

**Spermidin Metabolismus in *Plasmodium falciparum*  
und *Plasmodium vivax*: Biochemische und  
molekularbiologische Untersuchungen der  
Deoxyhypusinsynthese und des eukaryontischen  
Translationsinitiationsfaktors 5A**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der**

**Mathematischen Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von**

**Andrea Martina Gottwald**

**aus**

**Zürich**

**Bonn 2004**

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematischen Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Walter A. Maier
2. Referent: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 7.6.2005

„Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.“  
2005

Für meine Eltern Klaus - Peter und Verena Gottwald,  
die stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Science is wonderfully equipped to answer the question "How?" but  
it gets terribly confused when you ask the question "Why?"

(Erwin Chargaff)

## Verzeichnis von Abkürzungen

aa	Aminosäuren
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AT-Gehalt	Adenin Thymidin Gehalt
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indol-Phosphat, Dinatrium Salz
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CQS	Chloroquin - sensibel
CQR	Chloroquin - resistent
CSP	Circumsporozoite Protein
DAH	1,7-Diaminoheptan
DCA	Dicyclohexylamine
DHS	Deoxyhypusinsynthase
DHH	Deoxyhypusinhydroxylase
DMFA	Dimethylformamid
dNTP	Desoxynucleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Dinatriummethyldiamintetraacetat
eIF5A	eukaryontischer Translationsinitiationsfaktor 5A
EGF	epidermal growth factor/ Epidermaler Wachstumsfaktor
et al.	et alii (lat.: und andere)
FAS	Fettsäurebiosynthese (Fatty acid biosynthesis)
GC7	N1-guanyl-1,7-Diaminoheptan
GC-Gehalt	Guanosin Cytosin Gehalt
HSS	Homospermidinsynthase
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
MGBG	Methylglyoxalbis (guanylhydrazon)
Min.	Minute
mRNA	messenger RNA
<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
NADH+H	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NBT	p-Nitro Blau Tetrazolium Chlorid
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>R. viridis</i>	<i>Rhodopseudomonas viridis</i>

RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SAMDC	S-Adenosylmethionindecaboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SPS	Spermidin Synthase
<i>S. vulgaris</i>	<i>Senecio vulgaris</i>
<i>S. vernalis</i>	<i>Senecio vernalis</i>
Std.	Stunde
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. b. gambiense</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
RBM	Roll back malaria
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
U	Unit/ Einheit
Vol.	Volumen
VT	Volumenteil
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indol-®-D-Galactopyranosid

---

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Lebenszyklus der Malaria Erreger <i>Plasmodium falciparum</i> und <i>Plasmodium vivax</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 Molekulares Targeting</b> .....	<b>18</b>
1.2.1 Die alternative Fettsäurebiosynthese II in <i>Plasmodium falciparum</i> ....	18
1.2.2 Der alternative Isoprenoidweg in <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
1.2.3 Der Polyaminstoffwechselweg und regulatorisch wichtige Gene der Polyaminbiosynthese aus <i>Plasmodium falciparum</i> .....	22
<b>1.3 Der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A (eIF5A)</b> .....	<b>26</b>
<b>1.4 Der Polyaminbiosyntheseinhibitor Agmatin</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
<b>Material</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1 Geräte</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3 Kits</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4 Chemikalien</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5 Inhibitoren</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6 Enzyme, Antikörper, Standards und Antibiotika</b> .....	<b>36</b>
<b>2.7 Stamm- und Standardlösungen</b> .....	<b>37</b>
<b>2.8 Medien</b> .....	<b>40</b>
2.8.1 Medien zur Aufzucht von Plasmodien.....	40
2.8.2 Medium zur Aufzucht von Bakterien .....	40

---

<b>2.9</b>	<b>Verwendete <i>Plasmodium falciparum</i>- und <i>Plasmodium vivax</i>- Stämme</b> .....	<b>41</b>
<b>2.10</b>	<b>Verwendete Primer</b> .....	<b>42</b>
<b>2.11</b>	<b>Verwendete Bakterienstämme</b> .....	<b>43</b>
<b>2.12</b>	<b>Klonierungsvektoren und Expressionsvektoren</b> .....	<b>43</b>
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeine Methoden zur Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen</b> .....	<b>44</b>
3.1.1	Ansetzen einer <i>Plasmodium falciparum</i> Dauerkultur .....	44
3.1.2	Kultivierung der Stämme .....	44
3.1.3	Erstellung eines Erythrozytenkonzentrats .....	45
3.1.4	Gewinnung von Serum .....	45
3.1.5	Anlegen von <i>Plasmodium falciparum</i> Dauerkulturen .....	46
<b>3.2</b>	<b>Biochemische Untersuchungen</b> .....	<b>46</b>
3.2.1	Inhibitorexperimente mit <i>Plasmodium falciparum</i> - Stämmen .....	46
3.2.1.1	Darstellung der Wachstumskurven .....	47
3.2.1.2	Determinierung der IC <sub>50</sub> Werte .....	47
3.2.2	Nachweis und Identifikation der Polyamine durch GC/MS Analyse (Gas Chromatographie Massen Spektrometrie) .....	47
3.2.2.1	Isolierung von Plasmodien aus Erythrozyten .....	47
3.2.2.2	Extraktion der Polyamine aus Plasmodien für die GC/MS Analyse .....	47
3.2.2.3	Kontrollen für die GC/MS Analyse .....	48
<b>3.3</b>	<b>RNA Isolierung</b> .....	<b>48</b>
3.3.1	Vorbereitende Maßnahmen zur Gewinnung von RNA .....	48
3.3.2	RNA Isolierung .....	48
3.3.3	Analyse von RNA auf Formaldehydgelen .....	49
3.3.4	RT-PCR: Reverse Transkriptase PCR .....	50
3.3.4.1	RT-PCR aus <i>Plasmodium falciparum</i> .....	50

<b>3.4 Allgemeine Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>51</b>
3.4.1 Isolierung von genomischer DNA .....	51
3.4.2 PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion.....	51
3.4.2.1 Amplifikation bekannter DNA Sequenzen von Plasmiden mit genspezifischen Primern .....	52
3.4.2.2 Touchdown PCR: Amplifikation der HSS/DHS codierenden Region von den <i>Plasmodium falciparum</i> - Stämmen Dd2, NF54 und R-Stamm.....	52
3.4.2.3 Amplifikation des Fulllength - Klons der DHS/HSS codierenden Sequenz aus <i>Plasmodium falciparum</i> .....	53
3.4.2.4 Amplifikation der HSS/DHS aus <i>Plasmodium falciparum</i> mit genspezifischen Primern für die nachfolgende Subklonierung in ein Expressionsplasmid .....	54
3.4.2.5 Amplifikation des Fulllength - Klons der eIF-5A codierenden Sequenz aus <i>Plasmodium vivax</i> .....	54
3.4.2.6 Amplifikation von eIF-5A aus <i>Plasmodium vivax</i> mit genspezifischen Primern für die nachfolgende Subklonierung in ein Expressionsplasmid .....	55
3.4.3 Agarose Gelelektrophorese .....	55
3.4.4 Gel Extraktion .....	56
3.4.5 Restriktion.....	56
3.4.6 Extraktion mit Phenol/Chloroform .....	57
3.4.7 Ligation von DNA.....	57
3.4.8 Transformation.....	59
3.4.8.1 Transformation mit dem TOPO TA Cloning ® und dem AccepTor™ Vector Kit.....	59
3.4.8.2 Transformation in BL21(DE3)pLysS kompetente Zellen .....	59
3.4.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	59
3.4.8.4 Plasmidpräparation mit dem Plasmidreinigungs kit nach SeqLab .....	60
3.4.8.5 Mini Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung.....	60
3.4.8.6 Midi Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung.....	61
3.4.9 Aufreinigung von PCR Fragmenten .....	61
3.4.10 Sequenzierung.....	62

<b>3.5 Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>62</b>
3.5.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen und Klonen .....	62
3.5.2 Proteinextraktion aus <i>E. coli</i> Expressionsstämmen .....	62
3.5.3 SDS - Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen.....	63
3.5.4 Aufreinigung der exprimierten Proteine über eine Nickel – Chelataffinitätschromatographie Säule .....	65
3.5.5 Gehaltsbestimmung von Proteinen nach einer modifizierten Methode nach Bradford .....	66
<b>3.6 Western Blot .....</b>	<b>67</b>
3.6.1 Detektion.....	67
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Biochemische Untersuchungen durch Inhibitionsexperimente mit den <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen NF54, Dd2 und R .....</b>	<b>69</b>
4.1.1 Der Effekt des Spermidinsynthese Inhibitors Dicyclohexylamin auf Entwicklungsstadien von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	69
4.1.2 Supplementation von exogenem Spermidin nach der Inhibition mit Dicyclohexylamin .....	71
4.1.3 Die inhibitorische Wirkung von 1,7-Diaminoheptan auf das Wachstum und die Vermehrung der <i>Plasmodium falciparum</i> Stämme NF54 und R .....	73
4.1.4 Untersuchungen zum inhibitorische Effekt von Agmatin auf das Wachstum und die Vermehrung der <i>Plasmodium falciparum</i> Stämme NF54 und R .....	75
4.1.5 Bestimmung des intrazellulären Spermidin Gehalts des <i>Plasmodium falciparum</i> R- Stammes und des NF54 - Stammes nach der Inhibition mit Dicyclohexylamin, 1,7-Diaminoheptan und Agmatin.....	77
4.1.6 Der Nachweis von Homospermidin in den <i>P. falciparum</i> Stämmen NF54 und R durch GC/MS Analyse.....	78
4.1.7 Der inhibitorische Effekt des Polyamin Inhibitors Agmatin auf das Wachstum von verschiedenen <i>P. falciparum</i> Stämmen im Vergleich zu Artemisinin, Triclosan und Chloroquin .....	79

4.1.8 Die inhibitorische Wirkung von Agmatin im Vergleich zu Artemisinin, Chloroquin und Triclosan auf die erythrozytären Entwicklungsstadien der Chloroquin-resistenten Stämme Dd2 und R und des Chloroquin-sensitiven <i>P. falciparum</i> Stammes NF54 .....	83
<b>4.2 Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Chemotherapeutika wie Artemisinin, Triclosan und Chloroquin und des Polyaminbiosyntheseinhibitors Agmatin auf die RNA Biosynthese der <i>P. falciparum</i> Stämme NF54, Dd2 und R .....</b>	<b>86</b>
<b>4.3 Isolierung, Sequenzierung und Analyse einer Deoxyhypusinsynthase/ Homospermidinsynthase (DHS/HSS) codierenden Genregion aus <i>P. falciparum</i> .....</b>	<b>88</b>
4.3.1 Amplifikation einer DHS/HSS codierenden Partialsequenz aus der genomischen DNA der <i>P. falciparum</i> Stämme NF54, Dd2 und R.....	88
4.3.2 Aminosäuresequenz Vergleich der erhaltenen Partialsequenzen des NF54, Dd2 und R-Stammes .....	90
4.3.3 Ein Vergleich der Substratbindungsstelle des Spermidins und der NAD Bindungsstelle der Deoxyhypusinsynthase (DHS) des Menschen, der parasitären DHS aus dem <i>P. falciparum</i> Dd2 - Stamm und aus <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> , und der pflanzlichen Homospermidinsynthase (HSS) aus <i>Senecio vulgaris</i> .....	92
4.3.4 Amplifikation des Fulllength - Klons der DHS/HSS codierenden Sequenz aus der genomischen DNA des <i>P. falciparum</i> NF54 - Stammes ...	95
4.3.5 Überexpression der DHS/HSS codierenden Sequenz aus dem <i>P. falciparum</i> Stamm NF54 im pET15b Expressionsvektor und Nachweis des DHS/HSS Proteins nach Transformation in BL21(DE3)plysS kompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	96
4.3.6 Aufreinigung des exprimierten HSS/DHS Proteins aus <i>P. falciparum</i> mittels einer Nickel-Chelataffinitätschromatographie .....	97
4.3.7 Untersuchung zur Kreuzreaktion zwischen dem DHS/HSS Protein aus <i>P. falciparum</i> und einem polyklonalen Antikörper gegen das menschliche DHS Protein .....	99

<b>4.4 Isolierung, Sequenzierung und Analyse einer eIF5A codierenden Genregion aus <i>P. vivax</i>.....</b>	<b>100</b>
4.4.1 Klonierung einer eIF5A codierenden Sequenz aus <i>P. vivax</i> durch Amplifikation und Überexpression in einen pET15b Expressionsvektor .....	100
4.4.2 Expression und Nachweis des eIF5A Proteins nach Transformation in BL21(DE3)plysS kompetente <i>E. coli</i> Zellen .....	103
4.4.3 Aufreinigung des exprimierten eIF5A Proteins aus <i>P. vivax</i> mittels einer Nickel-Chelataffinitätschromatographie .....	104
4.4.4 Western Blot Experimente mit dem eIF5A Protein aus <i>P. vivax</i> und einem polyklonalen Antikörper gegen das homologe NeIF-5A Protein aus <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (Solanaceae) .....	105
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>106</b>
<b>5.1 Das Vorkommen von Spermidin metabolisierenden Enzymen in Chloroquin-sensitiven und - resistenten <i>Plasmodium falciparum</i> Stämmen.....</b>	<b>107</b>
<b>5.2 Der Einfluss von Agmatin im Vergleich zu Triclosan, Artemisinin und Chloroquin auf Chloroquin - resistente und Chloroquin - sensitive <i>P. falciparum</i> Stämme .....</b>	<b>111</b>
<b>5.3 Der Effekt von Agmatin, Triclosan, Artemisinin und Chloroquin auf die RNA Biosynthese der <i>P. falciparum</i> Stämme NF54, Dd2 und R.....</b>	<b>113</b>
<b>5.4 Isolierung und Expression des DHS/HSS Gens aus <i>P. falciparum</i> und Analyse der Spermidin und NAD Bindungsstellen .....</b>	<b>114</b>
<b>5.5 Isolierung und Analyse des eukaryontischen Translations- initiationsfaktor 5A aus <i>P. vivax</i>.....</b>	<b>120</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>123</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>125</b>

