhibitoren von GloI entdeckt bzw. bekannte Strukturen wurden für eine effektivere Wirkung weiterentwickelt. Dazu gehörten Methylgerfelin [60], Curcumin [86] sowie strukturell verbesserte Glutathionderivate [73]. Um diese Substanzen an rekombinanter *PfGloI* und in Zellkultur zu testen, wurden Stocklösungen entweder in Methanol (Curcumin und Methylgerfelin) bzw. DMSO (Compound 5 und 26) angesetzt. Als Kontrolle wurde der Einfluss von Methanol und DMSO auf die Enzymaktivität von *PfGloI* untersucht. Dabei zeigten Methanol und DMSO in Konzentrationen bis zu 2 % (v/v) keinen nennenswerten Einfluss auf die Enzymaktivität. Bei den Enzymassays lag die höchste Endkonzentration an Methanol für Curcumin bei 1 % und für Methylgerfelin bei 0.5 %, während die höchste Endkonzentration an DMSO für Compound 5 bei 0.0005 ‰ und für Compound 26 bei 0.005 ‰ lag.

3.4.1 Curcumin ist ein kompetitiver Inhibitor von *Pf*GloI und bindet bevorzugt an das hochaffine aktive Zentrum

Curcumin wurde in verschiedenen Konzentrationen auf seine Wirkung auf rekombinante *Pf*GloI bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen untersucht. Bei der Auswertung ergab sich ein komplexes Inhibitionsmuster: Lineweaver-Burk-Plots (Abb. 3.13 A) deuten auf eine kompetitive Inhibition durch Curcumin hin, dessen Wirkung bei einer Substratkonzentration über 0.25 mM Hemithioacetal aufgehoben wird (Abb. 3.13 B). Zur Bestimmung des K_i^{app} -Wertes wurde mit den Steigungen aus dem Lineweaver-Burk-Plot ein Sekundärdiagramm angefertigt [87]. Im Gegensatz zu einer einfachen, kompetitiven Inhibition ergab sich keine einzelne gerade Linie, sondern es konnten zwei Geraden angelegt werden (Abb. 3.13 C). Somit konnten für Curcumin zwei apparente K_i -Werte ermittelt werden, die bei ca. 25 μM und 0.2 mM für niedrige bzw. hohe Inhibitorkonzentrationen lagen. Ähnliche Werte wurden aus den nicht-linearen Dixon-Plots abgelesen (Abb. 3.13 D).

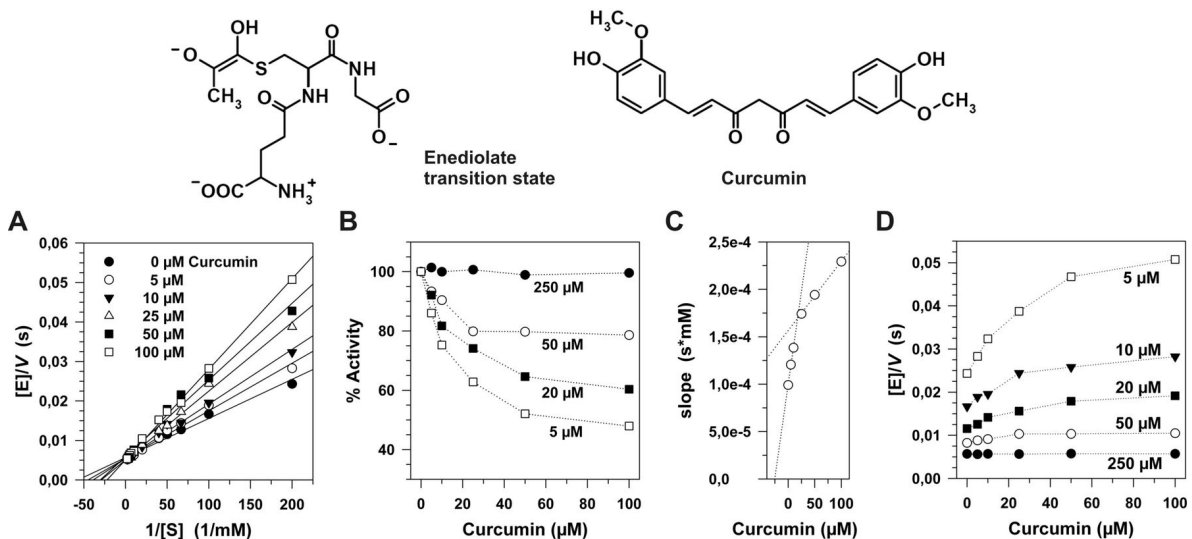


Abbildung 3.13: Inhibition der *Pf*GloI durch Curcumin [V.2]. A) Lineweaver-Burk. B) Die inhibitorische Wirkung von Curcumin lässt bei steigenden Substratkonzentrationen nach. Insgesamt wurde maximal eine 50 %ige Inhibition erreicht. C) Sekundärdiagramm mit der ermittelten Steigung aus Lineweaver-Burk. D) Dixon.

Eine Ursache für dieses komplexe Inhibitionsmuster könnte in der Ausbildung eines Curcumin-Glutathionkonjugats [9] liegen, das als zweiter Inhibitor im Enzymassay wirkt. Deswegen wurde der Inhibitor entweder für eine oder fünf Minuten während der Vorinkubationszeit hinzugefügt oder direkt nach dem Enzym in den Assay gegeben. Anschließend wurde die Wirkung auf die Enzymaktivität verglichen und es konnte kein Unterschied fest-

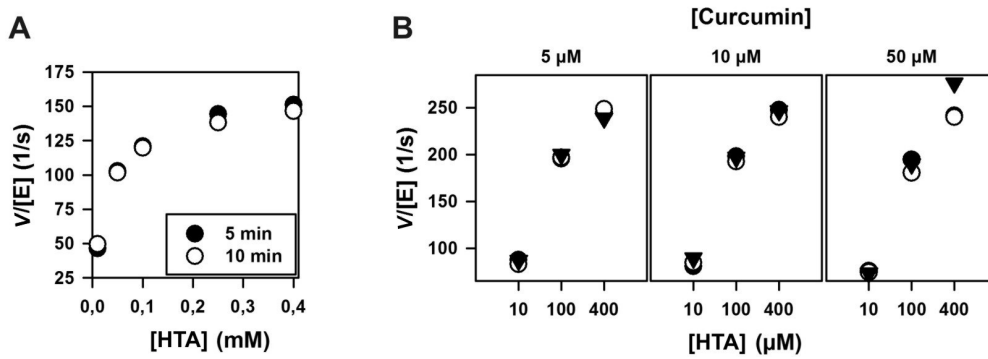


Abbildung 3.14: Einfluss der unterschiedlichen Vorinkubationsdauer von MGO und GSH sowie Curcumin auf die Enzymaktivität [V.2]. A) Die Verlängerung der Vorinkubationszeit von 5 auf 10 min zur Ausbildung des Hemithioacetals (HTA) hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der rekombinanten *PfGloI*. B) Einfluss der Vorinkubationsdauer von Curcumin bei niedrigen, mittleren und hohen Substratkonzentrationen. Vorinkubationsdauer 1 min (offene Kreise), 5 min (geschlossene Kreise) und 0 min (geschlossene Dreiecke). Wenn ein Curcumin-Glutathionkonjugat für das komplexe Muster verantwortlich wäre, sollte die verlängerte Vorinkubationszeit von 5 min für die vermehrte Bildung des Konjugats sorgen und die Enzymaktivität verändern. Im Gegensatz dazu sollte die Zugabe von Inhibitor zusammen mit dem Enzym die Bildung des Konjugats drastisch senken. In 17 von 18 vergleichenden Messungen konnte kein Unterschied nachgewiesen werden, da die Ausbildung des Konjugats vermutlich entweder zu langsam abläuft oder keinerlei Einfluss auf die Aktivität hat. Es bleibt jedoch ungeklärt, warum bei 0,4 mM Substrat und 50 μM Curcumin die Aktivität bei direkter Zugabe von Enzym und Inhibitor wiederholt etwas höher lag.

gestellt werden (Abb. 3.14 B). Die Ausbildung eines Curcumin-Glutathionkonjugats scheint somit nicht der Grund für die beiden K_i^{app} -Werte zu sein. Außerdem führte die Inhibition von hGloI durch Curcumin zu linearen Dixon-Plots [86]. Deswegen ist es wesentlich wahrscheinlicher, dass die zwei unterschiedlich aktiven Zentren und Konformationen der *PfGloI* für dieses Inhibitionsmuster verantwortlich sind (siehe Abb. 1.6). Dementsprechend könnten die beiden K_i^{app} -Werte jeweils für die Bindung an eines der aktiven Zentren oder an die zwei unterschiedlichen Konformationen stehen. Die Beobachtung, dass die Enzymaktivität selbst bei niedrigen Substratkonzentrationen und hohen Inhibitorkonzentrationen nicht unter 50 % absank (Abb. 3.13 B), deutet darauf hin, dass eines der aktiven Zentren vollständig inaktiviert wird, während das andere noch funktionsfähig bleibt. Infolgedessen wurde die Wirkung von Curcumin auf die Mutanten *PfGloI* E345Q (aktives Zentrum A inaktiv) und *PfGloI* E272Q (aktives Zentrum B inaktiv) untersucht (Abb. 3.15). Bei den Messungen wurde ersichtlich, dass Curcumin keinen sofortigen Einfluss auf die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit von *PfGloI* E345Q zeigt (Abb. 3.15 Mitte). Im Gegensatz dazu wurde die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit von *PfGloI* WT (Abb. 3.15 links) und *PfGloI* E272Q (Abb. 3.15 rechts) stark reduziert. *PfGloI* E345Q besitzt ein funktionelles Reaktionszentrum

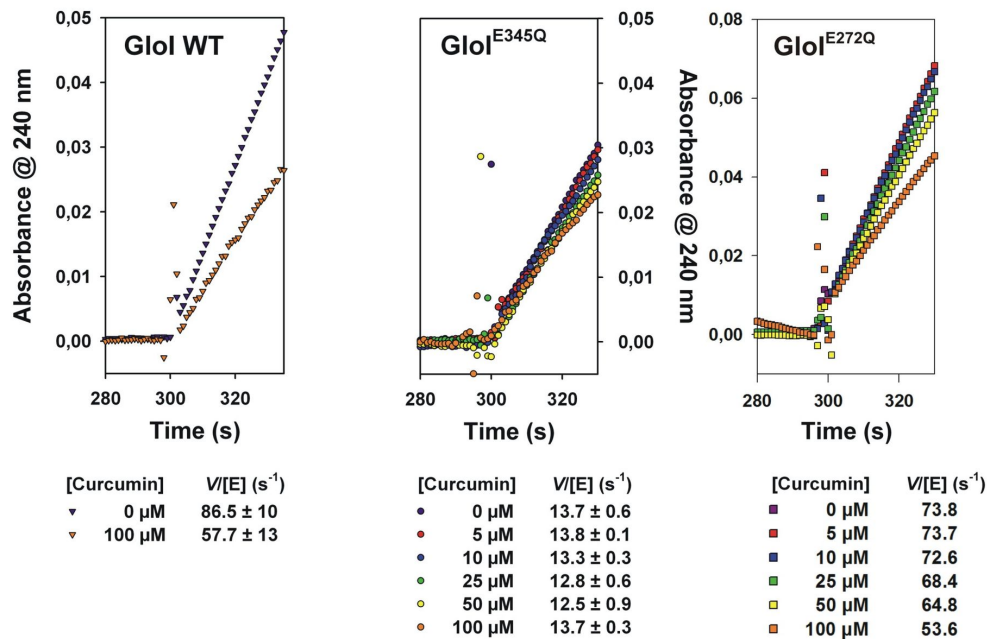


Abbildung 3.15: Vergleich der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von *PfGloI* WT, E345Q und E272Q bei 20 μ M Substrat mit 0 - 100 μ M Curcumin [V.2]. Die Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit ($V/[E]$) wurden aus der Anfangssteigung ermittelt und auf die eingesetzte Enzymkonzentration bezogen. WT: 5 nM, E345Q: 20 nM, E272Q: 8 nM.

B mit niedriger Substrataffinität, während Zentrum A mit hoher Substrataffinität inaktiviert ist. Die fehlende sofortige Inhibition durch Curcumin bestätigt die Theorie, dass nur ein aktives Zentrum inhibiert wird, in diesem Fall das bereits inaktive Reaktionszentrum A. Bei der Mutante *PfGloI* E272Q ist Reaktionszentrum A immer noch aktiv und kann deswegen durch Curcumin inhibiert werden.

3.4.2 Methylgerfelin ist ein kompetitiver Inhibitor von *PfGloI*, der auf beide aktive Zentren wirkt

Methylgerfelin (MGFN) inhibiert ebenfalls *PfGloI* kompetitiv (Abb. 3.16 A), jedoch mit einer erheblich besseren Wirkung als Curcumin. Mit weniger als einem Zehntel an Inhibitor wurden ähnliche Restaktivitäten von rekombinanter *PfGloI* gemessen. Außerdem wurde noch bei Substratkonzentrationen über 0.25 mM eine inhibitorische Wirkung erzielt (Abb. 3.16 B). Auch hier wurden zwei K_i^{app} -Werte bestimmt (Abb. 3.16 C), jedoch sind diese mit ca. 2 und 6 μ M sehr ähnlich und lassen darauf schließen, dass im Fall von Methylgerfelin beide aktive Zentren von *PfGloI* gehemmt werden. Die Auswertung der nicht-linearen Dixon-Plots führte zu ähnlichen K_i^{app} -Werten (Abb. 3.16 D).

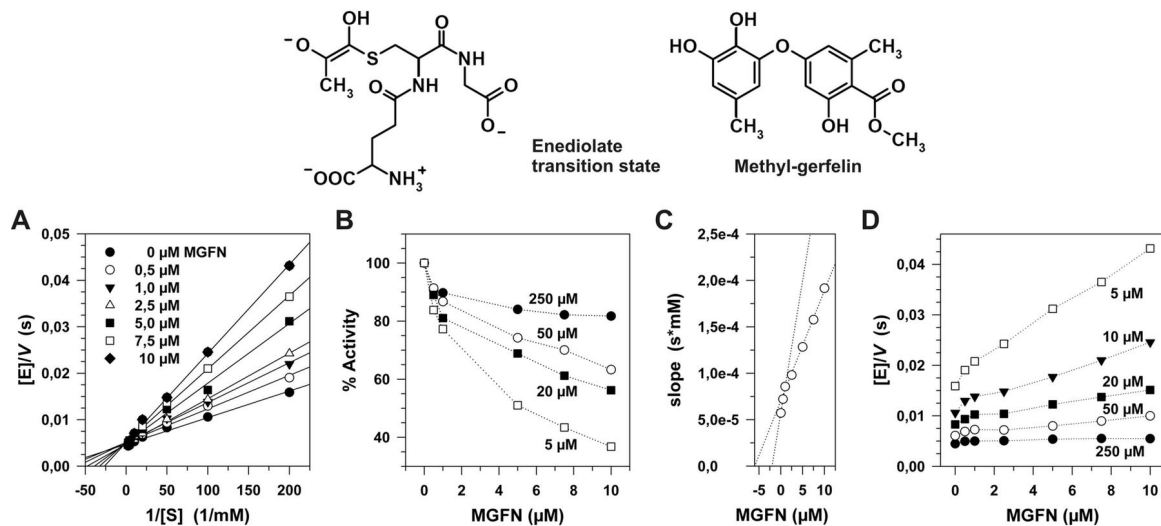


Abbildung 3.16: Inhibition der *PfGloI* durch Methylgerfelin [V.2]. A) Lineweaver-Burk. B) Auch bei MGFN lässt die inhibitorische Wirkung bei steigenden Substratkonzentrationen nach. Jedoch reichen diesmal 0,25 mM Hemithioacetal nicht aus, um die Wirkung des Inhibitors aufzuheben. Zudem war eine Inhibition von über 50 % möglich. C) Sekundärdiagramm mit der ermittelten Steigung aus Lineweaver-Burk. D) Dixon.