---

<b>8. ANHANG.....</b>	<b>141</b>
8.1 Inhibitorexperimente mit Artemisinin; Einfluss auf die Entwicklungsstadien.....	141
8.2 Inhibitorexperimente mit Agmatin; Einfluss auf die Entwicklungsstadien.....	142
8.3 Inhibitorexperimente mit Triclosan; Einfluss auf die Entwicklungsstadien.....	143
8.4 Inhibitorexperimente mit Chloroquin; Einfluss auf die Entwicklungsstadien.....	144
8.5 Inhibitorexperimente mit 100µM Artemisinin .....	145
8.6 Inhibitorexperimente mit Agmatin .....	145
8.7 Inhibitorexperimente mit 2µM Triclosan.....	145
8.8 Inhibitorexperimente mit 10 <sup>-8</sup> mM Chloroquin.....	145
8.9 Inhibitorexperimente mit DCA und nachfolgender Supplementation mit Spermidin (Parasitämie in %)......	146
8.10 Eingesetzte Plasmodien Stämme und Inhibitorkonzentrationen.....	147

## 1. Einleitung

Malaria hatte vermutlich einen größeren Einfluss auf die Weltgeschichte als irgendeine andere infektiöse Krankheit. Die parasitäre Erkrankung war verantwortlich für den Verlauf und das Ergebnis von Kriegen, Bevölkerungsbewegungen und das Wachstum und die Entwicklung von verschiedenen Nationen in der ganzen Welt. Von den vier humanpathogenen Spezies, sind *Plasmodium vivax* und *Plasmodium falciparum* für 95% der Infektionen verantwortlich. Nach *P. falciparum* ist *P. vivax* der zweitwichtigste Malaria Erreger. 80% der Malaria Infektionen in Asien und 15% in Afrika sind bedingt durch *Plasmodium vivax*. Das Vorkommen von *P. falciparum* ist generell beschränkt auf die Tropen, *Plasmodium malariae* ist nur sporadisch verbreitet und *Plasmodium ovale* ist hauptsächlich in Zentral Westafrika und auf manchen Süd Pazifischen Inseln zu finden. Neusten Berichten der WHO (WHO Report, 2004) zufolge wird das Vorkommen dieser Krankheit auf 300 bis 500 Millionen klinische Fälle pro Jahr geschätzt. Mehr als eine Million Menschen (WHO Report, 2002) sterben an dieser Erkrankung im Jahr. Die meisten Todesfälle betreffen Kinder. Die afrikanischen Länder, in denen 90% der Malaria Fälle vorkommen, sind durch Kriege verwüstet und die Industrie Nationen die für den größten Teil der Malaria Forschung aufkommen, investieren nicht mehr in Forschung und Entwicklungskosten neuer Medikamente. Die Malaria Prophylaxe ist kostspielig und es gibt fast kein Medikament, gegen das Plasmodien keine Resistenzen entwickelt haben.

Versuche die Malaria zu kontrollieren basieren auf zwei verschiedenen Ansatzpunkten. Zum einen kontrolliert man die Vermehrung des Vektors, die *Anopheles* Mücke, zum anderen den Parasiten. Um den Vektor zu bekämpfen werden zum Beispiel Insektizid behandelte Plastiklaken und Mosquito Netze eingesetzt (Guyatt *et al.*, 2004). Diese Maßnahmen sind kostengünstig und sehr effektiv, aber sie können die Malaria nicht vollständig eindämmen.

Ein weitaus kritischer Ansatz ist die Resistenz gegen Chemotherapeutika durch den Malariaparasiten. Auch die Entwicklung einer Malaria Vakzine stagniert mittlerweile, bedingt durch nur mäßige Erfolge. Die Gründe dafür sind zum einen die kurze Wirksamkeit, da die Protektion nur ca. 6 Monate anhält und zum anderen, dass die Impfstoffe nur gegen bestimmte Entwicklungsstadien wirksam sind.

Ein Beispiel dafür ist die Circumsporozoite Protein (CSP) Vakzine, trotz anfänglichen ermutenden Ergebnissen, wurde eine Vielzahl von zusätzlichen Studien über einen Zeitraum von 10 Jahren durchgeführt, die in ernüchternden Ergebnissen resultierten (Anders und Saul, 2000). GlaxoSmithKline's Impfstoff RTS,S/AS02A, eine Kombination der immunisierenden Bestandteile des Circumsporozoite Proteins mit Oberflächenantigen der Hepatitis B, und einem eigenen Adjuvant, erzielte eine 58% Wirksamkeit gegen die gefährliche Erkrankung in 1 bis 5-Jahre-alten Kindern in einem Phase IIb Versuch in Mosambik (Walgate, 2004). Die protektive Wirksamkeit gegen eine Infektion allerdings lag nur bei 30% (Walgate, 2004).

Aufgrund der erörterten Punkte sind neue Strategien in der Medikamentenentwicklung wichtig. Chloroquin (Resochin®), war bis vor kurzem das Standard Medikament für die Behandlung von Malaria, da es hoch wirksam ist, eine lange Halbwertszeit und geringe Toxizität besitzt und vor allem kostengünstig ist. Die Resistenz gegen Chloroquin stieg seit den 80iger Jahren stetig. Dies liegt an der mangelnden Aufnahme des Medikaments durch den Parasiten. Der Grund dafür sind Mutationen im Transportgen, wodurch der Wirkstoff wieder ausgeschleust wird (Pandey *et al.*, 1999). Halofantrin (Halfan®), wurde 1988 zugelassen. Allerdings ist das Medikament ziemlich toxisch und hat auch nur eine kurze Halbwertszeit und aufgrund von auftretenden Herzrhythmusstörungen ist das Medikament mittlerweile in Deutschland nicht mehr zugelassen.

Auch die Resistenz gegen neuere Chemotherapeutika, wie Pyrimethamin/ Sulfadoxin (Fansidar®), Proguanil, Doxycyclin und Mefloquin steigt kontinuierlich, mit der Folge, dass mehrere dieser Medikamente klinisch wertlos werden (Liu *et al.*, 1995). Seit Ende der 90iger Jahre steigt die Resistenz von Pyrimethamin/ Sulfadoxin (Fansidar®), dem Nachfolger von Chloroquin. Ein relativ kostengünstiges Medikament könnte Pyrimethamin/ Sulfadoxin (Fansidar®) in der Monotherapie ersetzen, Chlorproguanil-Dapson (Lapdap) (Whitty *et al.*, 2004). Das Medikament ist momentan wirksam in Gegenden mit Pyrimethamin/ Sulfadoxin (Fansidar®) Resistenzen, allerdings wird dies vermutlich nicht mehr lange der Fall sein.

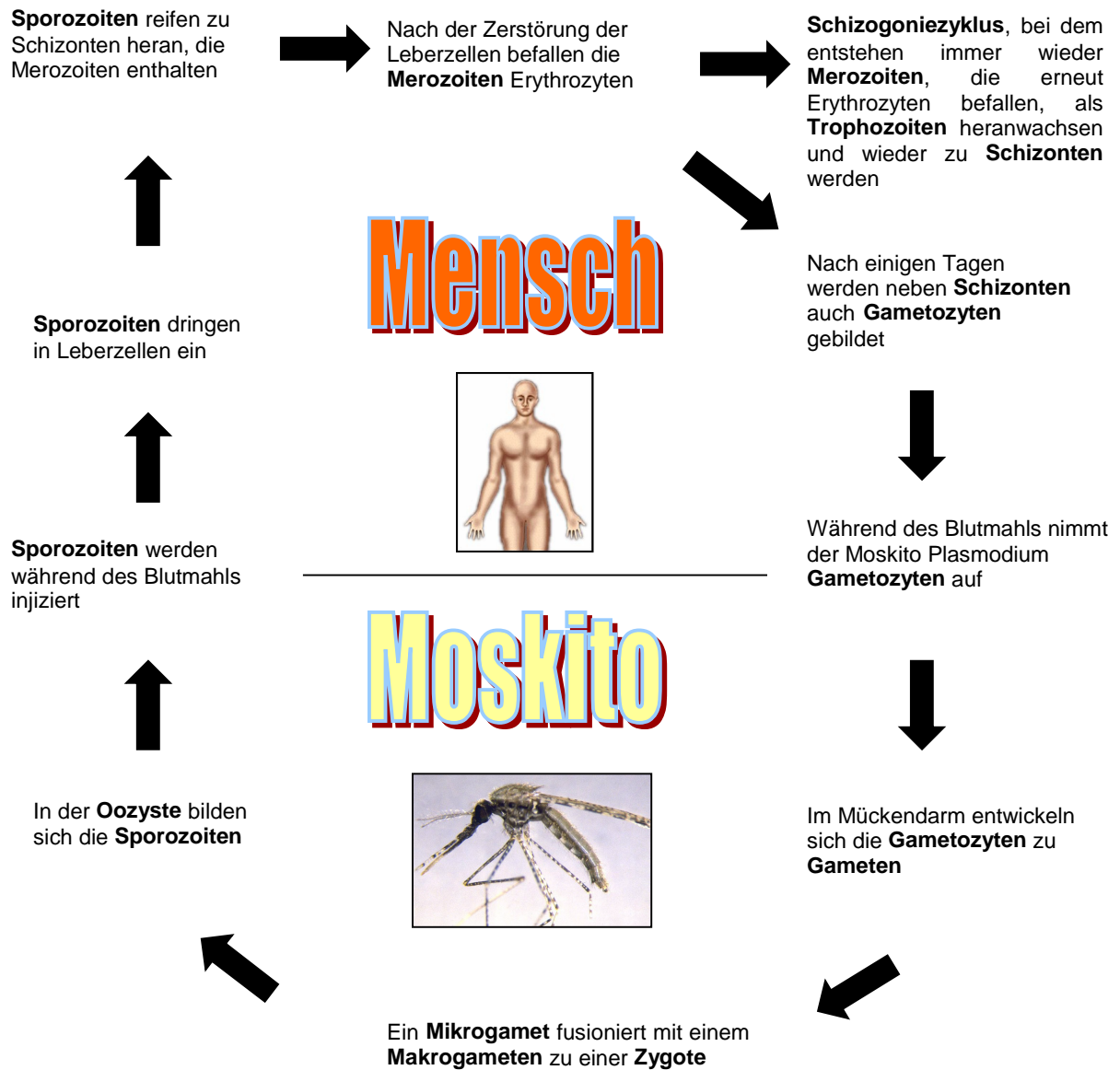
Ein neuer Ansatz sind Kombinationspräparate. Eine informelle Experten Runde der WHO im Jahre 2001 unterstützte die bislang allgemein gezogenen Schlüsse, dass mit Blick in die Zukunft, Kombinationspräparate die einzige, langanhaltende Lösung sind, um Resistenzen entgegenzuwirken (WHO Technical Consultation, 2001). Nach Meinung der Experten Runde, haben drei Artemisinin- und ein

Pyrimethamin/Sulfadoxin Kombinationsmedikament das größte Potential in der Bekämpfung der Malaria, wenn man von den Kosten absieht. Die Artemisinin Kombinations Medikamente sind Lumefantrin-Artemether (Riamet ®), Amodiaquin-Artesunat und Pyrimethamin/ Sulfadoxin- Artesunat. Der Vorteil von Artemisinin ist, dass bislang noch keine Resistenzen gegen den Wirkstoff aufgetreten sind. Das nicht auf Artemisinin basierende Kombinationspräparat ist Pyrimethamin/Sulfadoxin - Amodiaquin. Ein weiteres neues Kombinationspräparat ist Malarone ®, es basiert auf Atovaquon und Proguanil. Auch wenn die Resistenz gegen Atovaquon stetig zunimmt, wird dies verlangsamt, wenn es mit einem anderen Medikament kombiniert wird, wie zum Beispiel mit Proguanil (Looareesuwan, 1996). Allerdings ist das Medikament sehr teuer und somit nicht für eine weitverbreitete Verabreichung geeignet.

### **1.1 Lebenszyklus der Malaria Erreger *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax***

Der Entwicklungszyklus aller Malariaparasiten unterteilt sich in einen geschlechtlichen Zyklus, der in der Anophelesmücke stattfindet, und einen ungeschlechtlichen Zyklus, der im Menschen abläuft (Abb. 1.1).

Beim Stich der Anophelesmücke werden die humanpathogenen Sporoziten mit dem Speicheldrüsensekret in die Blutbahn injiziert. Mit dem Blut gelangen sie nach kurzer Zeit in die Leber, wo sie über die Kupferzellen (speziellen Leber – Makrophagen) in die Leberzellen eindringen. In der Leber reifen die Sporoziten zu Schizonten heran. Bei *Plasmodium falciparum* entwickeln sich alle Schizonten in den Leberzellen zu reifen Zellen, die Merozoiten enthalten. In der präerythrozytären Schizogonie entstehen tausende solcher Merozoiten, die nach Zerstörung der Leberzelle Erythrozyten befallen. Es beginnt erneut ein Schizogoniezyklus, der über lange Zeit zyklisch ablaufen kann. Dabei entstehen immer wieder Merozoiten, die erneut Erythrozyten befallen. Sie wachsen zu Trophozoiten heran und werden wieder zu Schizonten. Zum Eindringen in die roten Blutkörperchen wird der apikale Komplex benötigt. Die Zellmembran der von *P. falciparum* befallenen Erythrozyten enthält charakteristische Einschlüsse. Diese Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der Erythrozyten durch sogenannte „knobs“ führt dazu, dass sie an den Kapillarwänden haften bleiben und einen Verschluss des betreffenden Gefäßes verursachen. Bei der cerebralen Verlaufsform kann es durch den Verschluss von Kapillaren im Gehirn, zum Koma und auch dem Tod führen.



1.1 Abbildung: Der Lebenszyklus von *Plasmodium* Spezies. Bei *P. vivax* reifen nicht alle Sporozoiten zu Trophozoiten heran, manche werden zu Hypnozoiten, präerythrozytären Dauerstadien in der Leber.

Bei *P. vivax* tritt keine cerebrale Verlaufsform auf. Die Besonderheit im Zyklus von *Plasmodium vivax* im Gegensatz zu dem von *Plasmodium falciparum* allerdings ist das Auftreten von Hypnozoiten (präerythrozytären Dauerstadien in der Leber), die 1-3 Jahre, in einer Art Ruhephase, in der Leber überleben können und dann Rückfälle, Rezidive, verursachen.

Der geschlechtliche Zyklus verläuft bei allen Malariaparasiten auf die gleiche Art. Nach einigen Tagen werden neben Schizonten auch Gamonten gebildet, die sich aber nur im Mückendarm zu Gameten weiterentwickeln können. Dazu muss die Anophelesmücke bei einem Saugakt die Gametozyten, von einem infizierten Menschen aufnehmen. Aus dem Mikrogametozyten werden mehrere Mikrogameten, von denen einer mit einem Makrogameten zur Zygote fusioniert. Die Zygote wandert als Ookinet durch die Darmwand und wird zur Oozyste. Aus dieser werden die Sporozoiten gebildet. Die Sporozoiten gelangen dann über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen und können beim nächsten Stich wieder injiziert werden.

## 1.2 Molekulares Targeting

Ein Ansatz in der Findung neuer Wirkstoffe stellt das „molekulare Targeting“ dar. Darunter versteht man Gene oder Enzyme, die für den Parasiten im Idealfall essenziell sind, zu isolieren und gezielt durch Hemmstoffe zu inhibieren. Weiterhin können aber auch Stoffwechselwege interessant sein, die in menschlichen und parasitären Zellen vorkommen, deren Gene oder Enzyme sich aber strukturell unterscheiden. Ein Beispiel für Stoffwechselwege, die nur in Parasiten vorkommen sind die alternative Fettsäurebiosynthese II und der alternative Isoprenoidbiogeneseweg. Ein Beispiel für einen Stoffwechselweg, der sowohl im Menschen als auch im Parasiten vorkommt ist die Polyaminbiosynthese.

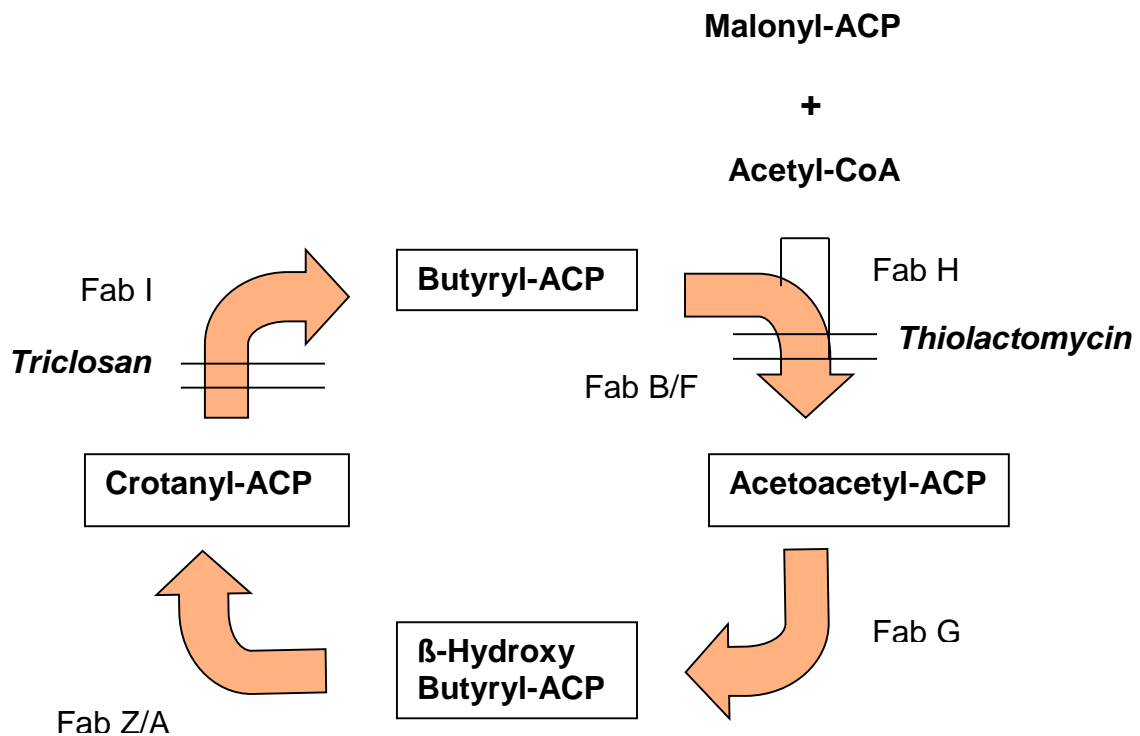
### 1.2.1 Die alternative Fettsäurebiosynthese II in *Plasmodium falciparum*

Es wurde lange Zeit angenommen, dass Plasmodien nicht in der Lage sind, Fettsäuren selbst zu synthetisieren, sondern diese aus den Erythrozyten und dem Serum ihres Wirts bekommen (Waller *et al.*, 2003). Jedoch ist es in jüngster Zeit indischen Forschern gelungen, die *de novo* Synthese von Fettsäuren, eine alternative Fettsäurebiosynthese, im Malariaerreger *P. falciparum* nachzuweisen (Surolia und Surolia, 2001). Das regulatorisch wirksame Enzym der Fettsäurebiosynthese, die Enoyl-ACP-Reduktase stellt inzwischen ein „molekulares Target“ dar (Abb. 1.2). Das Gen, das die Enoyl-ACP-Reduktase kodiert, liegt auf dem Apikoplasten Genom.

Indischen Forschern (Surolia und Surolia, 2001) gelang es die Fettsäurebiosynthese des Parasiten, durch selektive Hemmung des Schlüsselenzyms der Enoyl-ACP-Reduktase, durch den Hemmstoff Triclosan (5 Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)phenol) selektiv auszuschalten. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Fettsäurebiosynthese (FAS) des Parasiten als Typ II FAS klassifiziert werden, denn Triclosan inhibiert nicht den Typ I FAS (Surolia und Surolia, 2002). Diese Tatsache macht den Wirkstoff, der seit langem in der Pharmazie als Desinfektionsmittel und Antiseptikum aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung bekannt ist, sehr wertvoll. Triclosan ist auch in hohen Dosen nicht toxisch für den Menschen.

Die Typ I Fettsäurebiosynthese (FAS) findet man im Zytosol von Eukaryonten, wie bereits erwähnt im Menschen, aber auch in Pilzen und manchen Mykobakterien. Die Typ II FAS dagegen ist unter Bakterien weitverbreitet. In Eukaryonten beschränkt sich das Vorkommen der Typ II FAS auf Plastide von Pflanzen und Algen (Harwood, 1996). Außerdem wird vermutet, dass der Typ II vielleicht auch in den Mitochondrien von Hefe vorkommt (Schneider *et al.*, 1997). In Malariaparasiten liegt der gesamte Typ II FAS in den Plastiden.

Die *de novo* Synthese geradzahliger, gesättigter Fettsäuren verläuft in Malariaparasiten ausgehend von Malonyl-ACP (Malonyl-Acyl-Carrier-Protein) und Acetyl-CoA (Abb.1.2) unter Bildung von Acetoacetyl-CoA am Acyl-Carrier Protein. Zwei wichtige Enzyme im Typ II FAS Zyklus sind das Enzym  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase III (Fab H), welches am Anfang der Fettsäurebiosynthese steht und die Enoyl-ACP-Reduktase (Fab I) (Surolia und Surolia, 2002). Die Enoyl-ACP-Reduktase katalysiert den letzten Schritt im Verlängerungszyklus der Fettsäurebiosynthese und reduziert eine Carbon-Carbon Doppelbindung der Enoyl Einheit, die kovalent mit einem Acetyl Transport Protein verbunden ist (Kapoor *et al.*, 2004). Der Typ II FAS besteht aus einzelnen Enzymen, die den Stoffwechselweg katalysieren. Der Typ I dagegen besteht aus einem Multi-Enzym-Komplex, einer Polypeptidkette. Durch Hemmung der Enoyl-ACP-Reduktase konnte der Fettsäure Typ II Biosyntheseweg eindeutig gehemmt werden. Die Ähnlichkeit der Enoyl-ACP-Reduktase zu dem homologen Enzym der Pflanze *Brassica napus*, sowie vor allem das Vorkommen plastidärer Sequenzen deutet auf eine plastidäre Herkunft des Enzyms hin (Bhat und Surolia, 2001).



1.2 **Abbildung:** Die Fettsäurebiosynthese im Apikoplasten von *P. falciparum*. Ausgangsbausteine sind Malonyl-ACP (Acyl Carrier Protein) und Acetyl-CoA. Der erste Reaktionsschritt zum Acetoacetyl-CoA am ACP wird durch die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase III katalysiert. Das Antibiotikum Thiolactomycin inhibiert das Wachstum von *P. falciparum* ebenfalls durch Hemmung der FAS, vermutlich durch Inhibition des *fabH* Genproduktes. Die als *fabB/F* und *fabG* bezeichneten Gene konnten bislang nicht aus *P. falciparum* isoliert werden. Für *fabH* und *fabZ/A* wurden inzwischen die codierenden Genregionen kloniert (Legende: Kaiser *et. al.*, 2001 b).

Beeson *et al.*, (2001) konnten in ihren Experimenten zeigen, dass 2  $\mu$ M Triclosan zu einer 50fachen Inhibition der Enzym Aktivität führte. In *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* führten 2  $\mu$ M Triclosan zu einer 50% Hemmung des Wachstums des Malariaparasiten (Surolia und Surolia, 2001). *In vivo* Experimente mit einem *Plasmodium berghei* Maus Model zeigten, dass durch eine einmalige Injektion von 3mg/kg Körpergewicht Triclosan die Parasitämie um 75 – 80 % reduziert wurde. Diese vorangegangenen Experimente, deuten darauf hin, dass Triclosan ein vielversprechendes Medikament für die Behandlung der Malaria werden könnte. Dieses Beispiel veranschaulicht den Ansatz des „Molekularen Targetings“.

Aufgrund der unterschiedlichen Fettsäurebiosynthesewege des Parasiten und der seines menschlichen Wirts, ist eine Grundlage für die selektive Hemmung und somit die Inhibition des Parasiten geschaffen.

### 1.2.2 Der alternative Isoprenoidweg in *Plasmodium falciparum*

Jomaa *et al.* (1999) konnten einen von Mevalonat unabhängigen Isoprenoidweg in *P. falciparum* nachweisen. Dieser Stoffwechselweg kommt im Menschen nicht vor. Isoprenoide Verbindungen spielen in allen lebenden Organismen eine wesentliche Rolle, beispielsweise als Steroidhormone in Menschen, als Carotinoide in Pflanzen und als Ubichinone (CoenzymQ) und Menchinone (Vitamin K<sub>2</sub>) in Bakterien. Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat, dem Grundgerüst aller Isoprenoide, ausschließlich über den Mevalonatweg führte (Banthorpe *et al.*, 1972/ Beyia und Porter, 1976). Viel später gelang es verschiedenen Wissenschaftlern in Eubakterien (Takahashi *et al.*, 1998), in Grünalgen (Schwender *et al.*, 1996) und in Chloroplasten höherer Pflanzen (Lichtenthaler *et al.*, 1997) einen von der Mevalonsäure unabhängigen Weg des Isoprens durch [<sup>14</sup>C] Einbau nachzuweisen.

Ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird unter der Katalyse der DOXP-Synthase 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat (DOXP) gebildet. DOXP ist nicht nur ein Intermediat in der Biosynthese des Isoprens, sondern auch beteiligt an der Biosynthese von Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) und Pyridoxol (Vitamin B<sub>6</sub>) in *Escherichia coli*. Zur Vitamin B<sub>6</sub> Gruppe gehören drei Stoffe: Pyridoxol, Pyridoxal und Pyridoxamin. In einem zweiten Reaktionsschritt wird Isopentenylidiphosphat aus DOXP, über das Zwischenprodukt 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat, unter der Katalyse der DOXP-Reduktoisomerase, gebildet. 1999 konnten die codierenden Gene der DOXP-Reduktoisomerase und DOXP Synthase von Jomaa *et al.*, aus *P. falciparum* isoliert werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine alternativ verlaufende Isoprenoid Biosynthese in *P. falciparum* existiert. Dieser Stoffwechselweg ist nachweislich im Apikoplasten des Parasiten lokalisiert.

Inhibitorexperimente von Jomaa *et al.*, (1999) mit dem Antibiotikum Fosmidomycin und einem Derivat von Fosmidomycin zeigten, dass diese Wirkstoffe die DOXP Reduktoisomerase von Pyrimethamin- und Chloroquin-resistenten *P. falciparum* Stämmen in *in vitro* Kulturen hemmen. Auch ein *in vivo* Modell mit *Plasmodium vinckei* infizierten Mäusen bestätigte die Wirksamkeit von Fosmidomycin.

Fünf Tage nach einer intraperitoneal verabreichten Dosis von 10 – 100mg/kg Körpergewicht waren die Mäuse frei von Parasiten. Neusten Ergebnissen von Kuntz *et al.* (2004) zufolge, konnten zwei neue Inhibitoren der DOXP Reduktoisomerase, 4-(Hydroxyamino) - 4-Oxobutylphosphonische Säure und 4-[Hydroxy(methyl)amino]-4-Oxobutyl phosphonische Säure, synthetisiert werden. Die Effektivität dieser Inhibitoren wurde im Vergleich zu Fosmidomycin getestet. 4-[Hydroxy(methyl)amino]-4-Oxobutyl phosphonische Säure wies eine vergleichbare inhibitorische Wirkung gegen die DOXP Reduktoisomerase wie auch Fosmidomycin auf.