3.4.3 Compound 5 und 26 inhibieren rekombinante *PfGloI* im nanomolaren Bereich

Compound 5 und 26 sind eine Weiterentwicklung bisheriger Glutathionderivate (siehe Tab. 1.2) und die ersten Inhibitoren, die auf *GloI* aus Hefe eine Wirkung im niedrigen nanomolaren Bereich zeigten (6 bzw. 33 nM) [73]. Um festzustellen, ob diese Inhibitoren ebenfalls rekombinante *PfGloI* effektiv inhibieren können, wurden von Prof. Vince freundlicherweise die Substanzen Compound 5 und 26 (Struktur siehe Abb. 3.17) bereitgestellt.

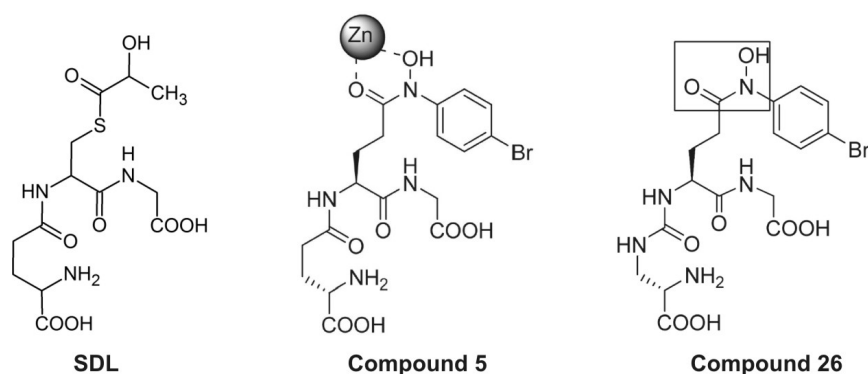


Abbildung 3.17: Vergleich der Struktur der verbesserten Glutathionderivate Compound 5 und 26 (aus [73]) mit dem Produkt der *GloI* (SDL).

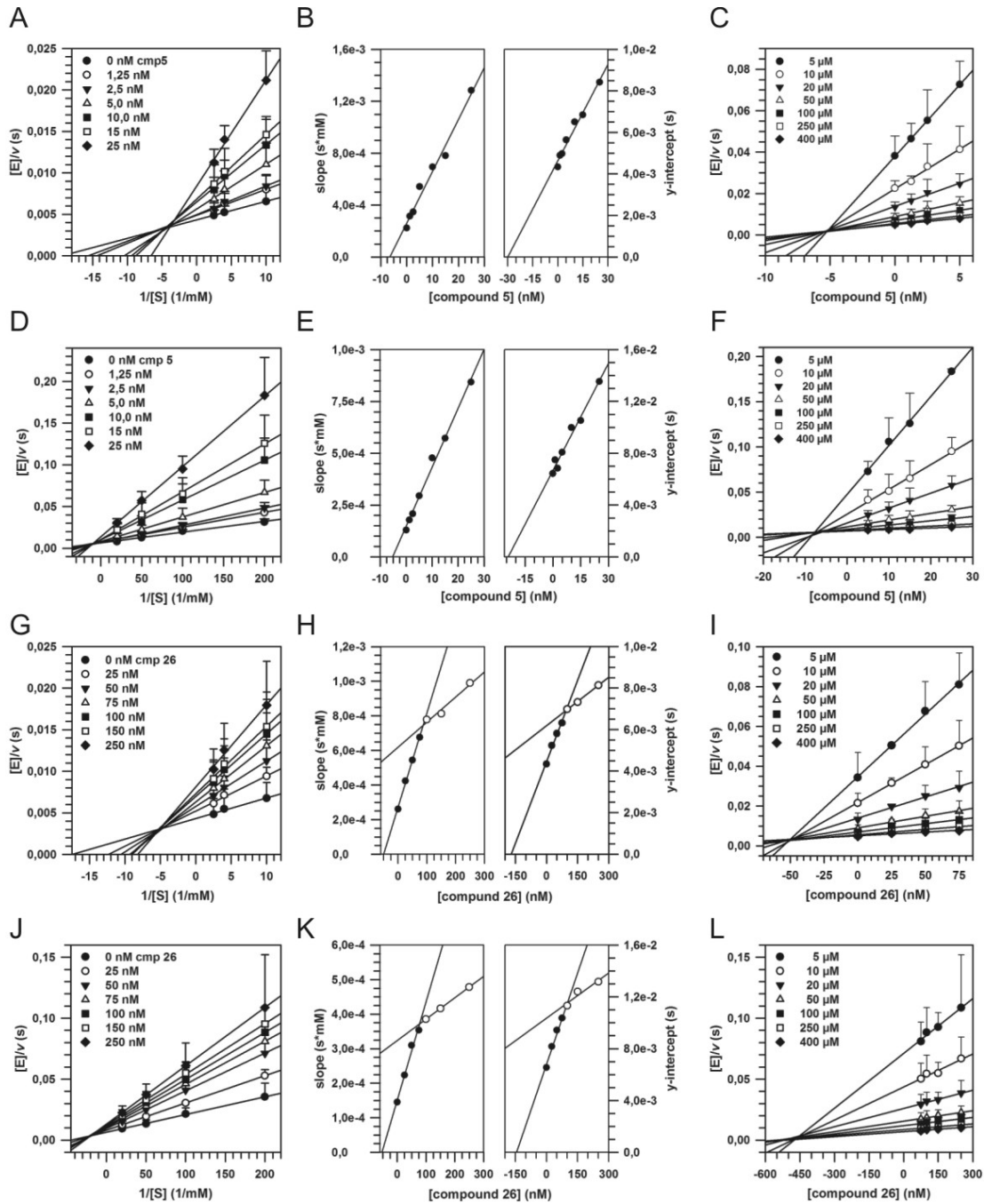


Abbildung 3.18: Inhibition von rekombinanter *PfGloI* mit Compound 5 und 26. Links: Lineweaver-Burk-Plot, Mitte: Sekundärdiagramm, rechts: Dixon-Plot. Für weitere Details siehe Text.

Sowohl bei hohen (Abb. 3.18 A) als auch bei niedrigen (Abb. 3.18 D) Substratkonzentrationen ist im Lineweaver-Burk-Plot eine nicht-kompetitive (gemischte) Hemmung von Compound 5 zu erkennen. Aus den dazugehörigen Sekundärdiagrammen ([I] versus slope) wurden zwei ähnliche apparente K_i -Werte von 7 und 5 nM für hohe (Abb. 3.18 B) bzw. nied-

rige (Abb. 3.18 E) Substratkonzentrationen bestimmt. Aus den Sekundärdiagrammen gegen den y-Achsenabschnitt ($[I]$ versus y-intercept) wurden ebenfalls zwei ähnliche αK_i -Werte von 30 und 25 nM für hohe (Abb. 3.18 B) bzw. niedrige (Abb. 3.18 E) Substratkonzentrationen bestimmt. Nachdem der Schnittpunkt sich in den Lineweaver-Burk-Plots oberhalb der x-Achse befindet, behindert in diesem Fall das Substrat die Bindung des Hemmstoffs und umgekehrt [16]. Der Faktor α (ca. 5 für Compound 5) spiegelt üblicherweise den Effekt des Inhibitors auf die Substrataffinität sowie gleichermaßen den Effekt des Substrats auf die Affinität des Enzyms für den Inhibitor wider [27]. Die Auswertung der Dixon-Plots bei niedrigen (Abb. 3.18 C) bzw. hohen (Abb. 3.18 F) Inhibitorkonzentrationen ergab übereinstimmende apparente K_i -Werte von 5 und 7 nM. Somit wurde eine Inhibition im niedrigen nanomolaren Bereich durch Compound 5 auch für rekombinante *PfGloI* nachgewiesen.

Auch Compound 26 ließ im Lineweaver-Burk-Plot eine nicht-kompetitive Inhibition bei hohen (Abb. 3.18 G) als auch bei niedrigen (Abb. 3.18 J) Substratkonzentrationen erkennen. Jedoch zeigt dieser Inhibitor wieder ein biphasisches Verhalten in den Sekundärdiagrammen. Die beiden ermittelten K_i^{app} -Werte lagen für hohe (Abb. 3.18 H) und niedrige (Abb. 3.18 K) Substratkonzentrationen bei ca. 450 und 50 nM, die ermittelten αK_i -Werte bei ca. 850 und 150 nM (α ca. 2 bzw. 3). Auch hier scheint der Inhibitor die Bindung des Substrats und umgekehrt zu beeinflussen [16,27]. Ähnliche apparente K_i -Werte konnten auch aus den Dixon-Plots bei niedrigen (Abb. 3.18 I) bzw. hohen (Abb. 3.18 L) Inhibitorkonzentrationen abgelesen werden.

Bei den Inhibitionsstudien wurde *PfGloI* in einer Konzentration von 5 nM eingesetzt. Compound 5 und 26 hemmen dieses Enzym somit in einer equimolaren bzw. ca. 10-fach erhöhten Konzentration und sind vermutlich entweder fest bindende („tight-binding“) und/oder langsam bindende („slow-binding“) Inhibitoren [27] (siehe 4.4.2).

3.4.4 Methygerfelin hemmt das Wachstum von *Plasmodium falciparum*

Methylgerfelin (MGFN) wurde zusätzlich auf seine Wirkung auf *P. falciparum* in Zellkultur getestet. Beim Auswerten der Blutausstriche konnte festgestellt werden, dass das Ringstadium empfindlicher auf eine Inhibition reagierte. In Sorbitol-synchronisierten Zellkulturen lag der IC_{50} bei ca. 10 μM , während in asynchronen Kulturen ein IC_{50} von 20 μM bestimmt wurde (Abb. 3.19 A). Außerdem konnten in den Ausstrichen der synchronen und asynchronen Kulturen, die mit MGFN in einer Konzentration über dem IC_{50} behandelt wurden, ausschließlich späte Trophozoiten und Schizonten entdeckt werden (Abb. 3.19 B). Die verbliebenen Parasi-

ten in den behandelten Kulturen hatten oft eine vergrößerte Nahrungsvakuole und wiesen morphologische Marker auf, die typisch für sterbende Parasiten sind [37]. Im Gegensatz dazu befanden sich in den unbehandelten asynchronen Kontrollkulturen ungefähr 50 % der Parasiten im Ring- oder frühen Trophozoiten-Stadium (Abb. 3.19 B), wodurch die Theorie unterstützt wird, dass MGFN bevorzugt das Wachstum von Ringstadien hemmt.

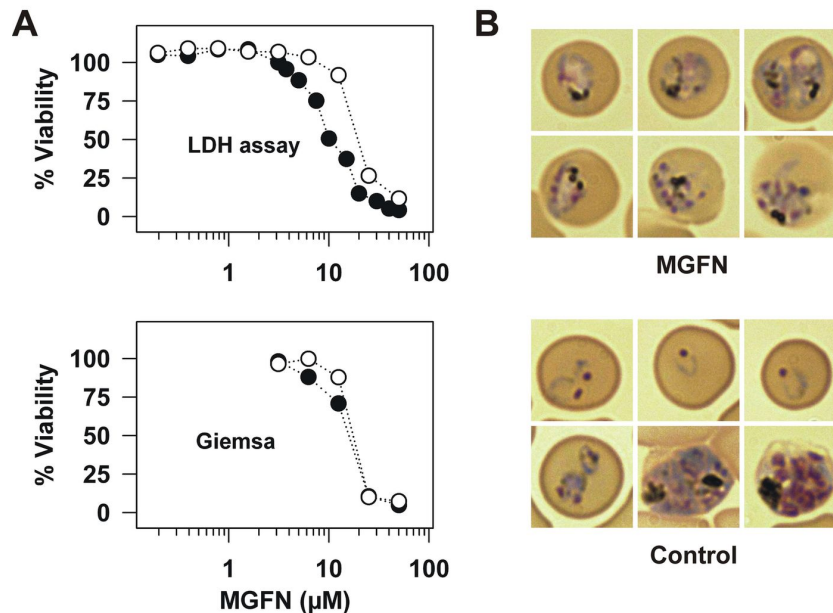


Abbildung 3.19: Inhibitionsstudien mit MGFN an *P. falciparum* in Zellkultur [V.2]. A) Bestimmung des IC_{50} durch Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Assay (oben) oder Giemsa-gefärbte Blutausstriche (unten). Offene Kreise: asynchrone Kultur, geschlossene Kreise: Sorbitol-synchronisierte Kultur. B) Beispiele für Blutausstriche einer asynchronen Kultur, die mit 25 µM MGFN behandelt wurden, sowie einer Kontrollkultur ohne Inhibitor.

3.4.5 Compound 5 und 26 hemmen das Wachstum von *P. falciparum* nur in hohen Konzentrationen

Nachdem sich die Glutathionderivate Compound 5 und 26 als äußerst effektive Inhibitoren von rekombinanter *PfGloI* erwiesen haben, wurden diese Substanzen auch in Zellkultur getestet. Auch hier wurden asynchrone sowie Sorbitol-synchronisierte Kulturen getestet. Jedoch konnte beim Auszählen der Blutausstriche festgestellt werden, dass Compound 5 und 26 die Vermehrung von *P. falciparum* nur in hohen Konzentrationen hemmten. Der IC_{50} lag für Compound 5 bei ca. 65 und 70 µM sowie für Compound 26 bei 90 und 70 µM für asynchrone bzw. synchrone Kulturen (Abb. 3.20). Diese Substanzen wurden vermutlich, wie für andere Glutathionderivate postuliert [6,65,97], nicht effizient aufgenommen.