### **1.2.3 Der Polyaminstoffwechselweg und regulatorisch wichtige Gene der Polyaminbiosynthese aus *Plasmodium falciparum***

Einen potenziellen Angriffspunkt für das “molekulare Targeting“ stellen auch regulatorisch wichtige Gene der Polyaminbiosynthese dar. Spermidin, Putrescin und Spermin, sind polykationische Verbindungen, welche in allen lebenden Zellen existieren. Der Einsatz von Inhibitoren, die spezifisch regulatorisch wichtige Enzyme der Polyaminbiosynthese erkennen, hat bislang einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der Behandlung von parasitären Erkrankungen gezeigt. Zwar kommt im Vergleich zu den bisher genannten Beispielen im Menschen auch eine Polyaminbiosynthese vor, jedoch unterschieden sich die bislang isolierten Gene signifikant von den menschlichen.

Polyamine haben in Eukaryonten eine wesentliche Funktion bei der Zellteilung und Proliferation (Cohen, 1998). Auch in Plasmodien sind die Polyamine Spermidin und Putrescin an der Regulation des Vermehrungszyklus entscheidend beteiligt (Wright *et al.*, 1991). In Experimenten von Chandra *et al.* (1997) konnte anhand von infizierten Mäusen mit *Plasmodium berghei* gezeigt werden, dass nach dem Befall der Erythrozyten durch Plasmodien der Gehalt an Putrescin und insbesondere Spermidin anstieg.

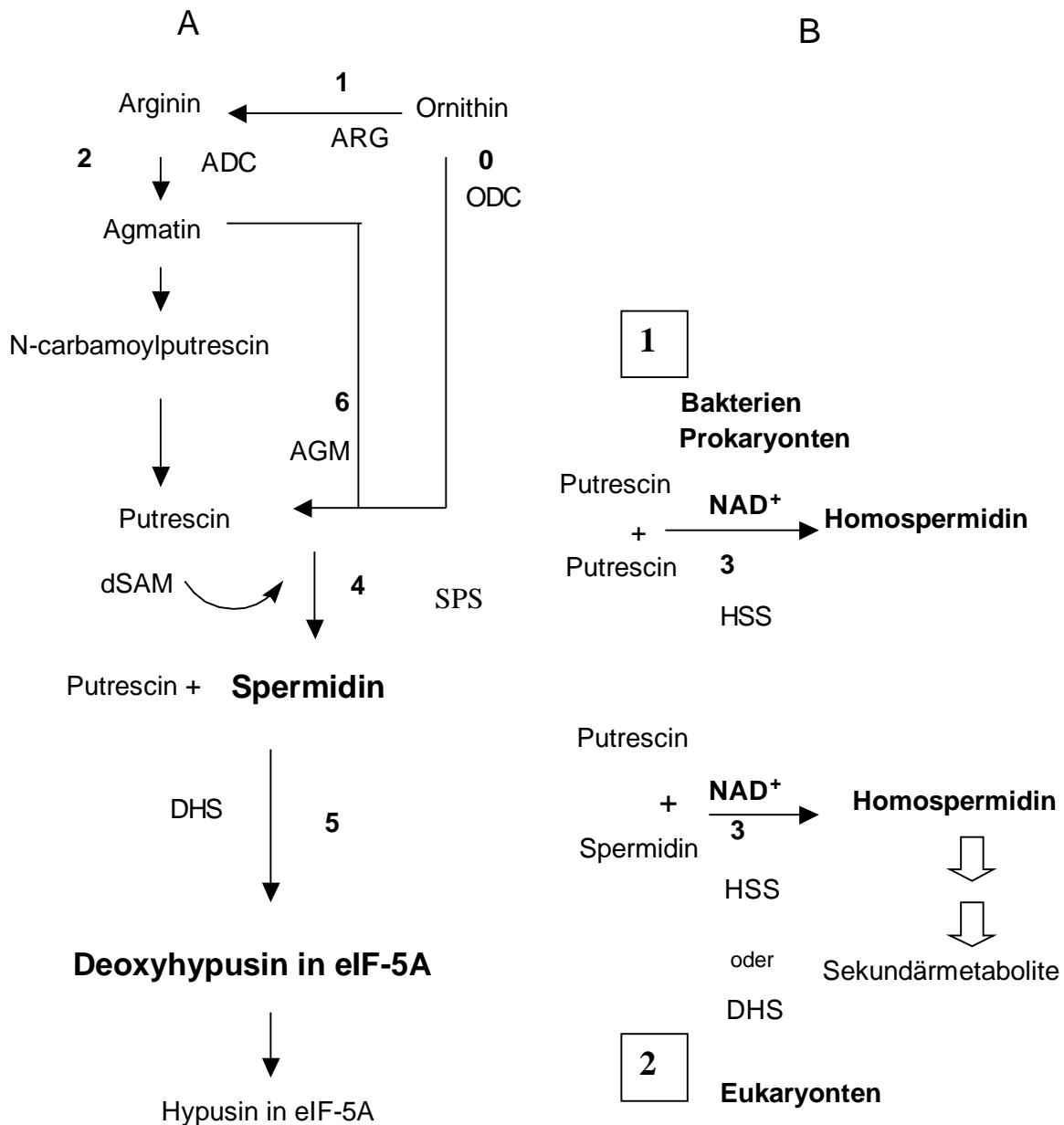
Polyamine werden in Eukaryonten aus Ornithin oder Arginin unter Katalyse der Ornithindecaboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) bzw. der Arginindecaboxylase (ADC) gebildet (Cohen, 1998) (Abb. 1.3). Dabei entsteht Putrescin. Durch den Transfer einer Aminopropyleinheit von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin auf Putrescin, unter Katalyse der Spermidinsynthese (SPS, EC 2.5.1.16) entsteht das Triamin Spermidin. Die Ornithindecaboxylase (Müller *et al.*, 2000) sowie die Spermidinsynthese (Luersen *et al.*, 2000) wurden inzwischen aus

*P. falciparum* kloniert. Alle bislang isolierten SPS Gene aus Prokaryonten und Eukaryonten zeigen eine hohe Konserviertheit insbesondere im Bereich der Bindungsstelle für decarboxyliertes S-Adenosylmethionin (Hamasaki-Katagiri *et al.*, 1997). Zum Beispiel beträgt die Sequenzidentität auf der Aminosäureebene zwischen der menschlichen SPS und der SPS aus *P. falciparum* 42%. Allerdings sind es die strukturellen Unterschiede der zwei SPS, die das Enzym zu einem „molekularen Target“ machen.

Eine entscheidende Rolle nimmt das Triamin Spermidin (Mono-N-3-aminopropyl-1,4 diaminobutan) ein (Hamasaki-Katagiri *et al.*, 1997). Es stellt in höheren Pflanzen ein wichtiges Substrat der Homospermidinsynthese (E.C. 2.5.1.44) und der Deoxyhypusinsynthese (E.C. 1.14.9929) dar. Bei der Deoxyhypusinsynthese (DHS) handelt es sich um ein Enzym, das die Übertragung einer Aminobutyleinheit des Spermidins, in einer NAD<sup>+</sup> abhängigen Reaktion, auf die Aminosäure Lysin (Position 51) im eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF-5A überträgt. Es entsteht dabei das deoxyhypusinylierte Zwischenprodukt von eIF5A. Das Vorhandensein einer *dhs* codierenden Sequenz im Malariaparasiten wurde bereits im Rahmen der Genomsequenzierung des Parasiten für den *P. falciparum* Stamm Dd2 (Molitor, *et al.*, 2000) und später von Gardner *et al.*, (2002) für den *P. falciparum* Stamm 3D7 gezeigt.

Spermidin kann zu Hypusin und Homospermidin metabolisiert werden. Nach der Bildung von Deoxyhypusin folgt ein zweiter Schritt bei dem durch die Deoxyhypusinhydroxylase (DHH) durch Hydroxylierung der hypusinylierte Translationsinitiationsfaktor eIF-5A aktiviert wird.

Der Reaktionsmechanismus der Homospermidinsynthese (HSS) ist dem der Deoxyhypusinsynthese ähnlich. In Eukaryonten wird in einer NAD<sup>+</sup> abhängigen Reaktion eine Aminobutyleinheit des Spermidins auf Putrescin übertragen. Erste Klonierungsexperimente einer pflanzlichen HSS aus *Senecio vulgaris*, zeigten dass sich die pflanzliche HSS sich aus der DHS rekrutiert (Kaiser, 1999b). Dies ist sicherlich durch die Ähnlichkeit des Reaktionsmechanismus beider Enzyme begründet. Die codierende *dhs* Sequenz aus *P. falciparum* zeigt nach einem Datenbankvergleich eine 73% Homologie zur pflanzlichen HSS aus *Senecio vulgaris* (Asteraceae) im Bereich der Aminosäurepositionen 292 – 346.



1.3 Abbildung: A. Polyaminbiosynthese in Bakterien, Pflanzen und Säugetieren. Zwei verschiedene Biosynthesewege existieren für die Biosynthese von Putrescin in Bakterien, Pflanzen und Säugetieren, d.h. ein Stoffwechselweg führt über Arginin und einer über Ornithin. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in Eukaryonten Agmatin durch Agmatinase Putrescin bilden kann. 0. Ornithindecaboxylase (ODC), 1. Arginase (ARG), 2. Arginindecaboxylase (ADC), 3. Homospermidinsynthase (HSS), 4. Spermidinsynthase (SDS), 5. Deoxyhypusinsynthase (DHS), 6. Agmatinase (AGM). Die Biosynthese von Putrescin zu Homospermidin katalysiert durch die Homospermidinsynthase (HSS) ist in dem rechten Teil der Abbildung unter B(3) zu sehen. B. Zwei verschiedene Stoffwechselwege die zu der Bildung des Homospermidins führen existieren in Bakterien, Viren **1** und Säugetieren **2**. Biosynthese Vorstufen sind zwei Mol Putrescin in Bakterien und Viren **1** und Spermidin in Eukaryonten **2**. Die Bildung des Homospermidins kann durch die DHS oder HSS in Eukaryonten katalysiert werden (Kaiser *et.al.*, 2003b).

Das Vorhandensein einer Homospermidinsynthese war auch für Plasmodien zu vermuten. Bislang wurde eine HSS codierende Sequenz auch in dem Parasiten *Leishmania major* gefunden. Zwei Nukleinsäuresequenzen in „Genbank“ weisen eine hohe Homologie zur Homospermidinsynthese (HSS) auf. Die eine Nukleinsäuresequenz zeigt eine hohe Homologie (57 %) zur bakteriellen HSS aus *Rhodopseudomonas viridis*, und die andere Nukleinsäuresequenz weist eine hohe Homologie zum 5`Ende der *hss* codierenden cDNA aus *Senecio vulgaris* (Asteraceae) auf. Möglicherweise liegt eine solche Situation auch für den Malariaparasiten vor.

Inzwischen konnten im Rahmen der Genomsequenzierung auch *hss* codierende Gene aus Reis (*Oryza sativa*, Michalowski, 2000), aus dem Purpurbakterium *Rhodopseudomonas viridis* (Tholl *et al.*, 1996) und aus einem die Grünalge *Chlorella* infizierenden Virus (PBCV-1) (Kaiser *et al.*, 1999a) isoliert werden. Die beiden letzteren weisen allerdings keine Sequenzhomologie zu den bislang charakterisierten eukaryontischen *hss* Genen auf.

Ein Beispiel für die Entwicklung eines Chemotherapeutikums nach erfolgreichem „molekularem Targeting“ von einem Enzym des Polyaminstoffwechsels, ist Eflornithin. Eflornithin ist ein Medikament welches ein Schlüsselenzym der parasitären Polyaminbiosynthese, die Ornithindecaboxylase (ODC) hemmt. Es ist auch als DMFO oder DL- $\alpha$ -Difluoromethylornithin bekannt. Eflornithin weist unter anderem eine Wirkung auf Tumore in Tiermodellen und im Menschen (Griffin *et al.*, 1987) auf. Es ist wirksam gegenüber *Pneumocystis carinii* (Gilman *et al.*, 1987) und wird bei der Afrikanischen Schlafkrankheit, insbesondere bei Infektionen mit *Trypanosoma brucei gambiense*, erfolgreich zur Therapie eingesetzt. Die Effizienz von Eflornithin gegenüber *Trypanosoma brucei rhodesiense* ist limitiert, aufgrund der schnelleren „turnover“ Rate der ODC und somit der geringeren Empfindlichkeit des Parasiten (Iten *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu hat *T. b. gambiense* eine langsame „turnover“ Rate der ODC ( $t_{1/2} > 6$  Stunden, Heby *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass dies der Grund dafür ist, dass der Parasit empfindlicher auf das Chemotherapeutikum reagiert, als die menschlichen Zellen ( $t_{1/2} < 1$  Stunden, Heby *et al.*, 2003) (Bacchi *et al.*, 1980). Die C-terminale Region der menschlichen ODC scheint essenziell für die schnelle Degradierung des Proteins zu sein (Heby *et al.*, 2003). In der *T. brucei* ODC gibt es keine korrespondierende C-terminale Region. Der Abbau der Polyamine verursacht einen stagnierenden Zustand der Trypanosomen und eine sensible Reaktion als Immunantwort des Wirtes (Burri und Brun, 2002). Gegen die Amerikanische Schlafkrankheit kann das Medikament allerdings nicht eingesetzt werden,

da der Erreger *Trypanosoma cruzi* nicht über das ODC Gen verfügt (Persson *et al.*, 1992 / Kinch *et al.*, 1998).

Der Grund für die Stabilität der Ornithindecaboxylase wird auf die C-terminale Struktur des Proteins zurückgeführt (Phillips *et al.*, 1987). Das Medikament inhibiert die Ornithindecaboxylase und unterbricht somit die Polyaminbiosynthese. Assaraf *et al.* (1984) zeigten, dass DL- $\alpha$ -Difluoromethylornithin auch die ODC von *P. falciparum* irreversibel hemmt. Durch Einsatz dieses Inhibitors wurde die Umwandlung von Trophozoiten zu Schizonten verhindert. Die Autoren schlossen aus den erhaltenen Ergebnissen, dass die Hemmung dieses Schlüsselenzyms ein rationaler Ansatz für die Entwicklung von neuen Chemotherapeutika gegen Malaria sei.

1991 gelang es Wright *et al.*, durch den Einsatz eines kompetitiven Inhibitors der S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAMDC), dem Methylglyoxalbis (guanylhydrazon) (MGBG) und MDL 73811 (AbeAdo), einem irreversiblen Inhibitor und Strukturanalogen der SAMDC, das Wachstum von *P. falciparum* in *in vitro* Kulturen zu hemmen. Experimente auf der molekularen Ebene zeigten, dass die ODC und SAMDC Enzyme Bestandteile eines bifunktionalen Enzyms in *P. falciparum* sind (Müller *et al.*, 2000/ Wrenger *et al.*, 2001). Diese einzigartige Organisation der SAMDC und ODC stellt ein molekulares Target für die Entwicklung neuer Medikamente dar. Diese Beispiele von regulatorisch wichtigen Genen und Enzymen der Polyaminbiosynthese zeigen, dass der Ansatz des molekularen Targetings zur Entwicklung neuer Chemotherapeutika einen wichtigen Weg für die zukünftige Wirkstofffindung darstellt.

### **1.3 Der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A (eIF5A)**

Der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A (eIF5A) kommt ubiquitär in Eukaryonten und Archaeabakterien vor (Chen und Liu, 1997). EIF5A ist einzigartig aufgrund der Tatsache, dass dieser Faktor durch die posttranslationale Bildung der Aminosäure Hypusin aktiv wird. Dieser Prozess verläuft in zwei Schritten, zuerst wird unter der Katalyse der DHS eine Aminobutyleinheit von Spermidin in einer NAD<sup>+</sup> abhängigen Reaktion, auf die Aminosäure Lysin (Position 51) im eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor 5A übertragen. In einem zweiten Schritt unter der Katalyse der DHH wird der hypusinylierte Translationsinitiationsfaktor eIF-5A gebildet. Der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A ist ein hoch konserviertes Protein das in Eukaryonten und Archaeabakterien vorkommt. Zum Beispiel ist der menschliche eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A ein Protein bestehend aus

154 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 16,7 kDa (Sommer *et al.*, 2004). Eubakterien dagegen besitzen kein eIF5A Protein, aber ein entferntes Homolog den „elongation“ Faktor P (EF-P) (Kyrpides und Woese, 1998). Neuere Ergebnisse aber deuten daraufhin, dass Eubakterien Gene besitzen, die eine Homologie zu Deoxyhypusinsynthase Genen aufweisen (Brochier *et al.*, 2004).

Die Funktion des eIF5A ist trotz intensiver Forschung in den letzten drei Jahrzehnten, noch nicht vollständig geklärt. Das aktive eIF5A wird als zellulärer Cofaktor für die Funktion des HIV Typ I benötigt (Bevec *et al.*, 1997). Bei Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) führt ein Fehlen des Faktors zu einem sofortigen Stop des Zellwachstums, aber nur zu einer moderaten Hemmung der Proteinbiosynthese (Kang und Hershey, 1994). Es ist daher fragwürdig, ob die Initialisierung der Proteinbiosynthese die Hauptfunktion des Faktors ist. Weiterhin wird eIF5A eine mögliche Rolle als Shuttleprotein am Kernporenkomplex zur Ausschleusung bestimmter RNAs zugeschrieben (Rosorius *et al.*, 1999). Anderen Untersuchungen zufolge scheint das aktive eIF5A als spezifischer Faktor an der Expression einer Reihe von Genen beteiligt zu sein, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Park *et al.*, 1993), zum Beispiel sprechen neuere Untersuchungen dafür, dass der Faktor eine Rolle in der Expression von Proteinen in der G1-S Phase des Zellzyklus spielt (Jin *et al.*, 2003). Kürzlich konnten Caraglia *et al.*, (2003) zeigen, dass die Apoptose induziert durch Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) von eIF5A reguliert werden kann. Die Autoren fanden heraus, dass IFN $\alpha$  die Inhibition des Zellwachstums und die Apoptose in menschlichen epidermalen Krebszellen induzierte und dass diese Wirkung von EGF (epidermal growth factor/ Epidermaler Wachstumsfaktor) antagonisiert wird. Die Inhibition von eIF5A erfolgt bislang durch die Blockierung der Hypusin Synthese. Eine direkte Inhibition von eIF5A ist bislang nicht möglich.

In Datenbanken konnten bislang eIF5A codierende Nukleinsäuresequenzen der Protozoen *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002 / Molitor *et al.*, 2004), *P. vivax* (Kaiser *et al.*, 2003, AJ422210.), *Toxoplasma gondii* (Kissinger *et al.*, 2003) und *Leishmania major* (Drummelsmith *et al.*, 2003) gefunden werden. Nach unseren Kenntnissen hat bislang allerdings keine funktionale oder biochemische Analyse des eIF5A Faktors von *P. vivax* stattgefunden. Die Analyse des Faktors von *P. vivax* könnte Aufschlüsse über die genaue Funktion des Faktors im Parasiten geben und als Zielstruktur für neue Chemotherapeutika dienen (Hammels *et al.*, 2004).

## 1.4 Der Polyaminbiosyntheseinhibitor Agmatin

Ein interessanter Aspekt ist die hemmende Wirkung des Polyaminbiosyntheseinhibitors Agmatin im Vergleich zu den Chemotherapeutika Artemisinin, Triclosan und Chloroquin. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Polyamin Agmatin ein Ligand des Imidazolin Rezeptors ist. Dies spielt eine Rolle bei der Regulierung des Zentralen Blutdrucks (Raasch *et al.*, 2001). In Pflanzen ist Agmatin ein Struktur analogon von Putrescin ein moderater Inhibitor der Homospermidinsynthese (HSS) (EC.2.5.1.44) (Böttcher, 1994), die eine Aminobutyleinheit von Spermidin auf Putrescin überträgt wobei Homospermidin entsteht. Das Polyamin Agmatin wird entweder durch die Arginindecarboxylase (ADC) von Arginin oder der Agmatinase aus Putrescin gebildet und hat aufgrund seiner Rolle als Neurotransmitter in den letzten Jahren ein zunehmendes Interesse geweckt (Raasch *et al.*, 2001). Die menschliche Agmatinase konnte mittlerweile kloniert werden (Iyer *et al.*, 2002). Das Enzym befindet sich in den Mitochondrien und hat eine mitochondriale Zielsequenz am N-terminalen Ende (Dallmann *et al.*, 2004). In menschlichen und tierischen Zellen reguliert Agmatin über Antizym und einen Membranrezeptor die Aktivität der Ornithindecaboxylase und damit die Bildung von Putrescin.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund der zunehmenden Resistenz gegen Chemotherapeutika, die gegen Malaria wirksam sind, werden dringend neue Strategien in der Medikamentenentwicklung benötigt. Das „Molekulare Targeting“, wie unter 1.2 beschrieben, ist ein hoffnungsvoller Ansatz für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika, die gegen Malaria wirksam sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Spermidin Metabolismus in *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* und der daran beteiligten Enzyme wie die Deoxyhypusinsynthase (DHS) und die Homospermidinsynthase (HSS) biochemisch und molekularbiologisch in verschiedenen Plasmodien Spezies zu untersuchen. Spermidin spielt in Plasmodien, ähnlich wie in anderen Eukaryonten, eine Rolle in der Zellproliferation und offenbart eine Möglichkeit in den Zellzyklus von Plasmodien einzugreifen. Die mittlerweile laufenden „*Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* Genom Projekte“ liefern Sequenzinformationen von mutmaßlichen

Polyaminbiosynthese Genen, die bislang noch nicht charakterisiert wurden und stellt eine wichtige Basis für die vorliegende Arbeit dar.

Zunächst soll die Bedeutung des Triamins Spermidin in *P. falciparum* untersucht werden. Hierzu sollen Inhibitorexperimente mit DCA gestartet werden. Eine Supplementation mit exogenem Spermidin soll die Hemmbarkeit der Spermidinsynthese (SPS) in *P. falciparum* verdeutlichen. Es gab zu diesem Zeitpunkt bereits einen Datenbankeintrag für eine SPS codierende Genregion in *P. falciparum* (Luersen *et al.*, 2000). Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität von Spermidin metabolisierenden Enzymen soll zunächst ein indirekter Nachweis durch Inhibitorexperimente mit drei *P. falciparum* Stämmen mit unterschiedlicher Chloroquin-Resistenz, unter Einsatz von 1,7-Diaminoheptan (DAH), Dicyclohexylamin (DCA) und Agmatin erbracht werden. 1,7-Diaminoheptan (DAH) ist ein Spermidin analogon und konkurriert mit Spermidin um die Bindungsstellen des Enzyms. In Säugetierzellen resultierte der Einsatz von DAH in einem Verlust der Entwicklungsfähigkeit der Zellen (Chen *et al.*, 1996). Eine hemmende Wirkung von DAH in *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* könnte dafür sprechen, dass eine Deoxyhypusinsynthese in Plasmodien existiert. Dass dies wahrscheinlich der Fall ist wird durch eine in „Genbank“ veröffentlichte *dhs* codierende Sequenz von *P. falciparum* (Molitor *et al.*, 2000/ Gardner *et al.*, 2002) unterstützt. Ein weiteres interessantes Enzym der Polyaminbiosynthese ist die Homospermidinsynthese (HSS). Bislang gibt es keine Ergebnisse, die für eine HSS in Plasmodien sprechen. Agmatin ist ein moderater Inhibitor der HSS in Pflanzen (Böttcher, 1994) und aufgrund einer möglichen hemmenden Wirkung in *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* könnte man das Vorliegen einer separaten HSS vermuten. Darauf folgend soll eine GC/MS Analyse weitere Informationen über das Vorliegen von Homospermidin in Plasmodien, den Wirkungsmechanismus von Agmatin und den Spermidin gehalt in verschiedenen *P. falciparum* Stämmen nach Anwendung verschiedener Inhibitoren, geben.

Eine weitere Fragestellung, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll ist der inhibitorische Einfluss von Agmatin auf das Wachstum und die Entwicklung von Chloroquin - resistenten und Chloroquin - sensitiven *P. falciparum* Stämmen im Vergleich zu wichtigen Chemotherapeutika: wie Triclosan, Artemisinin und dem konventionellen Chloroquin. Außerdem soll der Einfluss von Agmatin und der genannten Hemmstoffe auf die RNA Biosynthese untersucht werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist es eine DHS oder HSS, die bislang noch nicht für den Parasiten beschrieben waren, als mögliche neue Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika zu identifizieren. Aufgrund der Daten der Genomsequenzierung, die erstmalig auf das Vorkommen einer Deoxyhypusinsynthese (DHS) codierenden Genregion von *P. falciparum* hindeuten, soll eine Isolierung, Sequenzierung und Analyse einer DHS codierenden Genregion aus *P. falciparum* erfolgen. Dies geschieht zum einen, um die Existenz einer DHS codierenden Genregion in *P. falciparum* zu bestätigen und um die erhaltenen Sequenzen von verschiedenen *P. falciparum* Stämmen auf Sequenzunterschiede hin zu untersuchen. Die Isolierung und Analyse der DHS codierenden Genregion soll als mögliche Zielstruktur dienen. In zweiter Linie soll die Existenz einer separaten Homospermidinsynthese (HSS) codierenden Genregion in *P. falciparum* untersucht werden. Die pflanzliche Homospermidinsynthese (HSS) aus *Senecio vulgaris* (Asteraceae) (Kaiser, 1999b) zeigt eine signifikante Homologie zu der mutmaßlichen Deoxyhypusinsynthese codierenden Genregion aus dem *P. falciparum* Stamm Dd2. Da sich die eukaryontische HSS aus der DHS rekrutiert, ist es interessant zu sehen, ob eine separate HSS auch in *P. falciparum* vorliegt.

Auch der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor eIF5A aus *P. vivax* könnte ein wichtiges Target für die Chemotherapie der Malaria in der Zukunft darstellen, da seine Rolle in der Zellproliferation des Parasiten bislang ungeklärt ist (Abschnitt 1.5). Da der eIF5A Faktor aus *P. falciparum* bereits sequenziert ist (Gardner, *et al.*, 2002/ Molitor *et al.*, 2004) und die Genomsequenzierung von *P. vivax* momentan erfolgt, soll der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor aus *P. vivax* isoliert werden. Da die *in vitro* Kultivierung von *P. vivax* bisher erst einmal gelungen ist, ist die Isolierung, Sequenzierung und Analyse einer eIF5A codierenden Genregion aus *P. vivax* um so interessanter, um dieses Gen als Target für eine alternative Chemotherapie nutzen zu können.