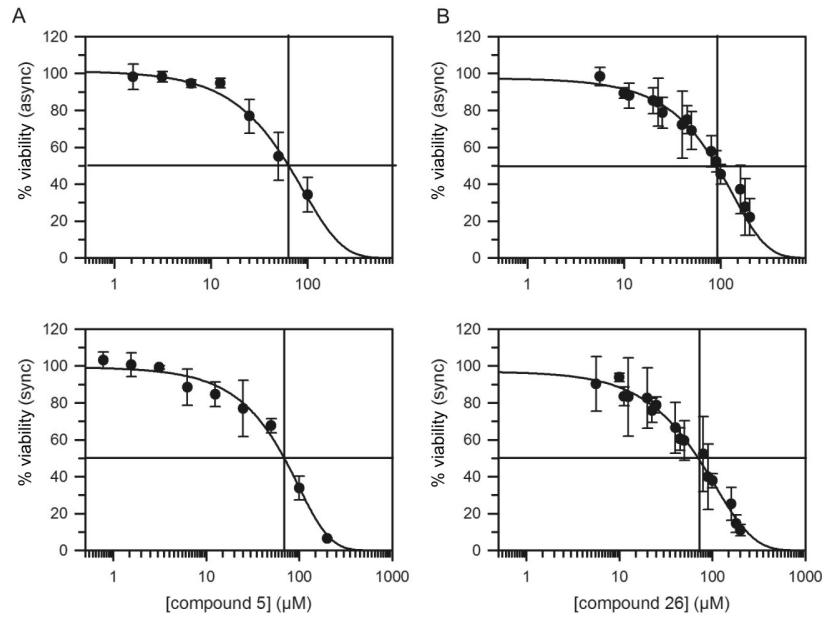


Abbildung 3.20: Bestimmung des IC_{50} mittels Giemsa-gefärbter Blutausstriche von asynchronen (async, oben) und Sorbitol-synchronisierten (sync, unten) Kulturen. A) Wirkung von Compound 5. B) Wirkung von Compound 26.

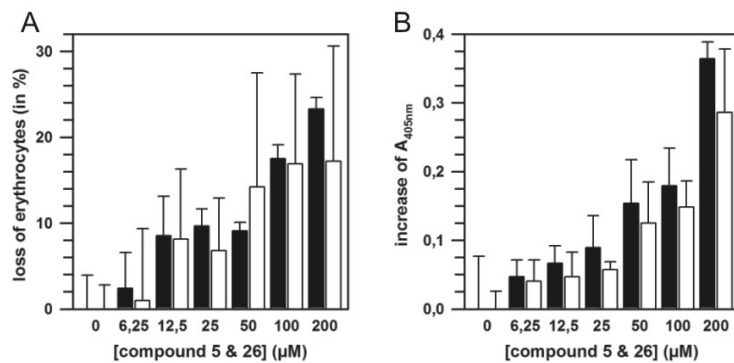


Abbildung 3.21: Wirkung von Compound 5 (schwarze Balken) und Compound 26 (weiße Balken) auf Erythrozyten. A) Verlust an Erythrozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. B) Messung der Freisetzung von Hämoglobin bei 405 nm.

Bei Inhibitorkonzentrationen über $100 \mu\text{M}$ konnte zusätzlich eine grün-bräunliche Verfärbung der Erythrozytenkultur festgestellt werden. Deswegen wurde als Kontrolle die Wirkung von Compound 5 und 26 auf unparasitierte Erythrozyten getestet. Dazu wurden nach einer Inkubationszeit von 48 h die Erythrozyten in einer Neubauer-Kammer ausgezählt (Abb. 3.21 A) sowie das Kulturmedium auf freigesetztes Hämoglobin untersucht (Abb. 3.21 B). Beide Substanzen waren im hohen mikromolaren Bereich zytotoxisch und sorgten für das Absterben der Wirtszelle (erkennbar an der erhöhten Freisetzung von Hämoglobin sowie der

verringerten Anzahl an Erythrozyten). Diese Inhibitoren lösten offenbar oxidativen Stress in der Wirtszelle aus, erkennbar an der Bildung von Methämoglobin (bräunliche Farbe), und beeinflussten somit vermutlich die vorherige Bestimmung der IC_{50} -Werte.

3.4.6 Veresterung von Compound 5 und 26 verbessert die Wirkung auf *Plasmodium falciparum*

Viele Glutathionderivate, die als Inhibitoren getestet wurden, gelangten aufgrund ihrer Polarität nicht durch die Zellmembran. Abhilfe für dieses Problem schaffte die Veresterung der Inhibitoren [6,59,65]. Da Compound 5 und 26 ebenfalls nur schlecht in die Zellen zu gelangen scheinen, wurden von Prof. Vince Di-tert-butylester der beiden Substanzen zur Verfügung gestellt. Erste Bestimmungen des IC_{50} mit den neuen Substanzen führten zu einer Verbesserung des IC_{50} . Für Compound 5 wurde eine zweifache Absenkung des IC_{50} auf ca. 35 μ M ermittelt und für Compound 26 eine dreifache Absenkung auf ca. 25 μ M.

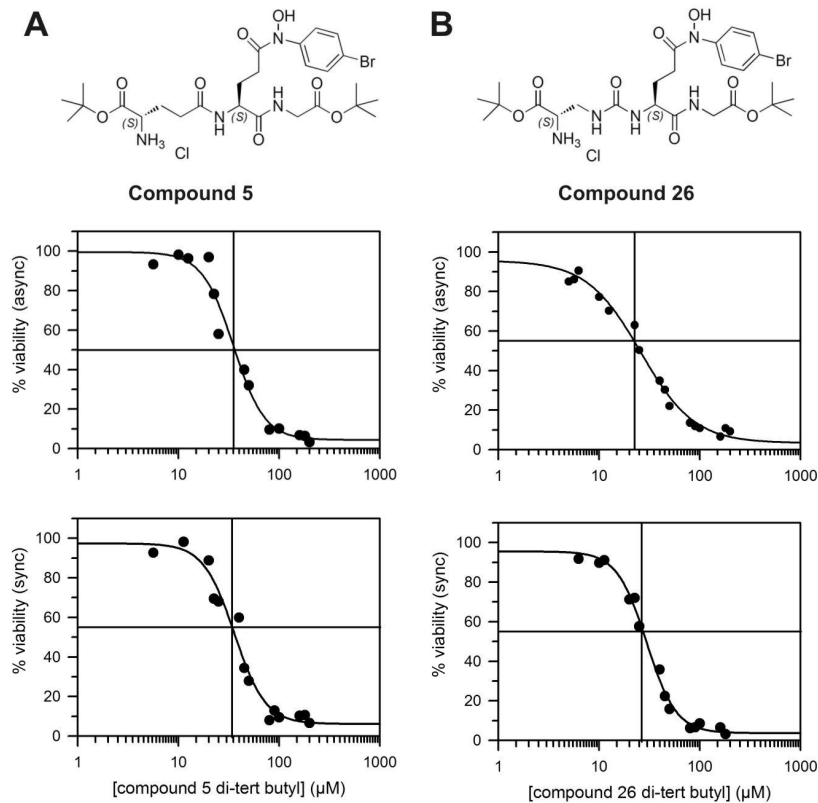


Abbildung 3.22: Di-tert-butylester von Compound 5 und 26 und Einfachbestimmung des IC_{50} mittels Giemsa-gefärbten Blutausstrichen von asynchronen (async, oben) und Sorbitol-synchronisierten (sync, unten) Kulturen. A) Wirkung von Compound 5. B) Wirkung von Compound 26.

4 Diskussion

4.1 Lokalisation des Glyoxalasesystems in *Plasmodium falciparum*

Die Existenz eines Glyoxalasesystems in *Plasmodium falciparum* ist aufgrund von enzymatischen Messungen mit Parasitenzellextrakt [103] und *in silico* Analysen [1,56] seit längerem bekannt, die genaue Lokalisation der identifizierten Enzyme (GloI, GILP, cGloII und tGloII) blieb jedoch ungeklärt. Mittels GFP-Fusionsproteinen wurden GloI und cGloII im Zytosol von *P. falciparum* nachgewiesen, während sich tGloII im Apikoplasten befindet [V.2] (Abb. 4.1). Das zytosolische Enzympaar ist vermutlich für den Abbau von toxischem Methyl-

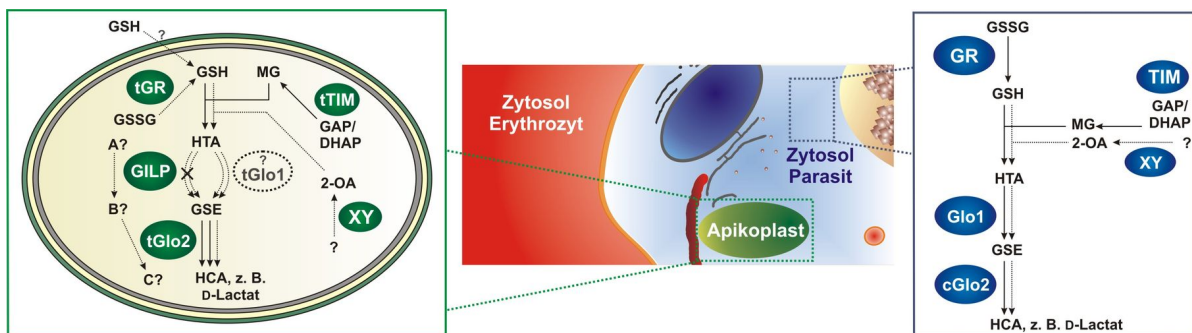


Abbildung 4.1: Das Glyoxalasesystem aus *P. falciparum* (modifiziert aus [V.3]). GR: Glutathionreduktase, TIM: Triosephosphatisomerase, GSE: Glutathionthioester, HCA: 2-Hydroxycarbonsäure, HTA: Hemithioacetal, 2-OA: 2-Oxoaldehyde.

glyoxal zuständig, das als Nebenprodukt während der Triosephosphatisomerasereaktion bei der Glykolyse gebildet wird, sowie für weitere 2-Oxoaldehyde, die während der Lipidperoxidation, dem Abbau von Threonin oder dem Ketonkörpermetabolismus entstehen. Letztere Reaktionen bleiben in *P. falciparum* jedoch noch zu untersuchen. Die Identifizierung einer Glyoxalase II im Apikoplasten hingegen wirft einige Fragen auf: Die Bildung von Methylglyoxal im Apikoplasten ist durchaus möglich, da einige glykolytische Enzyme [44], darunter die Triosephosphatisomerase, in diesem Organell nachgewiesen wurden (Abb. 4.1).

Jedoch fehlt bisher eine funktionelle Glyoxalase I, die das gebildete Methylglyoxal in das Substrat für tGloII umwandelt. Der einzige bekannte Kandidat ist das ebenfalls im Apikoplasten lokalisierte Enzym GILP (GloI-like protein) [61], das allerdings *in vitro* keine Aktivität zeigte [1]. Zudem ist die Quelle für Glutathion, auch für andere glutathionabhängige Enzyme wie Glutathionreduktase [61], im Apikoplasten immer noch unbekannt (Abb. 4.1). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass tGloII für die Umwandlung anderer Substrate im Apikoplasten zuständig ist, da Glyoxalase II bekannterweise ein breites Spektrum an Thioestern hydrolysieren können [102].

Insgesamt scheint das Glyoxalasesystem in *P. falciparum* äußerst wichtig für die Entgiftung von Methylglyoxal und anderen elektrophilen 2-Oxoaldehyden zu sein, da keine alternativen Abbauege im Parasiten bekannt sind. In anderen Organismen wurden weitere Enzyme entdeckt, die sich (in geringerem Maße als das Glyoxalasesystem) am Katabolismus von Methylglyoxal beteiligen können. Dazu gehören unter anderem Aldosereduktase und Methylglyoxalreduktase [93]. In Parasitenextrakt wurde lediglich eine Methylglyoxalreduktase-Aktivität nachgewiesen, die jedoch weit unter 1 % der entsprechenden Glyoxalase I Aktivität liegt [103] und somit vernachlässigbar ist. Nachdem im Genom von *P. falciparum* bislang keine Methylglyoxalreduktase identifiziert wurde, könnte die gemessene Aktivität auch auf eine andere Oxidoreduktase zurückzuführen sein.

4.2 Dimerisierung von *PfcGloII* in Lösung

Die Bildung von labilen Dimeren in Lösung [V.2] ist eine interessante Eigenschaft von *PfcGloII*. Bereits bei der Analyse aus roten Blutkörperchen aufgereinigter hGloII wurden unter denaturierenden oder nicht-denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel eine bzw. zwei Banden identifiziert [4]. Zudem wurde in den Kristallstrukturen von humaner GloII [24] und mitochondrialer Glx2-5 aus *A. thaliana* [68] eine Interaktion zwischen den Untereinheiten beobachtet. Da Glyoxalase II generell als monomeres Enzym angesehen wurde [25,57,68], gingen Marasinghe *et al.* [68] davon aus, dass diese Interaktion durch die Kristallisationsbedingungen verursacht wurde. Ein rasches Monomer-Dimer-Gleichgewicht bietet eine gute Erklärung für diese an sich gegensätzlichen Ergebnisse. Es bleibt lediglich die Frage, ob durch die Dimerisierung das aktive Zentrum der GloII blockiert wird oder weiterhin frei zugänglich bleibt (Abb. 4.2). Die beiden Untereinheiten in der Kristallstruktur von hGloII (PDB-Eintrag 1QH5) interagieren ausschließlich entlang der Helices $\alpha 8$ und $\alpha 8'$ (inklusive der Aminosäuren Glu238, Arg250, Gln254 und Lys256) und ermöglichen einen freien Zugang zum aktiven Zentrum (Abb. 4.2 links). Im Gegensatz dazu befanden sich in der Kristall-



Abbildung 4.2: Dimerbildung von *PfcGloII* und dessen möglichen Auswirkungen [V.3].

struktur von Glx2-5 (PDB-Eintrag 1XM8) beide Substratbindungsstellen genau im Interaktionsbereich. Dementsprechend sind hier beide aktive Zentren blockiert (Abb. 4.2 rechts). Außerdem sind bei Glx2-5 einige der Aminosäuren, die an der Interaktion beteiligt sind, ebenfalls in *P. falciparum* konserviert und könnten somit die Beobachtung erklären, dass die Mutationen von Arg154, Arg257 und Lys260 in *PfcGloII* zu einem veränderten Monomer-Dimer-Gleichgewicht führten [V.2]. Über die Funktion des Monomer-Dimer-Gleichgewichts *in vivo* lassen sich bis jetzt nur Mutmaßungen anstellen: Bei der Bestimmung der enzymkinetischen Parameter von *PfcGloII* WT und Mutanten wurden keine Abweichungen von der typischen Michaelis-Menten Kinetik festgestellt [V.1]. Somit scheint ein kooperatives Verhalten beider Untereinheiten eines Dimer unwahrscheinlich zu sein. Wenn die Möglichkeit in Betracht gezogen wird, dass die Dimerisierung wie bei Glx2-5 zu einer Blockade der aktiven Zentren führt, ist eine regulatorische Funktion in Form eines Ein-/Aus-Schalters denkbar. Andererseits könnte die Dimerbildung auch eine Signalfunktion ausüben, die aufgrund einer Interaktion mit anderen Proteinen oder einer Veränderung der Substrat- bzw. Produktkonzentration ausgelöst wird (Abb. 4.2).