## 2. Material und Methoden

### Material

#### 2.1 Geräte

Brutschrank	Typ B5050, Heraeus Christ
Elektrophoresekammer vertikal	Mini Protean 3 Zell, Bio-Rad X-Cell II™, Novex X-Cell II™Blot Module, Novex
Elektrophoresekammer horizontal	HU 10, Labtech International
Electrophorese Power Supply	Standard Power Pack P 25, Biometra
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf
Heißluftsterilisationsschrank	Heraeus
Inkubationskammer	Billups - Rothenberg
Magnetrührer	RCT Basic, IKA Labortechnik
Mikroskop	Zeiss
PCR Cycler	Thermocycler T3, Biometra Thermocycler personal, Biometra
Plate reader	Spectra Max 340PC, MolecularDevice
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf Reference, Eppendorf
Schüttler	IKA-Vibrax VXR, Janke& Kunkel BA-WI-300, Bachofer
Sonifier	Branson
Sterilbank	BIO48 Faster, Biochrom Kg
Trocknungsrahmen für SDS Gele	Roth
Vakuumtrockner	RVC 2-18, Christ
Vortex	MS1 Minishaker, IKA Labortechnik
Vacu-Blot System	Biometra
Waage	Basic, Sartorius 1601 A MP8-1, Sartorius
Zentrifugen	Biofuge 13R, Heraeus Sepatech Typ 113, Sigma Typ 4500, Heraeus Christ

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Anzuchtkolben 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml	Schott
Chromatography Paper	3 MM CHR, Whatmann
Gasflasche (92 % N <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> und 3 % O <sub>2</sub> )	Linde
Gefäße für Medien	
25ml, 50ml, 100ml, 200ml, 500ml, 1000ml	Duran, Schott
Kulturschalen, 60/15 mm u. 94/16 mm	Cellstar, Greiner Labortechnik
Glas Pasteur Pipetten	Brand
Glas-Pipetten	Brand
Kassetten für SDS Gele	Invitrogen
Kryoröhrchen für Zellen	Nunc Brand Products
Membranen	
Hybond™ – N	Amersham Pharmacia Biotech

### 2.2.1 Hybond™ ECL™ Amersham Pharmacia Biotech

Roti-Nylon Plus	Roth
Objektträger	Marienfeld
Plastikpipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Proteinfohlen für SDS Gele	Roth
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Labortechnik
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf
Sterile 12- u. 96-Loch Microtiter Platten	Nundon™ Surface, Nunc Brand Products
Sterilfilter	
FP 30/0,2µm CA-S	Schleicher & Schul
GS 0,22µm Sterivex	Millipore
Röhrchen 14 ml u. 50 ml	Cellstar, Greiner Bio-One

## 2.3 Kits

Concert Rapid PCR Purification System	Gibco BRL Life Technologies
DIG DNA Labelling and Detection Kit	Roche
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen
Plant Rneasy Mini Kit	Qiagen
Plasmid Miniprep Kit	Seqlab
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen
Qiamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Qiaprep Spin Mini und Midi Kit	Qiagen
Rapid Purification System	Gibco BRL Life Technologies
Ready-To-Go™ T Primed First Strand Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Original TA Cloning® Kit	Invitrogen
PSTBlue-1 AccepTor™ Vector Kit	Novagen
PETBlue-1 AccepTor™ Vector Kit	Novagen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen

## 2.4 Chemikalien

5 x Advanced Protein Assay CAT#ADV01	Cytoskeleton
Agar Agar	Merck
Agarose	Genaxxon Bioscience
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Antidigoxigenin	Roche
Aqua - Roti - Phenol	Roth
Bacto Trypton	Difco Laboratories
Bromphenolblau	Sigma
Chlorameisensäuremethylester	Fluka
Chloroform	Merck
Coomassie blue R250, Serva Blau R	Serva
Diethylether	Merck
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dinatriumedetat (Na <sub>2</sub> EDTA)	Merck
Dinatriumethyldiamintetraacetat (EDTA)	Gibco BRL, Life Technologies
Ethanol	Merck
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Amresco
Formaldehyd	Merck
Giemsa	Merck
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Roth
Hepes	Sigma
Hypoxanthin	Sigma
Imidazol	Qiagen
Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Isopropanol	Merck
Lysozym	Sigma
Maleinsäure	Merck
2-Mercaptoethanol (2-MSH)	Roth
Methanol	Roth
4-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Milchpulver Glücksklee	Nestlé
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumacetat	Merck

Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck
Natriumcitrat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gibco BRL, Life Technologies
NBT/BCIP Stock Solution	Roche
N,N,N',N',- Tetramethylendiamin (Temed)	Roth
Puffertabletten, pH7,2	Merck
Roti – Hybri- Quick	Roth
Rotiphorese Gel 30	Roth
RPMI 1640	Sigma
(w/L – Glutamine ohne Natriumbicarbonat)	
Salzsäure (HCL)	Merck
Sorbitol	Sigma
Tris (hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	a1-biotech
Trizol	Invitrogen
Tween 20	Sigma
X-Gal	Roth

## 2.5 Inhibitoren

Agmatin	Sigma
Artemisinin	Hai van Nong, Nord Korea
Cadaverin	Sigma
Dicyclohexylamin (DCA)	Sigma
1,7 - Diaminoheptan	Sigma
Putrescin	Sigma
Spermin	Sigma
Spermidin	Sigma

Die Inhibitoren wurden als 10 mM Stammlösungen, gelöst in RPMI 1640, angesetzt und bei 4°C gelagert.

## 2.6 Enzyme, Antikörper, Standards und Antibiotika

Taq Polymerase	Genaxxon Bioscience, Qiagen®
Extra Avidin®, Alkaline Phosphatase Conjugate	Sigma
DNA T4 Ligase	Sigma
Eco RI (10 Units/ µl)	New England Biolabs
Nde I (10 Units/ µl)	Sigma
Bam HI (10 Units/ µl)	Sigma
Anti - Maus IgG	Sigma
Anti- Rabbit IgG	Sigma
Polyklonaler anti DHS – Antikörper (Mensch)	Professor Kang, Korea
Polyklonaler anti Nelf-5A - Antikörper gegen Nelf-5A aus <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (Solanaceae)	C. Kuhlemeyer, Pflanzenphysiologisches Institut, Bern
Polyklonaler anti HSS - Antikörper gegen HSS aus <i>Rhodospseudomonas viridis</i>	A. Kaiser, Bonn
Mass Ruler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
50 bp DNA Ladder	MBI Fermentas
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas
6x Loading Dye	MBI Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
PageRuler™ Protein Ladder	MBI Fermentas
Gentamycin	Sigma
Ampicillin, amoxi 1000	CT, Arzneimittel GmbH

## 2.7 Stamm- und Standardlösungen

Ammonium-peroxodisulfat (APS)	250 µg Ammoniumperoxodisulfat wurden in 250 ml H <sub>2</sub> O bidest gelöst und bei -20°C aufbewahrt.
Ampicillin	500 µg Ampicillin wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst und -20°C aufbewahrt.
Bicarbonat-Puffer	7,5g NaHCO <sub>3</sub> wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, steril filtriert und in Falcon- Röhrchen abgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.
0,5 M EDTA	3.06g Dinatriumethylendiamintetraacetat wurden in 400 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt, das Volumen auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert.
0,1 % DEPC	0,1 ml Diethyl Pyrocarbonat (DEPC) wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, 12 Stunden bei 37°C gelagert und dann autoklaviert.
Gentamycin	40µg wurden in 1 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst und bei -20°C aufbewahrt.
Giemsa Puffer	2 Tabletten (Puffertabletten pH 7,2) wurden in 2000 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst und bei 4°C aufbewahrt.
0,5M IPTG	0,24g IPTG wurden in 1 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, steril filtriert und bei - 20°C aufbewahrt.

Kryolösung	1,8g NaCl 8,4g Sorbitol wurden in 200 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, zu 180 ml dieser NaCl-Sorbitol Lösung wurden 70 ml Glycerin hinzugegeben und bei 4°C aufbewahrt.
Lysispuffer für Proteinextraktion	25 mM Tris/HCL pH 8,0 10 mM EDTA 50 mM Glucose wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. aufgelöst und bei 4°C gelagert.
10 x MOPS	41,85 g MOPS 6,8g Natriumacetat wurden in 800 ml DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, dann wurden 20 ml DEPC behandelte 0,5M Na <sub>2</sub> EDTA Lösung hinzugegeben und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei 4°C aufbewahrt.
5 x TBE (1l):	54g Tris Base 27,5g Borsäure 20 ml 0,5M EDTA wurden in 980 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst und auf pH 8.0 eingestellt.
TBS	10 mM Tris 150 mM NaCl wurden in 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest. aufgelöst, mit HCL auf pH 7.5 eingestellt und bei 4°C gelagert.
TBS-T	wie TBS Lösung nur mit 500 µl /l TWEEN 20 Zusatz

TE Puffer	<p>10 ml 1M Tris (pH 8,0, 7,6 oder 7,4)                  2 ml Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0)                  wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. aufgelöst, dann auf                  1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.</p>
5 % Saponin	<p>2,5g Saponin wurde in 50 ml RPMI aufgelöst.</p>
20 x SSC	<p>3M Natriumchlorid                  0,3M Natriumcitrat                  wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. aufgelöst, auf pH 7.0                  eingestellt, dann auf 1000 ml aufgefüllt und                  autoklaviert.</p>
X-Gal	<p>40 mg X-Gal                  wurden in 1 ml DMFA aufgelöst, mit Aluminiumfolie                  umwickelt und bei – 20°C aufbewahrt.</p>

## 2.8 Medien

### 2.8.1 Medien zur Aufzucht von Plasmodien

RPMI:

11,9 g Hepes  
100 mg Hypoxanthin  
20,8 g RPMI 1640

wurden in 1900 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt und schließlich mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1000 ml aufgefüllt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

10 % RPMI Komplett-Medium:

10 ml Serum  
2,70 ml NaHCO<sub>3</sub>  
87,3 ml RPMI

wurden mittels einer Pipette vermischt und konnte so für zwei bis drei Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

### 2.8.2 Medium zur Aufzucht von Bakterien

LB Medium:

10 g Bacto-Trypton  
10 g NaCl  
5 g Hefeextrakt

wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt und schließlich mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert. Gelagert wurde das LB-Medium bei 4°C. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1 % Agar pro 100 ml zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde die LB-Agarlösung in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei 4°C gelagert.

## 2.9 Verwendete *Plasmodium falciparum*- und *Plasmodium vivax*-Stämme

Spezies	Stamm	Chloroquin Empfindlichkeit	Bezeichnung / Herkunft
<i>P.falciparum</i>	NF54	Sensibel	Stabilat eines niederländischen Patienten, der 1982 durch eine per Flugzeug eingeschleppte Mücke infiziert worden war
<i>P.falciparum</i>	Dd2	Resistent	MRA-150, von W2-Mef, Malaria Research & Reference Reagent Center
<i>P.falciparum</i>	R - Stamm	Resistent	Patientenisolat
<i>P.vivax</i>	Salvador PEST Stamm I		Patientenisolat, das in Aotusaffen vermehrt wurde

## 2.10 Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz	
	5'	3'
P 1	TAT TTG TTT ATC TAG CCA AA	
P 2	ACA TTA TCA TTA TCA TTA	
Primer 4 forward	ATA GTG CCT AAT GAT AAT TA	
Primer 5 reverse	CTC CTC CTA AAA TGA TTA TCC	
Primer 6 reverse	AAC CTC CTC CGA GAA TAA TAA TAC CAG	
M13 reverse	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	
M13 forward	GTA AAA CGA CGG CCA GT	
Wild Typ AK Pet forward	AAG AAC ATA TGG CGG ACG TCA AACAA	
Wild Typ AK Pet reverse	ATA GGA TCC TTA AAA ACC ATT GAC TTT	
HSS forward	GA(AG) GA(AG) GA(CT) TT(CT) AT(ACT) AA(AG) TG(CT)	
HSS reverse	(CT)TC (CT)TG (GC)GC (GC)GT (AG)TT (AGT) AT	
HSS forward 1 Degeneriert	AC(AGCT) (AT) (GC) (AGCT) AA(CT) (CT)T (AGCT) AT(ACT) (AT) (GC) (AGCT) (AT) (GC) (AGCT)	
HSS reverse 1 Degeneriert	(GC)TT (AGCT) CC CCA (AGCT) (GC) (AT) (AGCT) AC (AGCT) GC	
WSS Sv reverse	CTC CTG GGC GGT GTT GAT	
WSS Sv forward	GAG GAA GAT TTC ATA AAA TGC	
Wild Typ DO	AAG AAC ATA TGG CCG AGT CAA ACA AA	
Mutant 1-3	AAG AAC ATA TGG TCA AAC AAG AA	
1 Pv 2	GCT TCG GCT TGG AAG TCC	
P.v. 1	AAA TTA ATG TGC AAT TTA TTA	
Np Nif reverse	TAC TTG GG(AG) CCA A(CT) (AG) TCC TT	
P.v. EIF5A (1)	ATG TCA GAC CAC GAA ACG T	
P.v. EIF5A (2)	CCT TGT CTC TCC ATT ATC A	
EIF (1)	ATG TCT GCC GCC CAC GAC	
EIF (2)	TTA GTC CTT GTT AGA GGC	
Rhodo 1 forward	ATA TTC ATA TGA CCG ATT GGC CGG TTT ATC AC	
Rhodo 2 reverse	ATA TTT GAT CAC TTA TGC CCT GAT CGA CTG AGG	
P.v. forward	GA(AG) GT(AGCT) TA(CT) CC(AGCT) AA(CT) TG(CT)	

Bezeichnung	Sequenz	
	5'	3'
P.v. reverse	(AGCT) CC CCA (AG) TG(AGCT) AC(AG) TG(AG) TC(AG)	TC
P.v. int. Neu	TCT TTA CTG TAT GAT AAT GG	
P 7 F	ATG GTG GAT CAC GTT TC	
P 8 R	TCA CAT ATC TTT TTT CCT C	
P.v. reverse 2	ATT TGC TCA TAT TTC ATT TT	
P.v. 1	CCG AAT TCA GTC CCA CGT	
P.v. rev 4	GGA GGA CAA CTC CTT CAC CG	
Pex forward	GGT ATC ATA TGG TGG ATC ACG TTT CT	
Pex reverse	TTA ATG GAT CCT CAC ATA TCT TTT TTC CTC	
Pex P.v. reverse	TTA ATG GAT CCC TAG GAG GAC AAC TC	
Pex P.v. forward	TTA ATC ATA TGT CAG ACC ACG AAA CG	

## 2.11 Verwendete Bakterienstämme

BL21 (DE3) pLysS Zellen      F'ompT hsdSB(rS-mS) gal dcm (DE3)pLysS (CmR)  
(Fa. Novagen)

INVαF'      F'endA1 recA1 hsdR17(rK-,mK+) supE44 thi-1  
gyrA96 relA1 Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169λ-  
(Fa. Invitrogen)

TOP10F'      F' {lacIqTN10(TetR)}mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)  
Φ80lacZΔM15lacX74 recA1 deoR araD139 Δ  
(ara-leu) 7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG  
(Fa. Invitrogen)

## 2.12 Klonierungsvektoren und Expressionsvektoren

pETBlue-1      Novagen  
pSTBlue-1      Novagen  
pCR®2.1-TOPO      Invitrogen  
pET15b      Novagen

### 3. Methoden

#### 3.1 Allgemeine Methoden zur Kultivierung von *Plasmodium falciparum* Stämmen

##### 3.1.1 Ansetzen einer *Plasmodium falciparum* Dauerkultur

Nach der Entnahme einer Dauerkultur aus flüssigem Stickstoff wurde die *Plasmodium falciparum*- Probe in der Hand erwärmt. Das aufgetaute Blut wurde in ein Röhrchen (Fa. Cellstar, Greiner Bio-One) umgefüllt und im Verhältnis 1:1 mit 3,5 % Natriumchlorid gemischt. Nach der Zugabe von Natriumchlorid (3,5 %) wurde die Probe bei Raumtemperatur (RT) 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert (Fa. Heraeus Christ, Zentrifuge) und der Überstand abgenommen. In eine Kulturschale 94/16 mm (Fa. Cellstar, Greiner Labortechnik.) wurden zunächst 15 ml 20 % Kompletmedium (2.8.1) vorgelegt. Das Pellet wurde in 5 ml 20 % Kompletmedium resuspendiert und in die Schale gegeben. Zum Schluss wurden 0,4 ml gewaschenes und defibriniertes Blut hinzugegeben. Die Kulturschale 94/16 mm (Fa. Cellstar, Greiner Labortechnik.) wurde dann in eine Inkubationskammer gestellt und für eine Minute mit einem Gasgemisch, das aus 92 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 3 % O<sub>2</sub> bestand, begast. In der Inkubationskammer befand sich zusätzlich ein Schale mit Wasser, um eine höhere Luftfeuchtigkeit zu erreichen. Danach wurde die Inkubationskammer bei 37°C im Brutschrank (Fa. Heraeus Christ) aufbewahrt. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Kultur auf zwei Kulturschalen 60/15 mm (Fa. Cellstar, Greiner Labortechnik.) aufgeteilt. In jede Kulturschale wurden 5 ml neues Medium und 0,2 ml Erythrozytenkonzentrat hinzugegeben, so dass in der Kultur ungefähr ein Hämatokritwert von 10 % vorlag.

##### 3.1.2 Kultivierung der Stämme

Die Stämme wurden in Kultur nach der Methode von Trager und Jensen (1976) gehalten und die Parasitämie mikroskopisch bestimmt. Für die mikroskopische Auswertung wurden Ausstriche angefertigt, die nach der Giemsa Methode angefärbt wurden. Für die Färbung musste jedes Mal erneut eine Verdünnung der Giemsa-Stammlösung erstellt werden, da ein pH von 7,2 für eine optimal Färbung benötigt wird. Das Verhältnis von Stammlösung zu Puffer betrug 1:19.

Die mit Methanol fixierten Objektträger (Fa. Marienfeld) wurden mit der Oberseite nach unten für 12 Minuten in eine Färbewanne gelegt. Danach wurden sie mit Leitungswasser abgespült und getrocknet. Durch die Giemsa-Färbung erscheinen die Kerne der Malariaerreger rot, ihr Cytoplasma blau.

Zur Bestimmung der Parasitämie wurden ungefähr 1000 Erythrozyten ausgezählt. Die Parasitämie errechnet sich aus der Anzahl der befallenen Erythrozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl der Erythrozyten. Die Parasitämie wird in Prozent angegeben.

### **3.1.3 Erstellung eines Erythrozytenkonzentrats**

Hierbei handelt es sich um ein Anreicherungsverfahren der Erythrozyten durch Entfernen des Serums. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden unter sterilen Bedingungen 60 – 80 ml menschliches Blut (Blutgruppe A oder 0) entnommen und in sterile, dunkle mit Glasperlen gefüllte Flaschen abgefüllt. Die Flaschen wurden 12 Minuten geschüttelt, um das Blut zu defibrinieren, daraufhin wurde es in 14 ml Röhrchen (Fa. Cellstar, Greiner Bio-One) umgefüllt und 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert (Fa. Heraeus, Christ). Das Pellet wurde in 10 ml RPMI aufgenommen und erneut zentrifugiert, dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde das Blut mit 2 ml Humanserum versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Kontrolle wurden 2 ml Humanserum, 2 ml RPMI und 0,2 ml gewaschenes Blut vermischt und einen Tag bei 37°C aufbewahrt. Verfärbte sich die Kontrolle war die Probe bakteriell kontaminiert.

### **3.1.4 Gewinnung von Serum**

Das benötigte Humanserum (A Faktor Rhesus positiv) wurde freundlicherweise vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (Direktor Prof. Dr. P. Hanfland) zur Verfügung gestellt. Vor Gebrauch musste das Serum gepoolt werden, hierzu wurden fünf Beutel auf 37°C erwärmt und dann mit EtOH desinfiziert. Anschließend wurden die Schlauchenden abgeschnitten, abgeflämmt und das Serum in eine sterile 1l Flaschen gefüllt. Im nächsten Schritt wurde das Serum in Röhrchen (Fa. Cellstar, Greiner Bio-One) umgefüllt, wobei die 1l Flaschen zuvor gemischt wurde. Das Serum wurde bei -20°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde ein Röhrchen (Fa. Cellstar, Greiner Bio-One) im Kühlschrank aufgetaut und konnte so für einige Zeit dort gelagert werden.

### 3.1.5 Anlegen von *Plasmodium falciparum* Dauerkulturen

Eine langfristige Erhaltung von verschiedenen *P. falciparum* Stämmen wurde durch die Anlage von Dauerkulturen und das Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gewährleistet. Dadurch können Kulturen für einen längeren Zeitraum gelagert werden oder es kann im Falle einer Kontamination auf diese Kulturen zurückgegriffen werden. *P. falciparum*- Kulturen mit mindestens 5 % Parasitämie, die überwiegend Trophozoiten enthielten wurden in Röhrchen (Fa. Cellstar, Greiner Bio-One ) umgefüllt und 5 Minuten bei 2000 rpm und RT zentrifugiert (Fa. Heraeus, Christ, Zentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und 0,2 ml des Pellets in ein Kryoröhrchen (Fa. Nunc Brand Products) gegeben. Nach der Zugabe von 0,2 ml Kryolösung (2.7) wurde das Röhrchen schnellstmöglich in den Kryobehälter bei  $-80^{\circ}\text{C}$  unter flüssigem Stickstoff überführt.

## 3.2 Biochemische Untersuchungen

### 3.2.1 Inhibitorexperimente mit *Plasmodium falciparum* - Stämmen

Die Inhibitorstudien wurden mit *P. falciparum* - Stämmen mit unterschiedlicher Chloroquin- Sensitivität durchgeführt. Bei den Stämmen handelt es sich um den NF54 - Stamm, einen Chloroquin empfindlichen Stamm, und die beiden Chloroquin resistenten Dd2 und R Stämme.

Die Stämme wurden in Kultur nach der Methode von Trager und Jensen (1976) gehalten und die Parasitämie mikroskopisch bestimmt. Für die Experimente wurden die Kulturen auf eine Anfangsparasitämie von 1,5 % adjustiert. In einer aus 12 Bohrungen bestehenden Microtiter Platte (Fa. Nunc Brand Products) wurden 200  $\mu\text{l}$  der adjustierten Kultur in jeweils 2 ml RPMI Komplett-Medium (2.8.1), das den Inhibitor mit der jeweiligen Konzentration beinhaltet, aufgenommen. Jedes Inhibitionsexperiment wurde in dreifacher Ausführung angesetzt. Als Kontrolle wurde infiziertes Blut ohne Inhibitor eingesetzt. Nach jeweils 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Parasitämie (3.1.2) bestimmt. Ebenfalls wurde die Anzahl der Trophozoiten und Schizonten bestimmt, um zu untersuchen ob der jeweilige Hemmstoff einen Einfluss auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien hat.

### 3.2.1.1 Darstellung der Wachstumskurven

Die Ergebnisse der Inhibitorstudien wurden anhand von Wachstumskurven ausgewertet. Hierzu wurden die Durchschnittswerte der jeweiligen Parasitämie - Werte errechnet und diese in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.

### 3.2.1.2 Determinierung der IC<sub>50</sub> Werte

Die IC<sub>50</sub> Werte wurden durch lineare Regressions-Analyse bestimmt, wobei auf der y - Achse die Inhibition in Prozent und auf der x - Achse die Inhibitor Konzentration in µM dargestellt wurde.

## 3.2.2 Nachweis und Identifikation der Polyamine durch GC/MS Analyse (Gas Chromatographie Massen Spektrometrie)

### 3.2.2.1 Isolierung von Plasmodien aus Erythrozyten

*P. falciparum*- Kulturen mit mindestens 5 % Parasitämie wurden für die Polyaminbestimmung durch GC/MS - Analyse (Protokoll Husek *et al.*, 1992) verwendet. Die Kulturen wurden 48h , mit oder ohne Inhibitoren, unter normalen Wachstumsbedingungen gehalten. Die Plasmodien Kultur wurde für 5 Minuten bei 2000 rpm und RT zentrifugiert (Fa. Heraeus, Christ, Zentrifuge). Die pelletierten Parasiten wurden zweimal in RPMI 1640 gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation der rötlich gefärbten Parasiten für 10 Minuten bei 37°C in 4VT des RPMI Komplett-Mediums mit 0,025 % Saponin. Die lysierten Parasiten wurden sofort mit ca. 10 ml RPMI1640 verdünnt, und 10 Minuten bei 3000 rpm und RT zentrifugiert. Die Parasiten wurden in 2 ml vorgekühltem PBS-Puffer gewaschen (3x 5 ml bei 3000 rpm, bei RT) und konnten unter diesen Bedingungen eingefroren werden.

### 3.2.2.2 Extraktion der Polyamine aus Plasmodien für die GC/MS Analyse

Die Durchführung der Methode erfolgte nach einem Protokoll von Husek *et al.* (1992). Das frische oder eingefrorene Plasmodienzellmaterial wurde in 1N HCL aufgeschlossen. 0,5 ml – 1 ml der wässrig sauren Extrakte wurden in 1 ml 1M Natriumcarbonatlösung alkalisiert und mit 20 µl Chlorameisensäuremethylester versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die N-Carbomethoxy-Derivate dreimal in je 1 ml Diethylether ausgeschüttelt, die vereinigten Diethyletherauszüge zur Trockene eingeeengt und zur GC/MS Analyse in 10-25 µl Dichlormethan aufgenommen.

### 3.2.2.3 Kontrollen für die GC/MS Analyse

50 µg des Zellmaterials aus *P. falciparum* wurden derivatisiert. Parallel erfolgte die Derivatisierung eines „Reinsubstanzcocktails“ verschiedener Polyamine. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte Erythrozyten gleichermaßen aufgearbeitet.

## 3.3 RNA Isolierung

### 3.3.1 Vorbereitende Maßnahmen zur Gewinnung von RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die normalerweise keine Cofaktoren für ihre Funktion benötigen. Da es schwierig ist, RNasen durch Hitze zu inaktivieren und kleinste Mengen genügen, um RNA zu zerstören, sollten alle Plastik- und Glaswaren vor der Benutzung behandelt werden, um eine RNA Kontamination zu vermeiden. Dazu wurden die Gefäße mit DEPC haltigem H<sub>2</sub>O bidest. gespült und die Elektrophoresekammern zuvor zusätzlich mit 0,5 % SDS gereinigt.

### 3.3.2 RNA Isolierung

(Rneasy Mini Handbuch April 2002, Qiagen)

Die RNA Isolierung wurde in Anlehnung an das Qiagen Protokoll für den Rneasy Mini Plant Kit mit Modifizierungen durchgeführt. Eine Schale mit 5 ml Kultur von *Plasmodium falciparum* und einer Ausgangsparasitämie von ca. 5 %, die in einer kontinuierlichen Kultur nach einem Protokoll von Trager und Jensen (1976) gehalten worden war, wurde 5 Minuten bei 2000 rpm und RT abzentrifugiert (Fa. Heraeus, Christ, Zentrifuge). Das erhaltene Pellet wurde zweimal in RPMI gewaschen und konnte nun entweder bei –80°C eingefroren werden, oder sofort weiterbearbeitet werden. Zur Lyse der Plasmodien wurde zuerst 6 µl 2-Mercaptoethanol und dann 600 µl RLT Puffer (Fa. Qiagen) zu dem Pellet gegeben und das Pellet darin vermischt. Zur Homogenisation wurden 600 µl auf den Qiashredder gegeben und 5 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert (Fa. Heraeus Sepatech, Zentrifuge). Zum Lysat wurde 1 VT 70 % Ethanol hinzugegeben und der Ansatz durch Pipetieren vermischt. 700 µl des Lysats wurden auf eine Minisäule gegeben, die sich in einem 2 ml Auffanggefäß befand, und 15 – 60 Sekunden bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Minisäule wurde mit 700 µl RWI (Fa. Qiagen) Puffer 15 – 60 Sekunden bei 13000 rpm gewaschen. Daraufhin folgten zwei weitere Waschschriffe bei denen die Minisäule mit 500 µl RPE Puffer 15 – 60 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert wurde.

Danach wurde die Minisäule zwei weitere Minuten zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die RNA wurde mit 40 µl 0,1 % DEPC Lösung eluiert. Die Säule wurde eine Minute stehen gelassen und dann 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Probe konnte nun bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden oder auf einem 1 % Agarose Gel untersucht werden, wobei bei einem positiven Ergebnis eine 19S und ein 26S Bande zu erwarten sind.