Für beide Möglichkeiten sollte eine Dimerisierung *in vivo* stattfinden können. Die zelluläre Konzentration der GloII ist jedoch in den meisten Organismen noch unbekannt. In haploiden Hefezellen wurden ca. 13700 Moleküle zytosolischer GloII gemessen [47] (<http://www.yeastgenome.org>). Bezogen auf das Volumen der Zelle (ca. 30 - 80 fl) und unter Einberechnung der Avogadro-Konstante ($6 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) kann grob die Konzentration von GloII in Hefe abgeschätzt werden (0.3 - 0.8 μM). Selbst wenn die Konzentration von *PfcGloII* niedriger liegt, könnte der K_d^{app} von 5 μM (Abb. 3.7) ausreichen, um eine geringe Dimerisierung zu bewirken. So könnte eine Proteinkonzentration von 0.1 μM bei einem K_d^{app} von 5 μM zur Dimerisierung von ca. 4 % *PfcGloII* führen. Eine solche Proteinkonzentration entspricht lediglich ca. 1500 Molekülen an *PfcGloII* (bezogen auf das Volumen eines *P. falciparum* Schizonten von ca. 30 fl ungefähr 35 h nach Invasion [85]). Detaillierte Aussagen über die Dimerisierung sind somit erst möglich, nachdem die zelluläre Konzentration von *PfcGloII* bestimmt wurde z.B. durch die Messung der Proteinkonzentration mittels quantitativen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) unter Verwendung eines spezifischen (noch herzustellenden) Antikörpers gegen *PfcGloII*.

4.3 Katalysemechanismus von *PfcGloII*

4.3.1 *PfcGloII* ist eines von wenigen Enzymen, das nach einem Theorell-Chance-Mechanismus arbeitet

Die Inhibitionsmuster der Produktinhibitionsstudien mit reduziertem Glutathion und D-Lactat für *PfcGloII* [V.1] ähneln den Studien für *A. thaliana* [115], mit der Ausnahme, dass die K_i -Werte für GSH und Lactat ca. 10-fach erhöht bzw. erniedrigt sind (Abb. 3.10). So ist der K_i -Wert für GSH mit ca. 3.5 mM auch wesentlich höher als der K_m -Wert für das Substrat mit ca. 0.1 mM. Dieser Unterschied ergibt Sinn, da in der Zelle millimolare Konzentrationen an GSH vorherrschen (ca. 2 mM [13,14]) und das Enzym dennoch ordnungsgemäß funktionieren soll. Eine Lösung dieses Problems für *A. thaliana* (K_i für GSH ca. 0.4 mM [115]) ist unklar. Zang et al. [115] schlugen basierend auf den Inhibitionsmustern für Uni Bi Reaktionen (Seiten 544-555 in [87]) vor, dass D-Lactat als erstes Produkt das aktive Zentrum verlässt, gefolgt von GSH. Für eine solche Uni Bi Reaktion sollte sich jedoch ein nicht-kompetitives Verhalten für D-Lactat sowie ein kompetitives Verhalten für GSH bei den Inhibitionsmustern zeigen und nicht umgekehrt (Supplemental Figures 2 und 3 in [115]). Somit sind entweder die Annahmen über den mechanistischen Ablauf verkehrt, oder GSH verlässt als erstes Produkt das aktive Zentrum. Letztere Möglichkeit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, bleibt aber recht unwahrscheinlich, da zum einen die K_i -Werte auf eine stärkere Bindung des GSH deuten (Abb. 3.10, [115]) und zum anderen bekannt ist, dass Glyoxalase II eine geringe Spezifität für den Carbonsäureanteil des Substrats besitzt [102].

Nachdem an der Katalyse vermutlich Hydroxidionen anstelle von Wasser beteiligt sind, könnte die Reaktion auch mit zwei Substraten, dem Hydroxidion und dem Thioester, nach einem Bi Bi Mechanismus ablaufen [V.1]. Durch die Analyse der Inhibitionsmuster nach den Angaben in Lehrbüchern zur Enzymkinetik (Segel, pp. 593–606 [87] oder nach Bisswanger, Tab. 2.3 [16]), können ein Ping-Pong-Mechanismus, ein geordneter und ein iso-geordneter Bi-Bi-Mechanismus ausgeschlossen werden. Stattdessen deuten die Inhibitionsmuster (Abb. 3.10) auf einen Theorell-Chance-Mechanismus hin. Dieser Mechanismus wurde bis

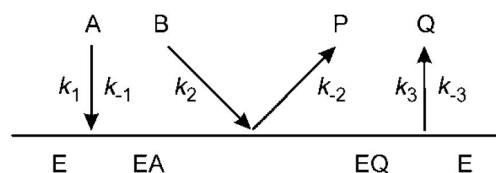


Abbildung 4.3: Theorell-Chance-Mechanismus.

jetzt nur für wenige Enzyme beschrieben, z. B. für die Aminoglykosidphosphotransferase Typ II [69]. Der Theorell-Chance-Mechanismus ist ein Spezialfall eines geordneten Bi Bi Mechanismus, bei dem die Konzentration des Enzym-Substrat (EAB) und des Enzym-Produkt (EPQ) Komplexes nahezu Null beträgt. In diesem Fall zerfällt der zentrale Komplex genauso schnell wie er gebildet wurde. Dabei wird das erste Produkt (P) sofort freigelassen, während das zweite Produkt (Q) wesentlich langsamer das aktive Zentrum verlässt. Bei *PfcGloII* tritt vermutlich der Fall ein, dass bei einem pH von 6.8 keine vollständige Sättigung mit Hydroxidionen (dem ersten Substrat) erreicht wird. Diese Theorie wird vom ermittelten K_m^{app} -Wert für OH^- sowie dem $\text{p}K_a^{\text{app}}$ -Wert von ca. 6 unterstützt. Bei der Variation der Konzentration des zweiten Substrats (hier: SDL) ergeben sich Inhibitionsmuster, bei denen das erste Produkt ein kompetitives Verhalten (hier: Lactat) und das zweite Produkt ein nicht-kompetitives Verhalten (hier: GSH) zeigt.

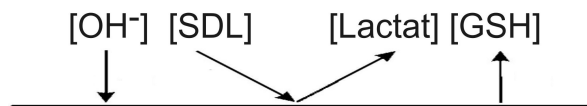


Abbildung 4.4: Reaktionsreihenfolge von *PfcGloII*.

4.3.2 Die Substratbindung/ Produktfreisetzung ist ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt

Die Substratbindung von *PfcGloII* wurde in dieser Arbeit detailliert analysiert, indem die konservierten Aminosäuren Arg154, Arg257 und Lys260 mutiert wurden [V.1]. Ähnliche Studien wurden bis jetzt nur in *A. thaliana* durchgeführt. Hier wurde bei Glx2-2 die Aminosäure Arg250[†] (Arg257 in *P. falciparum*) versehentlich gegen Tryptophan ausgetauscht [33]. Dies führte zu einem ca. 10-fachen Anstieg von K_m^{app} und einem ca. 12-fachen Abfall von $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$. Der Effekt könnte allerdings durch drastische strukturelle Änderungen verursacht worden sein, da Tryptophan eine sperrige Aminosäure mit anderen Konformationsparametern [26] ist. Deswegen wurden für die Mutation von Arg257 und Lys260 Aspartat und Glutamin ausgewählt, da diese Aminosäuren ähnliche Konformationsparameter [26] aufweisen, nicht so sperrig wie Tryptophan sind, Wasserstoffbrücken ausbilden können sowie unterschiedlich geladen sind. Diese neuen Mutationen von Arg257 führten zu ähnlichen Änderungen der K_m^{app} - und $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Werte und bestätigten den wichtigen Einfluss dieser

[†]Arg250 und Lys144 von Glx2-2 (GenBank accession number O24496) wurden ursprünglich in [33] und [115] als Arg248 und Lys142 bezeichnet.

Aminosäure. Die Mutationen von Lys260 zeigten deutlich, dass diese Aminosäure ebenfalls wesentlich zur Substratbindung beiträgt. Die Erkenntnis, dass die Substratbindung durch ionische Wechselwirkungen erfolgt, wurde durch weitere Beobachtungen gesichert. Dazu gehört das komplexe pH-Profil unter alkalischen Bedingungen (Abb. 3.12), der Einfluss der Salzkonzentration auf sowohl K_m^{app} als auch $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (Abb. 3.9 E) und die Tatsache, dass der Ethylester von Glutathion, bei dem die Carboxylgruppe des Glycins ungeladen ist, wesentlich schlechter an PfcGloII bindet (Abb. 3.10).

Die Mutation von Lys144[†] (Arg154 in *P. falciparum*) zu Alanin führte bei Glx2-2 aus *A. thaliana* zu einem ca. 2.5-fachen Anstieg von K_m^{app} und einem ca. 2-fachen Abfall von $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ [115]. Für die Mutation von Arg154 in PfcGloII wurde zum einen Lysin ausgewählt, da diese Aminosäure in vielen GloII aus anderen Organismen sowie in PftGloII an gleicher Position vorkommt. Zum anderen wurde Methionin gewählt, da die längere Seitenkette dieser Aminosäure eine Unterscheidung zwischen der strukturellen Klammerfunktion (siehe Abb. 3.8) und dem Einfluss der Ladung ermöglicht. Die Mutation zu Lysin zeigte keinerlei Unterschied in K_m^{app} und lediglich einen geringen Einfluss auf $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$. Der Austausch von Lys zu Arg in PfcGloII scheint dementsprechend nicht für die vier- bis sechsfach höhere katalytische Effizienz von PfcGloII im Vergleich zu PftGloII oder hGloII verantwortlich zu sein. Dahingegen führte der Austausch zu Methionin zu einem ähnlichen Ergebnis wie der Austausch zu Alanin in *A. thaliana*. Der etwas stärkere Einfluss der Mutation zu Alanin lässt darauf schließen, dass nicht nur die Ladung, sondern auch die längere Seitenkette für die richtige Orientierung des Substrates verantwortlich ist. Eine weitere Aminosäure, die an der Substratbindung von GloII beteiligt ist, ist Tyr185. Eine Mutation zu Phenylalanin führte bei PfcGloII zu einem 2.5-fachen Anstieg von K_m^{app} [1] und bei hGloII zu einem 8-fachen Anstieg [83].

Bei allen Mutationen von Arg154, Arg257 und Lys260 kam es nicht nur zu einem Anstieg der K_m^{app} -Werte, sondern auch zu einem Abfall der $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Werte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die Bindung von SDL und dessen Umsatz mit ungefähr der gleichen Geschwindigkeit abläuft und die Substratbindung somit zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Diese Theorie wird durch die Erkenntnis gestützt, dass der Reaktionsmechanismus von GloII nach Theorell-Chance abläuft. Demnach ist der zentrale Komplex aus cGloII, Hydroxidion und SDL äußerst instabil, während das Produkt GSH relativ fest gebunden bleibt. Dies liefert die entsprechende Voraussetzung für den Einfluss der Bindungsstelle auf $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutationen zu einer Umorientierung des Übergangszustands führten und aus diesem Grund die Hydrolyse und $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ beeinflussten. Diese Möglichkeit besteht bei der Aminosäure Tyr185, wohingegen

gen eine Veränderung des Übergangszustands nach Mutation der basischen Aminosäuren, die mit den Carboxylgruppen interagieren, ziemlich unwahrscheinlich erscheint: Selbst bei einer Rotation oder Neigung der Carboxylgruppen des Glutathions kann der Thioester immer noch die gleiche Position während der Hydrolyse einnehmen (siehe Abb. 3.8). Zudem zeigten Mutationen der Aminosäure Arg154, die wesentlich näher am aktiven Zentrum liegt, einen wesentlich geringeren Einfluss auf $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ als Mutationen der weiter entfernten Aminosäuren Arg257 und Lys260.

Die Annahme, dass die Substratbindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wird durch vorhergehende Studien unterstützt. Bei Glx2-2 aus *A. thaliana* sowie humaner GloII wurden nur geringe Isotopeneffekte beobachtet [115], die darauf schließen lassen, dass die Säure-Base-Katalyse (siehe 4.3.4) nicht der einzige geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Außerdem sank das Verhältnis von $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ der GloII aus Ratte merklich ab, wenn die Viskosität des Puffers bei Messungen mit SDL erhöht wurde. Im Gegensatz dazu blieb das Verhältnis von $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ gleich, wenn S-Acetylglutathion bei unterschiedlich viskosen Puffern getestet wurde. Dieses Substrat wird relativ langsam hydrolysiert, die Substratbindung scheint nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein und somit zeigte die erhöhte Viskosität keinen signifikanten Einfluss auf $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ [49].

4.3.3 Die Substratbindungsstelle beeinflusst die basischen $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Werte

Bereits für GloII aus Mensch und Ratte [4,10] wurde ein makroskopischer $\text{p}K_{\text{a}}$ -Wert von ungefähr 9 bestimmt und ein ähnlicher Wert von 8.5 wurde aus den $\text{pH}-k_{\text{cat}}$ und $\text{pH}-\log k_{\text{cat}}$ Diagrammen für *PfcGloII* ermittelt [V.1]. Ball und VanderJagt [10] schlugen vor, dass dieser basische $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Wert dem Protein zugeordnet werden kann und nicht dem Glutathion-Anteil des Substrats [10]. Dementsprechend kann man davon ausgehen, dass die konservierten Aminosäuren Arg257 und Lys260 diesen $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{app}}$ -Wert signifikant beeinflussen. Abgesehen vom molekularen Modell (Abb. 3.8) unterstützen weitere Beobachtungen diese Vermutung. Zum einen lässt die asymmetrische Verteilung der Datenpunkte in Abb. 3.12 C und D darauf schließen, dass mehr als ein basischer Ionisierungszustand auf das kinetische Verhalten von *PfcGloII* einwirkt. Zum anderen sorgt der Austausch von Lys260 zu Aspartat für einen verringerten Einfluss beider basischer Aminosäuren und dadurch zu einer vereinfachten, glockenförmigen pH -Aktivitätskurve. Die Mutation änderte auch die $\text{pH}-k_{\text{cat}}$ und $\text{pH}-k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Profile (auch wenn hier keine einfache glockenförmige Kurve oder sogar sigmoidale Kurve entstand). Zudem unterscheiden sich die aus diesen Profi-

len bestimmten basischen pK_a^{app} -Werte sowohl für *PfcGloII* WT als auch für *PfcGloII* K260D erheblich. Aus den $\text{pH-log}k_{\text{cat}}/K_m$ -Profilen wurde ein basischer pK_a^{app} von ca. 7.5 bestimmt, während der pK_a^{app} -Wert aus den $\text{pH-log}k_{\text{cat}}$ -Profilen auf ca. 8.5 anstieg. Nachdem die pK_a^{app} -Werte aus den $\text{pH-log}k_{\text{cat}}/K_m$ und den $\text{pH-log}k_{\text{cat}}$ -Diagrammen oft dem Enzym bzw. dem Enzym-Substrat-Komplex zugeordnet werden können [20], verändert die Substratbindung vermutlich die pK_a -Werte der Aminosäuren Arg154, Arg257 und Lys260. Zusätzlich könnten die pH -Profile und der basische pK_a von der Säure-Basen-Katalyse im katalytischen Zentrum beeinflusst werden.

4.3.4 Durch eine Mutation der Substratbindungsstelle wurde zum ersten Mal die Säure-Base-Katalyse enthüllt

Eine allgemeine Eigenschaft von binuklearen Metallohydrolasen wie Glyoxalase II besteht darin, dass die Metallionen für die Bindung, Aktivierung oder Generierung des Nucleophils zuständig sind [71,113]. Aus den $\text{pH-log}k_{\text{cat}}/K_m$ und $\text{pH-log}k_{\text{cat}}$ -Diagrammen wurde ein saurer pK_a^{app} -Wert von ca. 6 für das Enzym und den Enzym-Substrat-Komplex ermittelt [V.1]. Dieser Wert repräsentiert vermutlich die Bildung des Hydroxidions durch die Zinkionen im katalytischen Zentrum (Abb. 4.5 f). Ein saurer pK_a -Wert unter 7 ist nicht unüblich für Wasser als Ligand einer binuklearen Metallohydrolase und wurde z. B. bereits für das Enzym PAP (purple acid phosphatase) nachgewiesen [71]. Die Bildung eines Nucleophils erfordert gleichzeitig, dass eine in der Nähe liegende Aminosäure ein Proton aufnimmt. In einer früheren Studie führte die Zugabe von Diethylpyrocarbonat, das spezifisch mit Histidin reagiert, zu einer Inhibition von GloII, die aus Ratten-Erythrozyten [10] gereinigt wurde. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Protonenakzeptor um einen Histidin-Rest handeln könnte. Anschließend könnte Histidin als Säure-Base-Katalysator (B in Abb. 4.5) das Proton auf die Thiolgruppe des Substrats übertragen. Dieser Schritt könnte auch den basischen pK_a -Wert beeinflussen. Ein möglicher Kandidat bei *PfcGloII* ist His183, das zum einen an der Koordination des Zinkions beteiligt ist und sich zum anderen in der geeigneten räumlichen Position für den Protonentransfer befindet.

Erkennbar wurde die Säure-Basen-Katalyse und der Hydrolyseschritt bei der Analyse der pH -Aktivitätskurve von K260D, die eine vereinfachte Glockenform mit einem pH -Optimum von ca. 6.7 annahm. Bei einem pH unter dem sauren pK_a (von 6) nahm die lokale Konzentration der stark nucleophilen Hydroxidionen ab und senkte somit erheblich die Aktivität von *cGloII* WT und K260D. Bei einem pH über dem basischen pK_a^{app} von ca. 7.5 könnte der Protonentransfer zwischen B und dem Substrat beeinträchtigt sein. All diese Ergebnisse

deuten auf die Bildung des Nucleophils bei pH 6 hin und konnten eine Säure-Basen-Katalyse aufdecken, die sonst in GloII aufgrund der geschwindigkeitsbestimmenden Substratbindung verdeckt wurde.

4.3.5 Verfeinertes Katalysemodell von *PfGloII*

Basierend auf den bekannten Kristallstrukturen [24,25,68] und generellen Annahmen zum Mechanismus von binuklearen Metallohydrolasen [71] wurde ein verfeinertes Katalysemodell aufgestellt [V.1] (Abb. 4.5): Nachdem das Substrat das aktive Zentrum erreicht hat, wird die Carboxylgruppe des Glycinanteils im Glutathion durch die Aminosäuren Arg257 und Lys260 über ionische Wechselwirkungen fest an das Enzym gebunden (Abb. 4.5 Schritt I). Die Aminosäuren Arg154 und Tyr185 sind dabei für eine schwächere Bindung sowie die korrekte Orientierung des Substrats zuständig. Der erste Schritt dieser Reaktion ist gleichzeitig einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte bei der Hydrolyse durch GloII. Sobald das Sub-

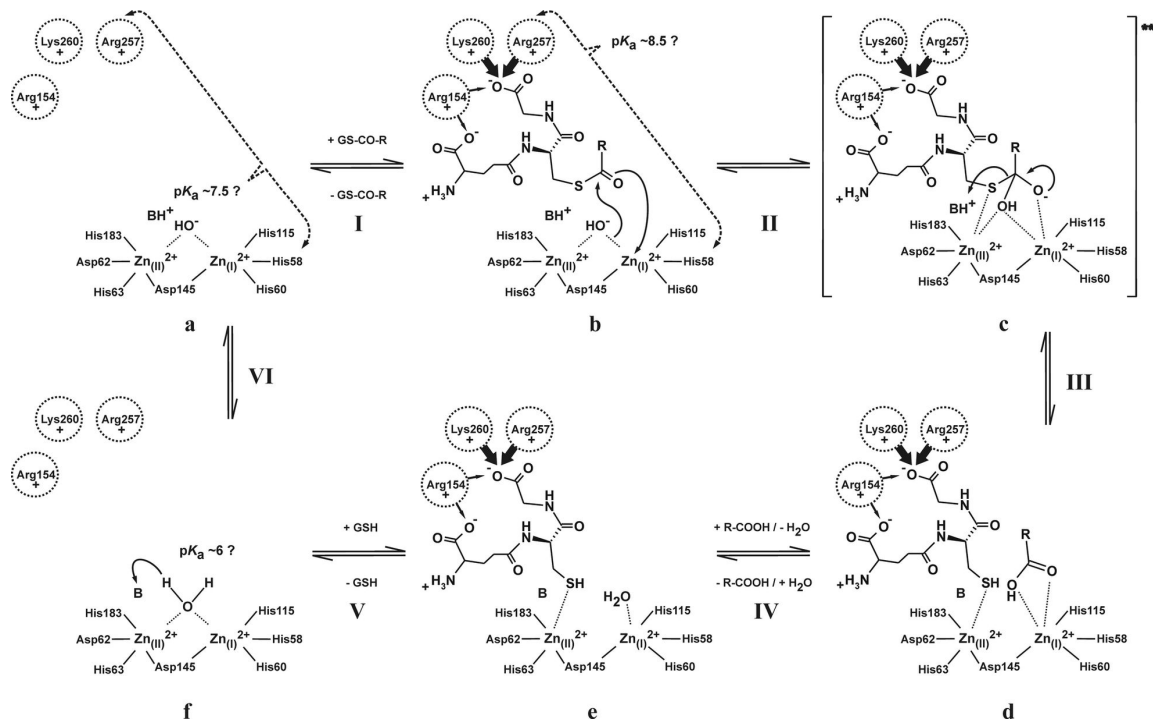


Abbildung 4.5: Verfeinertes Modell des Katalysemechanismus von *PfGloII* [V.1]. Schwache und starke Enzym-Substrat-Interaktionen sind mit einem dünnen bzw. dicken Pfeil angedeutet. Die möglichen Interaktionen zwischen dem Substrat und den Metallionen während der Katalyse sind durch gestrichelte Linien angegeben. Bei b und f bleibt der saure pK_a^{app} relativ gleich, während sich der basische pK_a^{app} ändert und somit den Einfluss der Aminosäurereste im katalytischen Zentrum und der Substratbindungsstelle widerspiegelt.

strat gebunden ist, kommt es zum sofortigen nukleophilen Angriff durch das zink-aktivierte Hydroxidion und führt zum tetrahedralen Übergangszustand. Dieser wird vermutlich thermodynamisch durch die Interaktion mit den Zinkionen begünstigt (Schritt II). Anschließend wird der Thioester gespalten, der Säure-Base-Katalysator B überträgt das Proton auf die Thiolatgruppe und die freigesetzte Carbonsäure sowie Glutathion werden kurzfristig durch die Interaktion mit den Metallionen stabilisiert (Schritt III). Aufgrund der freien Energie von b und d [32] liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Produkte. Nachdem GloII einem Theorell-Chance-Mechanismus folgt, verlässt die Carbonsäure als Erstes das aktive Zentrum (Schritt IV). Glutathion wird hingegen fester gebunden und wesentlich langsamer aus dem aktiven Zentrum entlassen (Schritt V). Ein neues Wassermolekül könnte das aktive Zentrum bereits nach der Freisetzung der Carbonsäure erreichen. Dort ändert die Interaktion mit den Zinkionen den pK_a soweit, dass selbst bei einem physiologischen pH ein neues Hydroxidion gebildet wird (Schritt VI).

Abgesehen davon, dass Arg154 in einigen GloII-Enzymen (darunter hGloII oder *PftGloII*) durch Lysin ersetzt ist, sind die restlichen Aminosäuren zur Bindung des Glutathions (Abb. 4.6) und zur Metallkoordination hoch konserviert. Dies ist auch der Fall für *PftGloII*, das eine Insertion zwischen Helix $\alpha 7$ und $\alpha 8$ besitzt und in einer früheren Studie [1] falsch eingeordnet wurde. Dementsprechend sind die Erkenntnisse aus dieser Arbeit vermutlich

<i>P. falciparum_cytosolic</i>	233	PFVRT--HCYVKNFNMND-----EIKILDKLRQLKNNF----	263
<i>P. falciparum_targeted</i>	278	PFLRCDQNDVRKSIDLYAKKKNIKIQQESDYIVILRLMKDNFKAS--	322
<i>H. sapiens</i>	223	PFMRVREKTVQQHAGETD-----PVTMRAVRREKDKQFKMPRD	260
<i>M. fascicularis</i>	223	PFMRVREKTVQQHARETD-----PVTMRAVRREKDEKFKMPRD	260
<i>M. musculus</i>	223	PFMRVREKTVQQHAGETD-----PVTMRAVRREKDKQFKVPRD	260
<i>G. gallus</i>	273	PFMRVREKTVQEHAGETD-----PIRTMGALRKEKDNFRVPKD	310
<i>D. rerio</i>	223	PFMRVREKSVLEHAGTSD-----PIEAMRSIRREKDKGFRVPKN	260
<i>S. mansoni</i>	208	PLMRVSEPDVLAHAKTDT-----PIKAMKTIREKDKRF----	240
<i>S. cerevisiae_cytoplasmic</i>	238	PFMRLEDPKVQKAAGDTNN----SWDRAQIMDKLRAMKNRM----	274
<i>S. cerevisiae_mitochondrial</i>	249	PFMRLLDDRAVRLAVGDTAG----TYPRSVVMQELRKLKNAM----	285
<i>A. thaliana_cytoplasmic</i>	224	PFMRVDKPEIQEKLGCKS-----PIDTMREVRNKKDQWRG---	258
<i>E. coli</i>	215	VFLRTEDIDLINVINEETL----LKQPEERFAWLRSKKDRF----	251
<i>V. cholerae</i>	216	PFLRTQEPSVIRSVASQVS----TLDPLTIPTALREWKNEF----	252
		::* : * *:	

Abbildung 4.6: Alignment des C-Terminus von GloII aus verschiedenen Organismen. Dieses neue Alignment zeigt im Gegensatz zu einer früheren Studie [1], dass *PftGloII* eine Insertion zwischen Helix $\alpha 7$ und $\alpha 8$ besitzt und die Aminosäuren Arginin und Lysin (grau unterlegt) in der Substratbindungsstelle hoch konserviert sind. *P. falciparum_cytosolic*, *Plasmodium falciparum*, gi|45685161 (Zytosol); *Pfalciparum_targeted*, *Plasmodium falciparum*, gi|33320676 (Signalsequenz für den Apikoplast); *H. sapiens*, *Homo sapiens*, gi|14336766; *M. fascicularis*, *Macaca fascicularis*, gi|75076324; *M. musculus*, *Mus musculus*, gi|21729786; *G. gallus*, *Gallus gallus*, gi|61098280; *D. rerio*, *Danio rerio*, gi|38511595; *S. mansoni*, *Shistosoma mansoni*, gi|2494850 (probable); *S. cerevisiae_cytoplasmic*, *Saccharomyces cerevisiae*, gi|2494851 (Zytoplasma); *S. cerevisiae_mitochondrial*, *Saccharomyces cerevisiae*, gi|2494852 (mitochondriale Vorstufe); *A. thaliana_cytoplasmic*, *Arabidopsis thaliana*, gi|15228389 (Zytoplasma); *E. coli*, *Escherichia coli*, gi|122424930; *V. cholerae*, *Vibrio cholerae*, gi|81544528.

auf GloII-Enzyme aus anderen Organismen übertragbar, mit Ausnahme der trypanothion-abhängigen GloII-Enzymen aus Kinetoplastiden [57,89]. Wie weit die Ergebnisse übertragen werden können, bleibt noch zu klären. Insbesondere bei *PftGloII* stellt sich die Frage, welche Funktion die Insertion zwischen Helix $\alpha 7$ und $\alpha 8$ ausübt.

4.4 Inhibition des Glyoxalase Systems

Das Glyoxalasesystem wird schon seit längerem als interessantes Ziel zur Entwicklung neuer Antitumor- [59,86,94,95,106] und Antimalaria-Wirkstoffe [1,12,38,56,97,103] angesehen. Ob sich das Glyoxalasesystem für die Entwicklung neuer Wirkstoffe eignet, hängt wahrscheinlich vom jeweiligen Organismus oder Zelltyp ab. So ergaben z. B. Computersimulationen, dass sich die Glyoxalasen verschiedener Organismen schlecht dafür eignen könnten [90]. Studien an trypanothionabhängiger GloII aus *Trypanosoma brucei* ergaben schließlich, dass keine erheblichen Wachstumsdefekte bei einem Knock-Out in prozyklischen Insektenstadien zu erkennen waren. Auch Knock-Down-Experimente an Blutstadien von *Trypanosoma brucei* waren entmutigend [111]. Im Gegensatz dazu wurde für hGloI gezeigt, dass dieses Enzym bei der Inhibition der Osteoklastogenese durch Methylgerfelin das Hauptziel des Wirkstoffes ist [60]. Weitere Studien deckten inzwischen auf, dass der Glutathionmetabolismus für Parasiten überlebenswichtig ist (obwohl weder die parasitäre γ -Glutamylcysteinsynthase noch die Glutathionreduktase essentiell sind, da wahrscheinlich Glutathion von der Wirtszelle aufgenommen wird und ersatzweise vom Thioredoxinsystem reduziert werden kann) [21,77]. Die Inhibition des Glyoxalasesystems von *P. falciparum* scheint auch deswegen ein attraktives Ziel zu sein, da hierbei ein Entgiftungssystem angegriffen wird. Einer der wenigen bewährten Wirkstoffe zur Behandlung der Malaria ist Chloroquin, das ebenfalls ein Entgiftungssystem des Parasiten stört. Die Behandlung mit Chloroquin hemmt die Hämpolymerisation und führt zu einer Akkumulation von toxischem Häm in der Nahrungsvakuole [45,58]. Der definitive Nachweis der Eignung des Glyoxalasesystems zur Wirkstoffentwicklung z. B. mittels Knock-Out-Studien an *PfGloI*, *PfcGloII* und *PftGloII* steht noch aus. Die Konstrukte für Knock-Out-Experimente wurden in dieser Arbeit fertiggestellt. Sollte der Knock-out von *PfGloI*, *PfcGloII* oder *PftGloII* nicht lethal für *P. falciparum* sein, bliebe die Frage zu klären, ob der Knock-out stattdessen zu einer Wachstumsdefizienz führen kann. Hierbei würden die Wachstumsraten im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden, wie z. B. das Wachstum bei verschiedenen Konzentrationen an extrazellulär zugegebenem Methylglyoxal.

4.4.1 Die neuen Erkenntnisse zur Substratbindung von *PfcGloII* ermöglichen eine verbesserte Inhibitorentwicklung

Die neu gewonnenen Erkenntnisse zur Substratbindung von *PfcGloII* [V.1] ermöglichen verbesserte Überlegungen zur Entwicklung effizienter Inhibitoren. Nachdem die Aminosäuren Arg257 und Lys260 von *PfcGloII* äußerst wichtig für die Substratbindung und die darauffolgende Hydrolyse sind, bietet die Blockade dieser Aminosäuren ein hervorragendes Ziel. Je nach Größe des Inhibitors könnte dies auch für die Blockade von Arg154 von *PfcGloII* zutreffen. Ein Vorteil letzterer Vorgehensweise läge darin, dass in diesem Fall zum einen der Inhibitor nicht mit einem äußerst fest gebundenen Anteil des Substrats konkurrieren muss und zum anderen eine höhere Spezifität für *PfcGloII* als für hGloII erreicht wird, da in hGloII diese Aminosäure durch Lysin ersetzt ist.

4.4.2 Inhibition der *PfGloI* *in vitro*

Die Inhibition von *PfGloI* durch die Übergangszustandsanaloge Curcumin und Methylgerfelin [V.2] sowie durch die Glutathionderivate Compound 5 und 26 führte zu komplexen Inhibitionsmustern aufgrund der besonderen Eigenschaften des monomeren Enzyms. *PfGloI* besitzt zwei unterschiedliche aktive Zentren und ist allosterisch gekoppelt [38]. Dementsprechend ist es sehr wahrscheinlich, dass die getesteten Inhibitoren mit unterschiedlichen Affinitäten an die beiden aktiven Zentren binden und die Bindung an ein Reaktionszentrum zusätzlich die Konformation und Aktivität des anderen Zentrums beeinflusst. Diese speziellen Eigenschaften der monomeren GloI wurden bei früheren Studien übersehen und demzufolge sollten die dabei ermittelten K_i^{app} -Werte für *PfGloI* [1] oder vermutlich auch für die kommerziell erhältliche GloI aus Hefe (z. B. [50]) mit Vorsicht behandelt werden: diese Werte stellen einen Durchschnitt beider aktiver Zentren bzw. beider Konformationen dar. Die tatsächlichen K_i -Werte für das jeweilige aktive Zentrum könnten viel höher oder niedriger als der K_i^{app} -Wert sein, abhängig vom untersuchten Inhibitor, dem getesteten Bereich an Substrat- und Inhibitorkonzentration sowie den Unterschieden in den aktiven Zentren [V.2].

Die hier untersuchten Inhibitoren können anhand ihrer Wirkung in zwei „Klassen“ eingeteilt werden (Abb. 4.7). Bei der Inhibition mit Curcumin wurde auch bei hohen Konzentrationen die Aktivität nicht unter 50 % gesenkt und die Auswertung der Sekundärdiagramme ergab zwei apparente K_i -Werte, die ca. um den Faktor 10 voneinander getrennt waren (25 und 200 μM). Diese und weitere Untersuchungen von *PfGloI* WT, E272Q sowie E345Q deuten darauf hin, dass Curcumin bevorzugt an das hochaffine Zentrum A bindet (Abb. 4.7 A).

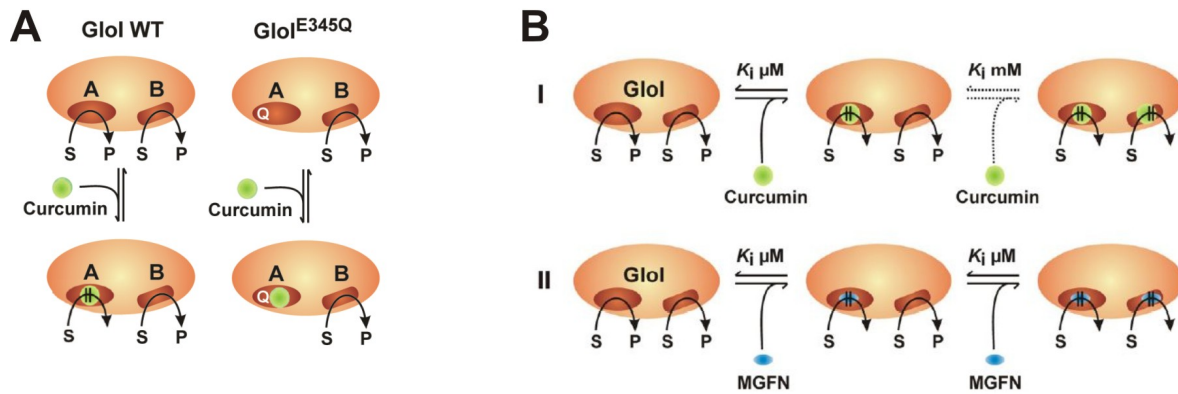


Abbildung 4.7: Inhibition von *PfGloI*. A) Messungen der Inhibition durch Curcumin zeigten, dass dieser Wirkstoff bevorzugt an ein aktives Zentrum (das hochaffine Zentrum A) bindet [V.2]. B) Einteilung der Inhibitoren von *PfGloI* in zwei „Klassen“. Curcumin sowie Compound 26 scheinen bevorzugt an ein aktives Zentrum zu binden, während Methylgerfelin und Compound 5 beide aktive Zentren inhibieren können. Im Gegensatz zu Curcumin und Methylgerfelin wiesen Compound 5 und 26 K_i^{app} -Werte im nanomolaren Konzentrationsbereich auf.

Auch bei Compound 26 wurden zwei apparente K_i -Werte, die ca. um den Faktor 10 voneinander getrennt waren, ermittelt (50 und 450 nM). Diese erste Klasse an Inhibitoren scheint bevorzugt ein aktives Zentrum zu hemmen (Abb. 4.7 B) und entfaltet seine volle Wirkung auf beide aktive Zentren erst bei einer weit erhöhten Inhibitorkonzentration. Im Gegensatz dazu wurden für Methylgerfelin und Compound 5 aus den Sekundärdiagrammen zwei recht ähnliche apparente K_i -Werte bestimmt. Somit scheint diese zweite Klasse an Inhibitoren von vornherein beide aktive Zentren der *PfGloI* zu hemmen (Abb. 4.7 B). Bei der Neu- oder Weiterentwicklung von Inhibitoren der monomeren *GloI* sollte somit darauf geachtet werden, dass diese Substanzen beide aktive Zentren hemmen können, um eine unerwünschte Restaktivität zu vermeiden.

Bei Compound 5 und Compound 26 handelt es sich vermutlich um fest und/oder langsam bindende Inhibitoren. Für eine Unterscheidung sowie eine genauere Charakterisierung sind weitere Messungen erforderlich, bei denen unter anderem die Enzymkonzentration variiert wird oder der Einfluss der Vorinkubationszeit von Enzym mit Inhibitor untersucht wird [27,53]. Vorläufige Auswertungen der vorhandenen Daten z. B. nach Dixon [39] bestätigen für Compound 5 einen apparenten K_i von ca. 7 nM. Jedoch werden für eine exakte Bestimmung Restaktivitäten von weit unter 50 % benötigt und erfordern weitere Messungen mit höheren Inhibitorkonzentrationen, insbesondere bei Compound 26.

4.4.3 Wirkung der GloI-Inhibitoren auf *P. falciparum*

Curcumin zeigte bereits in zwei unabhängigen Studien seine Wirkung auf *P. falciparum* in Zellkultur [34,81]. In der Studie von Cui *et al.* [34] wurde zudem ein erhöhter Spiegel an ROS (reaktiven Sauerstoffspezies) gemessen und eine Schädigung der DNA nachgewiesen. Diese Effekte wurden jedoch nicht einer Inhibition des Glyoxalasesystems zugeschrieben, die zu einer erhöhten Konzentration an Methylglyoxal, gesteigerten oxidativen Stress sowie zu Schäden an DNA und Proteinen führen würde. Stattdessen wurde *in vitro* eine Hemmung der Histonacetyltransferase des Parasiten beobachtet [34]. Der ermittelte IC₅₀ lag dabei je nach Studie bei 5 µM [81] oder 25 µM [34]. Der erste, niedrigere K_i^{app} von ca. 25 µM von Curcumin auf rekombinante *PfGloI* liegt in diesem Bereich [V.2]. Jedoch wird dieser K_i nur bei niedrigen Substratkonzentrationen erreicht, eine höhere Substratkonzentration führte zu einer kompetitiven Verdrängung des Inhibitors. Die Inhibition von *PfGloI* durch Curcumin *in vivo* hängt demzufolge von der (unbekannten) zellulären Konzentration des physiologischen Substrats von Reaktionszentrum A ab. Zudem darf nicht vernachlässigt werden, welche der beiden aktiven Zentren für den Umsatz dieses Substrats zuständig ist. Nachdem Curcumin viele Nebenwirkungen im mikromolaren Bereich hat (siehe z. B. [34]), ist es unwahrscheinlich, dass der IC₅₀ in Zellkultur ausschließlich auf die Inhibition von *PfGloI* zurückzuführen ist. So wird z. B. die humane GloI mit einem K_i^{app} von ca. 5 µM gehemmt. Der ausgelöste oxidative Stress in der Wirtszelle könnte einen zusätzlichen schädlichen Einfluss auf den Parasiten haben [V.2].

Methylgerfelin inhibierte das Wachstum von *P. falciparum* in Zellkultur mit einem ähnlichen IC₅₀ von ca. 10 - 20 µM. Insgesamt könnte sich dieser Inhibitor besser als Curcumin eignen, da Methylgerfelin zum einen beide aktiven Zentren hemmen kann und zum anderen einen ca. zehnfach besseren K_i^{app} -Wert *in vitro* aufweist. Beide Inhibitoren bieten einen guten Ausgangspunkt für die Entwicklung von GloI-Inhibitoren, die nicht auf der Struktur von Glutathion basieren. Diese Substanzen ahmen nicht nur den Übergangszustand nach, sondern sind zudem resistent gegenüber der Spaltung durch γ -Glutamyltranspeptidase. Die Hydrolyse der Methoxygruppen von Curcumin und eine verkleinerte Struktur könnten zu einem effektiveren Inhibitor führen, der beide aktive Zentren von *PfGloI* hemmen kann. Bei Methylgerfelin ist diese Grundvoraussetzung bereits gegeben [V.2].

Compound 5 und 26 waren zwar *in vitro* die wesentlich besseren Inhibitoren mit einem K_i^{app} im niedrigen nanomolaren Bereich (5 bzw. 50 nM), jedoch scheinen diese Substanzen aufgrund ihrer polaren Carboxygruppen im Glutathionanteil nicht an ihren Zielort zu gelangen. Außerdem wurde bei Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereich (> 100 µM) eine Beeinträchtigung der Erythrozyten beobachtet. Für andere Glutathionderivate wurde

gezeigt, dass eine Veresterung die Membrangängigkeit erhöht [59,65]. Auch für Compound 5 und 26 deuten vorläufige Ergebnisse darauf hin, dass die Veresterung mit einem Di-tert-butylester zu einer ca. zwei- bzw. dreifachen Senkung des IC_{50} führt (Abb. 3.22). Obwohl Compound 5 *in vitro* der stärkere Inhibitor ist, wurde mit dem Di-tert-butylester von Compound 26 *in vivo* eine leicht stärkere Inhibition erzielt. Da Compound 26 resistent gegenüber der Spaltung durch γ -Glutamyltranspeptidase ist, könnte dieser Vorteil die stärkere Inhibition erklären. In Abhängigkeit vom verwendeten Ester könnten eventuell sogar IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich erzielt werden. Andere Möglichkeiten für die Weiterentwicklung dieser Substanzen liegen nicht nur in der chemischen Synthese verschiedener Ester, sondern auch in der chemischen Synthese von sogenannten Doppelkopf-Substanzen, bei denen zwei Wirkstoffe miteinander verknüpft werden [36]. So könnte der Glyoxalaseinhibitor wie in [36] beschrieben mit einem Aminoquinolin über einen enzymatisch spaltbaren Ester verknüpft werden. Diese Strategie würde nicht nur das Problem lösen, ob der Wirkstoff die Membran überqueren kann, sondern könnte auch einen synergistischen Effekt erzielen. Alternativ könnten die schwergängigen Substanzen zusammen mit einer Begleitsubstanz (z.B. grenzflächenaktive Substanzen wie pluronic L121 [91] oder Digitonin [52]) appliziert werden, die den Membrantransfer erleichtert. Sobald die Kristallstruktur der PfGloI bekannt ist, könnten die Ergebnisse aus der Struktur ebenfalls bei der Neu- oder Weiterentwicklung der Inhibitoren behilflich sein. Diese neu entwickelten Stoffe könnten dann auf ihre Wirkung auf *P. falciparum* untersucht und genauer analysiert werden, indem nicht nur der K_i^{app} auf rekombinante PfGloI und der IC_{50} ermittelt werden. Um PfGloI als Zielort zu bestätigen, könnte der Inhibitor in Zellkultur getestet werden und anschließend die Restaktivität von PfGloI im Parasitenlysate sowie der hGloI im Erythrozytenlysate bestimmt werden. Für einen besseren Vergleich könnten Inhibitionsstudien an hGloI von Interesse sein, die aufdecken, ob hGloI ebenfalls allosterisch gekoppelt ist und ob bei der Inhibition somit auch zwei apparente Inhibitionskonstanten erhalten werden.

Zusammenfassung

Die Malariaerreger der Gattung *Plasmodium* haben elegante Maßnahmen entwickelt, um dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen und gleichzeitig von dessen Nährstoffreichtum zu profitieren. So ermöglicht zum Beispiel die Invasion in rote Blutkörperchen dem Parasiten, sich ungehindert am Glucosevorrat der Wirtszelle zu bedienen und seinen erhöhten Energiebedarf zu stillen. Jedoch führt der vermehrte Glucoseverbrauch auch zu einer erhöhten Konzentration an Methylglyoxal, einem toxischen Stoffwechselnebenprodukt während der Glykolyse. Der Abbau von Methylglyoxal und anderen 2-Oxoaldehyden erfolgt durch das ubiquitäre Glyoxalasesystem, bestehend aus Glyoxalase I und Glyoxalase II.

In *Plasmodium falciparum* wurden drei funktionelle Glyoxalasen (*PfGloI*, *PfcGloII* und *PftGloII* mit einer potentiellen N-terminalen Signalsequenz) identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von GFP-getaggten Glyoxalasen zum ersten Mal die jeweilige subzelluläre Lokalisation untersucht. *PfGloI* und *PfcGloII* befinden sich im Zytosol des Parasiten, während *PftGloII* im Apikoplasten nachgewiesen wurde und somit die erste experimentell bestätigte Glyoxalase in einem Plastiden ist. Die Existenz eines Glyoxalasesystems im Zytosol des Parasiten war aufgrund der hohen Glykolyserate zu erwarten, jedoch ist die physiologische Rolle von *PftGloII* im Apikoplasten noch unklar. Entweder ist *PftGloII* ebenfalls an der Entgiftung von Methylglyoxal beteiligt oder wandelt eventuell andere, bisher unidentifizierte Substrate im Apikoplasten um.

Nachdem ein funktionelles Glyoxalasesystem im Zytosol bestätigt wurde, stellte sich die Frage, ob beide Enzyme für eine effiziente Entgiftung mittels „substrate shuffling“ eng zusammenarbeiten. *PfGloI* und *PfcGloII* scheinen jedoch nicht miteinander zu interagieren, jedoch zeigten weitere Interaktionsstudien (darunter Gelfiltration, Pull-Down- und Crosslinking-Experimente), dass *PfcGloII* in Lösung in einem Gleichgewicht aus Monomer und Dimer vorliegt. Die Bildung von labilen Dimeren könnte einer direkten Steuerung der Aktivität dienen und/oder für eine Änderung von Signaltransduktionsprozessen sorgen.

PfcGloII ist eine Metallohydrolase mit hochkonservierten Aminosäuren für Katalyse und Substratbindung. *PfcGloII* Wildtyp und Mutationen der Substratbindung wurden für eine ausführliche Charakterisierung des Katalysemechanismus enzymkinetisch untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass die Hydrolyse von S-D-Lactoylglutathion in nicht-toxisches D-Lactat stark von der Salzkonzentration und dem pH-Wert abhängig ist und die Substratbindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Durch Produktinhibitionsstudien wurde nachgewiesen, dass *PfGloII* nach dem seltenen Theorell-Chance-Mechanismus arbeitet und Glutathion als letztes Produkt das aktive Zentrum verlässt. Desweiteren wurde zum ersten Mal durch eine *PfGloII*-Mutante die Säure-Base-Katalyse sichtbar gemacht, die sonst durch die geschwindigkeitsbestimmende Substratbindung verdeckt wurde. Das Substrat bindet vorwiegend über ionische Wechselwirkungen an die hoch konservierten Aminosäuren Arg257 und Lys260. Weitere Aminosäuren für die Katalyse sind ebenfalls hoch konserviert. Somit können die beschriebenen Ergebnisse zum Katalysemechanismus von *PfGloII* vermutlich auch auf Glyoxalase II Isoenzyme anderer Organismen übertragen werden.

Das Glyoxalasesystem wird schon seit längerem als potentiell Ziel zur Entwicklung von Antimalaria-Wirkstoffen angesehen. Während dieser Arbeit wurden einige kürzlich beschriebene Inhibitoren von *GloI* an rekombinanter *PfGloI* sowie in Zellkultur getestet, um weitere Informationen zur Hemmung des Glyoxalasesystems zu sammeln. Alle untersuchten Inhibitoren hemmten das Wachstum von *Plasmodium falciparum* mit einem IC_{50} im mikromolaren Bereich. Außerdem wurde eine Inhibition von rekombinanter *PfGloI* nachgewiesen, jedoch mit unterschiedlichen Auswirkungen. Curcumin und Compound 26 scheinen bevorzugt nur an ein aktives Zentrum der monomeren *PfGloI* zu binden, während Methylgerfelin und Compound 5 beide aktiven Zentren hemmen können. Ein weiterer Unterschied lag in der Effizienz der einzelnen Inhibitoren. Curcumin und Methylgerfelin erreichten K_i^{app} -Werte im mikromolaren Bereich. Compound 5 und 26 hingegen wiesen K_i^{app} -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich auf und sind demzufolge die derzeit wirkungsvollsten Inhibitoren von *PfGloI*.

Summary

Malaria parasites of the genus *Plasmodium* have developed sophisticated mechanisms to escape their hosts' immune response and to benefit from their nutrient-rich environment at the same time. For example, hiding in red blood cells enables the parasite to easily satisfy its elevated demand for glucose. However, as a consequence of its high glycolytic rates the parasite has to deal with an increased concentration of methylglyoxal, a harmful by-product which forms spontaneously during glycolysis. Detoxification of methylglyoxal and other 2-oxoaldehydes is realized by the ubiquitous glyoxalase system consisting of the enzymes glyoxalase I and II.

Three glyoxalase enzymes (*PfGloI*, *PfcGloII* and *PftGloII* with a putative N-terminal targeting sequence) had been identified in *Plasmodium falciparum*. The subcellular localization of these three enzymes was determined by microscopy using GFP-tagged proteins. *PfGloI* and *PfcGloII* were found in the cytosol of the parasite, whereas *PftGloII* was detected in the apicoplast and is therefore the first experimentally confirmed plastid glyoxalase. The existence of a glyoxalase system in the cytosol had been expected as the parasite has high glycolytic fluxes, but the physiological role of *PftGloII* is still unknown. Either *PftGloII* participates in detoxifying methylglyoxal as well or it utilizes other substrates generated in the apicoplast.

Confirming a functional glyoxalase system in the parasite cytosol led to the question whether both enzymes work together via substrate shuffling to ensure efficient detoxification. *PfGloI* and *PfcGloII* do not seem to interact, but further interaction studies including gelfiltration, pull down and crosslinking experiments led to the discovery of a rapid monomer-dimer-equilibrium of *PfcGloII* in solution. A transient dimerization of GloII-isozymes might either directly regulate the activity and/or might lead to altered signal transduction pathways.

PfcGloII is a metallohydrolase and has highly conserved amino acids in its active site. To examine the catalytic mechanism in detail, wild type *PfcGloII* and mutations of the substrate binding site had been analysed. This extensive study showed that the conversion of S-D-lactoylglutathione to non-toxic D-lactate is a salt- and pH-depending process

and that substrate binding is the rate-limiting step. Product inhibition studies support a Theorell-Chance mechanism with glutathione leaving the active site as the second product. In addition, acid-base catalysis was revealed for the first time - a process that is usually masked due to the rate-limiting substrate binding. The substrate is predominantly bound via ionic interactions with the conserved residues Arg257 and Lys260. Other amino acids involved in catalysis are highly conserved as well. Therefore, the results gained on *PfcGloII* are presumably also valid for *GloII* from many other organisms.

For several years now, the glyoxalase system is considered to be a potential target for the development of new antimalarial drugs. To get more information about the inhibition of the glyoxalase system, several recently described inhibitors had been tested on recombinant *PfGloI* and in cell culture. All inhibitors examined were able to impede the growth of *Plasmodium falciparum* with an IC_{50} in the micromolar range. Furthermore, inhibition of recombinant *PfGloI* with different outcome could be demonstrated. Curcumin and compound 26 seem to bind preferentially to one of the active sites, whereas methylgerfelin and compound 5 seem to inhibit both active sites. Another difference could be observed concerning the effectivity of the substances. Curcumin and methylgerfelin achieved K_i^{app} values in the micromolar range. On the contrary, compound 5 and 26 exhibited K_i^{app} values in the low nanomolar range and are therefore the most potent inhibitors at present.

Literaturverzeichnis

- [1] Akoachere M, Iozef R, Rahlfs S, Deponte M, Mannervik B, Creighton DJ, Schirmer H, Becker K (2005) Characterization of the glyoxalases of the malarial parasite *Plasmodium falciparum* and comparison with their human counterparts. *Biol Chem* **386**: 41–52.
- [2] Al-Timari A, Douglas KT (1986) Inhibition by glutathione derivatives of bovine liver glyoxalase II (hydroxyacylglutathione hydrolase) as a probe of the N- and S-sites for substrate binding. *Biochim Biophys Acta* **870**: 219–225.
- [3] Al-Timari A, Douglas KT (1986) Inhibition of mammalian glyoxalase I (lactoylglutathione lyase) by N-acylated S-blocked glutathione derivatives as a probe for the role of the N-site of glutathione in glyoxalase I mechanism. *Biochim Biophys Acta* **870**: 160–168.
- [4] Allen RE, Lo TW, Thornalley PJ (1993) Purification and characterisation of glyoxalase II from human red blood cells. *Eur J Biochem* **213**: 1261–1267.
- [5] Allen RE, Lo TW, Thornalley PJ (1993) A simplified method for the purification of human red blood cell glyoxalase. I. Characteristics, immunoblotting, and inhibitor studies. *J Protein Chem* **12**: 111–119.
- [6] Anderson ME, Powrie F, Puri RN, Meister A (1985) Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. *Arch Biochem Biophys* **239**: 538–548.
- [7] Armstrong RN (2000) Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* **39**: 13625–13632.
- [8] Aronsson AC, Sellin S, Tibbelin G, Mannervik B (1981) Probing the active site of glyoxalase I from human erythrocytes by use of the strong reversible inhibitor S-p-bromobenzylglutathione and metal substitutions. *Biochem J* **197**: 67–75.
- [9] Awasthi S, Pandya U, Singhal SS, Lin JT, Thiviyanathan V, Seifert WE, Awasthi YC, Ansari GA (2000) Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact* **128**: 19–38.
- [10] Ball JC, Vander Jagt DL (1981) S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase (glyoxalase II): active-site mapping of a nons erine thiolesterase. *Biochemistry* **20**: 899–905.
- [11] Bannister L, Mitchell G (2003) The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol* **19**: 209–213.

- [12] Barnard JF, Jagt DLV, Honek JF (1994) Small molecule probes of glyoxalase I and glyoxalase II. *Biochim Biophys Acta* **1208**: 127–135.
- [13] Becker K, Gui M, Traxler A, Kirsten C, Schirmer RH (1994) Redox processes in malaria and other parasitic diseases. Determination of intracellular glutathione. *Histochemistry* **102**: 389–395.
- [14] Becker K, Rahlfs S, Nickel C, Schirmer RH (2003) Glutathione–functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem* **384**: 551–566.
- [15] Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523.
- [16] Bisswanger H (2000) *Enzymkinetik*. 3. Auflage. Weinheim, Deutschland: Wiley-VCH.
- [17] Bito A, Haider M, Hadler I, Breitenbach M (1997) Identification and phenotypic analysis of two glyoxalase II encoding genes from *Saccharomyces cerevisiae*, GLO2 and GLO4, and intracellular localization of the corresponding proteins. *J Biol Chem* **272**: 21509–21519.
- [18] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- [19] Brandt RB, Laux JE, Yates SW, Boots MR, Thomson C, Edge C (1986) Inhibition of glyoxalase I in vitro by coumarin and coumarin derivatives. *International Journal of Quantum Chemistry* **30**: 155–165.
- [20] Brocklehurst K (1996) *Physical factors affecting enzyme activity*. In: Enzymology Labfax, P.C. Engel, ed. San Diego, CA/ Oxford: Academic Press/Bios Scientific Publishers Ltd., pp. 175–198.
- [21] Buchholz K, Putrianti ED, Rahlfs S, Schirmer RH, Becker K, Matuschewski K (2010) Molecular genetics evidence for the in vivo roles of the two major NADPH-dependent disulfide reductases in the malaria parasite. *J Biol Chem* **285**: 37388–37395.
- [22] Cameron AD, Olin B, Ridderström M, Mannervik B, Jones TA (1997) Crystal structure of human glyoxalase I—evidence for gene duplication and 3D domain swapping. *EMBO J* **16**: 3386–3395.
- [23] Cameron AD, Ridderström M, Olin B, Kavarana MJ, Creighton DJ, Mannervik B (1999) Reaction mechanism of glyoxalase I explored by an X-ray crystallographic analysis of the human enzyme in complex with a transition state analogue. *Biochemistry* **38**: 13480–13490.
- [24] Cameron AD, Ridderström M, Olin B, Mannervik B (1999) Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure* **7**: 1067–1078.
- [25] Campos-Bermudez VA, Leite NR, Krog R, Costa-Filho AJ, Soncini FC, Oliva G, Vila AJ (2007) Biochemical and structural characterization of *Salmonella typhimurium* glyoxalase II: new insights into metal ion selectivity. *Biochemistry* **46**: 11069–11079.
- [26] Chou PY, Fasman GD (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem* **47**: 251–276.

- [27] Copeland RA (2000) *Enzymes - A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2nd edition. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- [28] Cordell PA, Futers TS, Grant PJ, Pease RJ (2004) The Human hydroxyacylglutathione hydrolase (HAGH) gene encodes both cytosolic and mitochondrial forms of glyoxalase II. *J Biol Chem* **279**: 28653–28661.
- [29] Cox FE (2010) History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* **3**: 5.
- [30] Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B (2008) Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* **46**: 165–171.
- [31] 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.
- [32] Creighton DJ, Migliorini M, Pourmotabbed T, Guha MK (1988) Optimization of efficiency in the glyoxalase pathway. *Biochemistry* **27**: 7376–7384.
- [33] Crowder MW, Maiti MK, Banovic L, Makaroff CA (1997) Glyoxalase II from A. thaliana requires Zn(II) for catalytic activity. *FEBS Lett* **418**: 351–354.
- [34] Cui L, Miao J, Cui L (2007) Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite Plasmodium falciparum: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 488–494.
- [35] Dakin HD, Dudley HW (1913) On glyoxalase. *J Biol Chem* **14**: 423–431.
- [36] Davioud-Charvet E, Delarue S, Biot C, Schwöbel B, Boehme CC, Müssigbrodt A, Maes L, Sergheraert C, Grellier P, Schirmer RH, Becker K (2001) A prodrug form of a Plasmodium falciparum glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. *J Med Chem* **44**: 4268–4276.
- [37] Deponte M, Becker K (2004) Plasmodium falciparum—do killers commit suicide? *Trends Parasitol* **20**: 165–169.
- [38] Deponte M, Sturm N, Mittler S, Harner M, Mack H, Becker K (2007) Allosteric coupling of two different functional active sites in monomeric Plasmodium falciparum glyoxalase I. *J Biol Chem* **282**: 28419–28430.
- [39] Dixon M (1972) The graphical determination of K_m and K_i . *Biochem J* **129**: 197–202.
- [40] Douglas KT, Gohel DI, Nadvi IN, Quilter AJ, Seddon AP (1985) Partial transition-state inhibitors of glyoxalase I from human erythrocytes, yeast and rat liver. *Biochim Biophys Acta* **829**: 109–118.
- [41] Duraisingh MT, Triglia T, Cowman AF (2002) Negative selection of Plasmodium falciparum reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. *Int J Parasitol* **32**: 81–89.

- [42] Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606–2617.
- [43] Fidock DA, Wellems TE (1997) Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10931–10936.
- [44] Fleige T, Fischer K, Ferguson DJP, Gross U, Bohne W (2007) Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryot Cell* **6**: 984–996.
- [45] Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DE (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* **51**: 97–123.
- [46] Frickel EM, Jemth P, Widersten M, Mannervik B (2001) Yeast glyoxalase I is a monomeric enzyme with two active sites. *J Biol Chem* **276**: 1845–1849.
- [47] Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O’Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–741.
- [48] Greig N, Wyllie S, Patterson S, Fairlamb AH (2009) A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids. *FEBS J* **276**: 376–386.
- [49] Guha MK, Jagt DLV, Creighton DJ (1988) Diffusion-dependent rates for the hydrolysis reaction catalyzed by glyoxalase II from rat erythrocytes. *Biochemistry* **27**: 8818–8822.
- [50] Hamilton DS, Creighton DJ (1992) Inhibition of glyoxalase I by the enediol mimic S-(N-hydroxy-N-methylcarbamoyl)glutathione. The possible basis of a tumor-selective anticancer strategy. *J Biol Chem* **267**: 24933–24936.
- [51] He MM, Clugston SL, Honek JE, Matthews BW (2000) Determination of the structure of *Escherichia coli* glyoxalase I suggests a structural basis for differential metal activation. *Biochemistry* **39**: 8719–8727.
- [52] Hellmann JK, Münter S, Wink M, Frischknecht F (2010) Synergistic and additive effects of epigallocatechin gallate and digitonin on *Plasmodium* sporozoite survival and motility. *PLoS One* **5**: e8682.
- [53] Henderson PJ (1972) A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem J* **127**: 321–333.
- [54] Himo F, Siegbahn PE (2001) Catalytic mechanism of glyoxalase I: a theoretical study. *J Am Chem Soc* **123**: 10280–10289.
- [55] Hsiao LL, Howard RJ, Aikawa M, Taraschi TF (1991) Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **274** (Pt 1): 121–132.

- [56] Iozef R, Rahlfs S, Chang T, Schirmer H, Becker K (2003) Glyoxalase I of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: evidence for subunit fusion. *FEBS Lett* **554**: 284–288.
- [57] Irsch T, Krauth-Siegel RL (2004) Glyoxalase II of African trypanosomes is trypanothione-dependent. *J Biol Chem* **279**: 22209–22217.
- [58] Kappe SHI, Vaughan AM, Boddey JA, Cowman AF (2010) That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda. *Science* **328**: 862–866.
- [59] Kavarana MJ, Kovaleva EG, Creighton DJ, Wollman MB, Eiseman JL (1999) Mechanism-based competitive inhibitors of glyoxalase I: intracellular delivery, in vitro antitumor activities, and stabilities in human serum and mouse serum. *J Med Chem* **42**: 221–228.
- [60] Kawatani M, Okumura H, Honda K, Kanoh N, Muroi M, Dohmae N, Takami M, Kitagawa M, Futamura Y, Imoto M, Osada H (2008) The identification of an osteoclastogenesis inhibitor through the inhibition of glyoxalase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11691–11696.
- [61] Kehr S, Sturm N, Rahlfs S, Przyborski JM, Becker K (2010) Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLoS Pathog* **6**: e1001242.
- [62] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- [63] Lambros C, Vanderberg JP (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65**: 418–420.
- [64] Lim L, McFadden GI (2010) The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 749–763.
- [65] Lo TW, Thornalley PJ (1992) Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by diethyl esters of glyoxalase inhibitors in vitro. *Biochem Pharmacol* **44**: 2357–2363.
- [66] Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L (2009) Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol* **7**: 341–354.
- [67] Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ (1993) Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* **48**: 739–741.
- [68] Marasinghe GPK, Sander IM, Bennett B, Periyannan G, Yang KW, Makaroff CA, Crowder MW (2005) Structural studies on a mitochondrial glyoxalase II. *J Biol Chem* **280**: 40668–40675.
- [69] McKay GA, Wright GD (1995) Kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase type IIIa. Evidence for a Theorell-Chance mechanism. *J Biol Chem* **270**: 24686–24692.
- [70] Melino S, Capo C, Dragani B, Aceto A, Petruzzelli R (1998) A zinc-binding motif conserved in glyoxalase II, beta-lactamase and arylsulfatases. *Trends Biochem Sci* **23**: 381–382.

- [71] Mitić N, Smith SJ, Neves A, Guddat LW, Gahan LR, Schenk G (2006) The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. *Chem Rev* **106**: 3338–3363.
- [72] More SS, Vince R (2006) A metabolically stable tight-binding transition-state inhibitor of glyoxalase-I. *Bioorg Med Chem Lett* **16**: 6039–6042.
- [73] More SS, Vince R (2009) Inhibition of glyoxalase I: the first low-nanomolar tight-binding inhibitors. *J Med Chem* **52**: 4650–4656.
- [74] Murthy NS, Bakeris T, Kavarana MJ, Hamilton DS, Lan Y, Creighton DJ (1994) S-(N-aryl-N-hydroxycarbamoyl)glutathione derivatives are tight-binding inhibitors of glyoxalase I and slow substrates for glyoxalase II. *J Med Chem* **37**: 2161–2166.
- [75] Neuberg C (1913) The destruction of lactic aldehyde and methylglyoxal by animal organs. *Biochem Z* **49**: 502–506.
- [76] Norton SJ, Elia AC, Chyan MK, Gillis G, Frenzel C, Principato GB (1993) Inhibitors and inhibition studies of mammalian glyoxalase II activity. *Biochem Soc Trans* **21**: 545–549.
- [77] Pastrana-Mena R, Dinglasan RR, Franke-Fayard B, Vega-Rodríguez J, Fuentes-Caraballo M, Baerga-Ortiz A, Coppens I, Jacobs-Lorena M, Janse CJ, Serrano AE (2010) Glutathione reductase-null malaria parasites have normal blood stage growth but arrest during development in the mosquito. *J Biol Chem* **285**: 27045–27056.
- [78] Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM (2006) The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol* **4**: 849–856.
- [79] Racker E (1951) The mechanism of action of glyoxalase. *J Biol Chem* **190**: 685–696.
- [80] Radfar A, Méndez D, Moneriz C, Linares M, Marín-García P, Puyet A, Diez A, Bautista JM (2009) Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels. *Nat Protoc* **4**: 1899–1915.
- [81] Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN (2005) Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* **326**: 472–474.
- [82] Richter U, Krauss M (2001) Active site structure and mechanism of human glyoxalase I-an ab initio theoretical study. *J Am Chem Soc* **123**: 6973–6982.
- [83] Ridderström M, Jemth P, Cameron AD, Mannervik B (2000) The active-site residue tyr-175 in human glyoxalase II contributes to binding of glutathione derivatives. *Biochim Biophys Acta* **1481**: 344–348.
- [84] Rossner M, Yamada KM (2004) What's in a picture? The temptation of image manipulation. *J Cell Biol* **166**: 11–15.
- [85] Saliba KJ, Horner HA, 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.

- [86] Santel T, Pflug G, Hemdan NYA, Schäfer A, Hollenbach M, Buchold M, Hintersdorf A, Lindner I, Otto A, Bigl M, Oerlecke I, Hutschenreuter A, Sack U, Huse K, Groth M, Birkemeyer C, Schellenberger W, Gebhardt R, Platzer M, Weiss T, Vijayalakshmi MA, Krüger M, Birkenmeier G (2008) Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS One* **3**: e3508.
- [87] Segel IH (1993) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- [88] Sherman IW (1979) Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites). *Microbiol Rev* **43**: 453–495.
- [89] Silva MS, Barata L, Ferreira AEN, Romão S, Tomás AM, Freire AP, Cordeiro C (2008) Catalysis and structural properties of Leishmania infantum glyoxalase II: trypanothione specificity and phylogeny. *Biochemistry* **47**: 195–204.
- [90] Silva MS, Ferreira AEN, Tomás AM, Cordeiro C, Freire AP (2005) Quantitative assessment of the glyoxalase pathway in Leishmania infantum as a therapeutic target by modelling and computer simulation. *FEBS J* **272**: 2388–2398.
- [91] Souza JBD, Ling IT, Ogun SA, Holder AA, Playfair JH (1996) Cytokines and antibody subclass associated with protective immunity against blood-stage malaria in mice vaccinated with the C terminus of merozoite surface protein 1 plus a novel adjuvant. *Infect Immun* **64**: 3532–3536.
- [92] Thornalley PJ (1988) Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J* **254**: 751–755.
- [93] Thornalley PJ (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med* **14**: 287–371.
- [94] Thornalley PJ (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* **27**: 565–573.
- [95] Thornalley PJ (1998) Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem Biol Interact* **111-112**: 137–151.
- [96] Thornalley PJ (2003) Glyoxalase I—structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans* **31**: 1343–1348.
- [97] Thornalley PJ, Strath M, Wilson RJ (1994) Antimalarial activity in vitro of the glyoxalase I inhibitor diester, S-p-bromobenzylglutathione diethyl ester. *Biochem Pharmacol* **47**: 418–420.
- [98] Tonkin CJ, van Dooren GG, Spurck TP, Struck NS, Good RT, Handman E, Cowman AF, McFadden GI (2004) Localization of organellar proteins in Plasmodium falciparum using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol* **137**: 13–21.

- [99] Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350–4354.
- [100] Trager W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**: 673–675.
- [101] Tuteja R (2007) Malaria - an overview. *FEBS J* **274**: 4670–4679.
- [102] Uotila L (1973) Purification and characterization of S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase (glyoxalase II) from human liver. *Biochemistry* **12**: 3944–3951.
- [103] Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Campos NM, Baack BR (1990) D-lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **42**: 277–284.
- [104] Vince R, Brownell J, Akella LB (1999) Synthesis and activity of gamma-(L-gamma-azaglutamyl)-S-(p-bromobenzyl)-L-cysteinylglycine: a metabolically stable inhibitor of glyoxalase I. *Bioorg Med Chem Lett* **9**: 853–856.
- [105] Vince R, Daluge S, Wadd WB (1971) Studies on the inhibition of glyoxalase I by S-substituted glutathiones. *J Med Chem* **14**: 402–404.
- [106] Vince R, Wadd WB (1969) Glyoxalase inhibitors as potential anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun* **35**: 593–598.
- [107] Waller RF, Reed MB, Cowman AF, McFadden GI (2000) Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J* **19**: 1794–1802.
- [108] Wehner R KA Gehring W (2007) *Zoologie*. 24. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Thieme.
- [109] Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE (2009) New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 879–891.
- [110] Wells TNC, Burrows JN, Baird JK (2010) Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol* **26**: 145–151.
- [111] Wendler A, Irsch T, Rabbani N, Thornalley PJ, Krauth-Siegel RL (2009) Glyoxalase II does not support methylglyoxal detoxification but serves as a general trypanothione thioesterase in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* **163**: 19–27.
- [112] Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M (2003) Neue Antimalaria-Wirkstoffe. *Angewandte Chemie* **115**: 5432–5451.
- [113] Wilcox DE (1996) Binuclear Metallohydrolases. *Chem Rev* **96**: 2435–2458.
- [114] World Health Organization. World Malaria Report 2010 (<http://www.who.int/malaria>).
- [115] Zang TM, Hollman DA, Crawford PA, Crowder MW, Makaroff CA (2001) Arabidopsis glyoxalase II contains a zinc/iron binuclear metal center that is essential for substrate binding and catalysis. *J Biol Chem* **276**: 4788–4795.

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

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

- [V.1] Urscher M, Deponte M (2009) *Plasmodium falciparum* glyoxalase II: Theorell-Chance product inhibition patterns, rate-limiting substrate binding via Arg(257)/Lys(260), and unmasking of acid-base catalysis. *Biol Chem* **390**: 1171–83.
- [V.2] Urscher M, Przyborski JM, Imoto M, Deponte M (2010) Distinct subcellular localization in the cytosol and apicoplast, unexpected dimerization and inhibition of *Plasmodium falciparum* glyoxalases. *Mol Microbiol* **76**: 92–103.
- [V.3] Urscher M, Alisch R, Deponte M (2011) The glyoxalase system of malaria parasites–Implications for cell biology and general glyoxalase research. *Semin Cell Dev Biol*. (In Press) DOI: 10.1016/j.semcdb. 2011.02.003.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und die sehr lehrreiche Zeit an seinem Institut.

Bei Prof. Dr. Jürgen Soll möchte ich mich für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Marcel Deponte, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Das interessante Projekt, das er mir überließ, seine Anregungen, Ideen und stete Bereitschaft zur Diskussion haben dazu beigetragen, dass meine Promotionszeit immer abwechslungsreich blieb.

Bei Elisabeth Weyer bedanke ich mich für die Durchführung der CD-Spektren, bei Dr. Stephan Uebel für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation und bei Helmut Hartl für die Metallionenanalyse. Weiter Dank gilt Dr. Torsten Pirch für die Unterstützung und Hilfe bei der SPR-Spektroskopie. Danke auch an Dr. Jude Przyborski für den Aufenthalt in Marburg und die Einführung in die Plasmodienzellkultur und Mikroskopie sowie Prof. Masaya Imoto und Prof. Robert Vince für die freundliche Bereitstellung der Inhibitoren.

Ein herzlicher Dank geht an das ganze Neupert-Labor für die vielen netten Gespräche und wissenschaftlichen Diskussionen. Frau Hauck und ganz besonders Christine Werner gilt mein herzlicher Dank für ihre Hilfe und Unterstützung in allen organisatorischen Dingen. Frau Reisenauer, Regina und Marianne danke ich für die Bereitstellung des sauberen Arbeitsmaterials. Peter Reiser und Gerd Fried danke ich für die Lösung von technischen Problemen jeder Art. Bei Petra Heckmeyer bedanke ich mich herzlich für ihre technische Unterstützung, die mir den Laboralltag ungemein erleichtert hat.

Ganz besonderer Dank geht an Max, Lisi, Sarah, Silvia, Marta und Romy für die wundervolle Zeit im Labor, die Gespräche über alles mögliche, die gemeinsamen Mittagessen und Kaffeepausen sowie vieles mehr. Die letzten Jahren mit euch haben viel Spaß gemacht.

Mein Dank gilt insbesondere meinen Eltern, die mir diesen Lebensweg ermöglicht haben und mich jederzeit in allen Dingen unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	23.06.1982
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch

Hochschulausbildung

05/2007 -	Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie an der LMU München zum Thema „Charakterisierung des Glyoxalasesystems des Malariaerregers <i>Plasmodium falciparum</i> “
05/2006 - 02/2007	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Neurobiologie (Martinsried) zum Thema „Transduktion und Apoptose-Induktion mit rekombinant hergestelltem Granzym B und Perforin“
10/2001 - 02/2007	Studium der Biologie an der TU München

Schulbildung

1992 - 2001	Deutschherren-Gymnasium (Aichach)
1988 - 1992	Grundschule an der Bernhard-Rößner-Straße (Gröbenzell)