### 3.3.3 Analyse von RNA auf Formaldehydgelen

(Bench Guide, Qiagen)

Aufgrund der Tatsache, dass RNasen die RNA degradieren, wie in 3.3.1 beschrieben, ist es schwierig, RNasen zu inaktivieren. Für analytische Zwecke wurde die gewonnene RNA anhand von Formaldehydgelen überprüft. 1.2 g Agarose wurden mit 10 ml 10x FA Gelpuffer und 90 ml DEPC H<sub>2</sub>O bidest. in einer Mikrowelle unter Kochen gelöst und dann in einem Wasserbad auf  $65^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt, mit 1,8 ml 37%igem Formaldehyd versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose und Entfernen des Kammes wurde das Gel mindestens 30 Minuten in 1x FA Laufpuffer equilibriert und in die Elektrophoresekammer (Fa. Labtech International) gelegt und die Kammer mit 1x FA Laufpuffer gefüllt. Die RNA-Proben wurden mit dem 5x RNA Probenpuffer versetzt, dann auf  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt, zum Abkühlen auf Eis gestellt dann und in die Probetaschen geladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Bad für 20 Minuten gefärbt, um die RNA unter einer UV-Lampe (260 nm) sichtbar zu machen. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

10 x FA Gelpuffer:	200 mM MOPS
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
	der pH wurde mit NaOH auf 7.0 eingestellt

1 x FA Gel Laufpuffer:	100 ml 10 x FA Gelpuffer
	20 ml 37 % Formaldehyd
	880 ml DEPC haltigem H <sub>2</sub> O bidest.

5 x RNA Probenpuffer:        16 µl gesättigtes Bromphenol Blau  
                                       80 µl 500 mM EDTA, pH 8.0  
                                       720 µl Formaldehyd  
                                       2 ml 100 % Glycerol  
                                       3084 µl Formamid  
                                       4 ml 10 x FA Gelpuffer  
                                       auffüllen auf 10 ml mit DEPC H<sub>2</sub>O bidest.

### 3.3.4 RT-PCR: Reverse Transkriptase PCR

Um eine PCR mit RNA als Template durchzuführen, muss diese zuerst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase Reaktion in cDNA umgewandelt werden.

#### 3.3.4.1 RT-PCR aus *Plasmodium falciparum*

Die RNA wurde langsam aufgetaut. 5 µl *P. falciparum* RNA wurden mit 28 µl DEPC haltigem H<sub>2</sub>O bidest. vermischt und 5 Minuten bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen auszubilden. Der Reaktionsansatz zur Erststrangsynthese und das Röhrchen mit FSMR (First Strand reaction mix) (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) wurden bei 37°C für 5 Minuten inkubiert und daraufhin wurde die RNA in den FSMR überführt und für 60 Minuten erneut bei 37°C inkubiert. Der Komplett-Ansatz von 33 µl wurde anschließend 5 Minuten bei 90°C erhitzt, um den RNA-cDNA Duplex zu zerstören und die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Danach wurde der Ansatz 1-2 Minuten auf Eis inkubiert.

RT-PCR - Ansatz 1:            33 µl RNA/cDNA Hybrid  
                                       2,5 µl Forward Primer *P. falciparum* (100 pmol/ µl)  
                                       63,5 µl DEPC haltigem H<sub>2</sub>O bidest.  
                                       1 µl Taq Polymerase (5 Units/ µl)  
                                       (Touchdown PCR 50° - 45°C, 3.4.2.2 )

RT-PCR - Ansatz 2:            10 µl Ansatz von RT-PCR 1  
                                       5 µl Forward Primer (100 pmol/ µl)  
                                       5 µl Reverse Primer (100 pmol/ µl)  
                                       5 µl Q-Solution (5 x)  
                                       13 µl H<sub>2</sub>O bidest.  
                                       1 µl Taq Polymerase (5 Units/ µl)  
                                       (Touchdown PCR 50° - 45°C, 3.4.2.2 )

Anschließend wurde die cDNA auf einem 1%igem Agarose Gel überprüft.

## 3.4 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 Isolierung von genomischer DNA

(QIAamp DNA Blood Mini Kit Januar 1999, Qiagen)

Die Gewinnung von genomischer DNA aus verschiedenen *Plasmodium falciparum* Stämmen und des *Plasmodium vivax* - Stammes erfolgte nach dem Protokoll des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Fa. Qiagen). Hierbei wurden 200 µl einer *P. falciparum* Kultur mit 200 µl AL Puffer (Fa. Qiagen) und 20 µl Protease (Fa. Qiagen) vermischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 56°C und einer Zentrifugation (Fa. Heraeus Sepatech, Zentrifuge) von 1 Minute bei 13000 rpm und bei RT wurde die Probe mit 400 µl 100 % Ethanol versetzt und erneut für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAamp Säule gegeben und erneut 1 Minute zentrifugiert. Danach wurde die Säule zuerst mit 500 µl AW1 (Fa. Qiagen) und dann mit 500 µl AW 2 (Fa. Qiagen) Puffer gewaschen. Zur Elution wurde 200 µl AE Puffer (Fa. Qiagen) auf die Säule gegeben, diese eine Minute stehen gelassen und dann 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die genomische DNA wurde durch Agarose Gel Elektrophorese überprüft und konnte über Monate im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

### 3.4.2 PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, engl.: polymerase chain reaction) kann *in vitro* ein bestimmter Abschnitt der DNA selektiv innerhalb kurzer Zeit millionenfach vervielfältigt werden (Mullis & Faloona, 1987). Hierzu wird ein Thermocycler eingesetzt. Das Prinzip der PCR beruht auf Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und der Synthese von DNA (Elongation). In dem Denaturierungsschritt wird die DNA auf 94°C erhitzt, um die komplementären Doppel-Stränge zu trennen. In diesem Schritt werden die Wasserstoff- Brückenbindungen, die die beiden komplementären DNA-Stränge zusammenhalten, denaturiert. Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dieser Schritt heißt Annealing (Anlagern). Die Temperatur während dieser Annealing - Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 5°C unter ihrem Schmelzpunkt. Schließlich synthetisiert die DNA-Polymerase die zwischen den Primern liegenden DNA Sequenzen. Primer sind kurze, künstlich erzeugte DNA-Stränge, die weniger als 50 Nukleotide komplementär zum sense und antisense Strang sind.

Die eingesetzte Taq DNA Polymerase (Fa. Qiagen und Fa. Genaxxon Bioscience) wurde, ursprünglich aus *Thermus aquaticus* isoliert und in *E. coli* exprimiert. Dieses Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 72°C, bleibt aber auch für kurze Zeit bei 95°C stabil und liefert somit den Vorteil, dass die Denaturierung als auch die Enzymreaktion in einem Reaktionsansatz stattfinden.

#### 3.4.2.1 Amplifikation bekannter DNA Sequenzen von Plasmiden mit genspezifischen Primern

Die PCR wurde eingesetzt, um Klone nach der Plasmid - Aufreinigung selektiv auf die Größe des inserierten Fragments zu überprüfen.

Die PCR wurde in einem Ansatz von 20 µl und bei folgendem Temperaturen durchgeführt:

5 µl Plasmid aus der Plasmidpräparation  
 1 µl Forward Primer (100 pmol/µl)  
 1 µl Reverse Primer (100 pmol/µl)  
 2 µl 10x PCR Puffer  
 9,5 µl H<sub>2</sub>O  
 1 µl dNTP (10 mM)  
 0,5 µl Taq (2,5 Units)

Denaturierung	94°C 1 min	
Annealing	55°C 1 min	⇒ 25 x
Extension	72°C 1 min	

#### 3.4.2.2 Touchdown PCR: Amplifikation der HSS/DHS codierenden Region von den *Plasmodium falciparum* - Stämmen Dd2, NF54 und R-Stamm

Mit Hilfe von Nukleinsäuresequenzdaten der Deoxyhypusinsynthase (DHS) aus *P. falciparum* und der Homospermidinsynthase (HSS) aus *Senecio vulgaris* wurden spezifische Primer konstruiert, mittels denen eine Partialesequenz der HSS/DHS Region isoliert werden konnte. Ausgehend von der genomischen DNA der verschiedenen *P. falciparum* - Stämme und mit Hilfe einer Touchdown PCR („Annealing“ Temperatur wurde bei jedem Zyklus um 0,5°C erniedrigt) konnte eine 544 bp große Partialesequenz amplifiziert werden. Die Primer 4 und 6 (2.10) wurden in einer Konzentration von 100 pmol/ µl eingesetzt.

Der PCR Cycler wurde auf folgendes Programm eingestellt:

Denaturierung	94°C 1 min	
Annealing	50°C 2 min	⇒ 10 x -0,5°C
Extension	72°C 2 min	

Denaturierung	94°C 1 min	
Annealing	45°C 2 min	⇒ 15 x
Extension	72°C 2 min	

Der PCR - Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt und hatte die folgende Zusammensetzung:

- 1 µl gDNA (schätzungsweise 0,5 – 1 µg)
- 2 µl Primer 4 (100 pmol/µl)
- 2 µl Primer 6 (100 pmol/µl)
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 2 µl 10 x PCR Puffer
- 4 µl Q-Solution (5 x)
- 4 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl dNTP (10 mM)
- 1 µl Taq (5 Units)

#### 3.4.2.3 Amplifikation des Fulllength - Klons der DHS/HSS codierenden Sequenz aus *Plasmodium falciparum*

Die verwendeten Primer 7 und 8 (2.10) wurden anhand des N-terminalen und des C-terminalen Endes der DHS Sequenz des Dd2 - Stammes, der für die Genomsequenzierung verwendet worden war, konstruiert. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol/ µl eingesetzt und das amplifizierte Fragment hatte eine Größe von 1491 bp.

Folgendes Temperaturprofil wurde eingesetzt:

Denaturierung	94°C 1 min	
Annealing	50°C 2 min	⇒ 30 x
Extension	72°C 2 min	

Der eingesetzte PCR-Ansatz entsprach dem unter Punkt 3.4.2.1.

### 3.4.2.4 Amplifikation der HSS/DHS aus *Plasmodium falciparum* mit genspezifischen Primern für die nachfolgende Subklonierung in ein Expressionsplasmid

Für die spezifischen Primer Pex Forward und Pex Reverse (2.10), wurden in die Sequenz der Primer 7 und 8 eine NdeI bzw. einer BamHI Schnittstelle eingefügt, um das Amplifikat in den Expressionsvektor pET15b inserieren zu können. Die Konzentration der Primer betrug 100 pmol/µl. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil wurden wie unter Punkt 3.4.2.3 beschrieben angesetzt.

### 3.4.2.5 Amplifikation des Fulllength - Klons der eIF-5A codierenden Sequenz aus *Plasmodium vivax*

Mit Hilfe der Nukleinsäuresequenzdaten der Partialsequenz von eIF-5A aus *P. vivax*, der eIF-5A codierenden Sequenz aus *P. falciparum* sowie durch bioinformatische Datenbankvergleiche mit der Genomsequenz aus der *P. vivax* - Sequenzierung, erfolgte die Konstruktion von spezifischen Primern. Aufgrund der Datenlage konnte der Fulllength - Klon der eIF-5A codierenden Genregion aus *Plasmodium vivax* isoliert werden. Die Primer eIF5A 1 und eIF5A 4 (2.10) wurden in einer Konzentration von 200 pmol/ µl eingesetzt. Das amplifizierte Fragment hatte eine Größe von 486 bp.

PCR - Ansatz und Temperaturprofil sind im Folgenden aufgeführt:

Denaturierung	94°C 1 min		
Annealing	60°C 2 min	⇒	30 x
Extension	72°C 2 min		

Der PCR - Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt und hatte die folgende Zusammensetzung:

- 1 µl gDNA *P. vivax* Salvador PEST Stamm I (84ng/µl)
- 2 µl P.v. eIF5A 1 (200 pmol/µl)
- 2 µl P.v. eIF5A 4 (200 pmol/µl)
- 1 µl dNTP (10 mM)
- 2 µl 10x PCR buffer
- 4 µl Q-Solution (5 x)
- 4 µl H<sub>2</sub>O
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (75 mM)
- 1 µl Taq (5 Units)

### 3.4.2.6 Amplifikation von eIF-5A aus *Plasmodium vivax* mit genspezifischen Primern für die nachfolgende Subklonierung in ein Expressionsplasmid

Die spezifischen Primer Pex P.v. Forward und Pex P.v Reverse (2.10), wurden mit einer NdeI bzw. einer BamHI - Schnittstelle konstruiert, um die amplifizierte Sequenz in den Expressionsvektor pET15b inserieren zu können. Die Primer Pex P.v. Forward und Pex P.v. Reverse (2.10) wurden in einer Konzentration von 200 pmol/µl eingesetzt.

PCR - Ansatz und Temperaturprofil sind im Folgenden aufgeführt:

Denaturierung	94°C 1 min		
Annealing	60°C 1 min	⇒	30 x
Extension	72°C 1 min		

Der PCR - Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt und bestand aus folgenden Komponenten:

5 µl <i>P. vivax</i> Plasmid DNA
1 µl Pex P.v. Forward (200 pmol/µl)
1 µl Pex P.v. Reverse (200 pmol/µl)
1 µl dNTP (10 mM)
2 µl 10x PCR buffer
9,5 µl H <sub>2</sub> O
0,5 µl Taq (2,5 Units)

### 3.4.3 Agarose Gelelektrophorese

Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA in Agarosegelen ist proportional zum Logarithmus ihrer Grösse. Aufgrund dieser Eigenschaft dienen Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500 – 20000 bp. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, die Agarosegelkonzentration, die Spannung und die Temperatur. In dieser Arbeit kamen 1 %ige Agarosegele bei 120V zum Einsatz.

Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 1x TBE in einer Mikrowelle unter Kochen gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose und Entfernen des Kammes wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (Labtech International) gelegt und die Kammer mit 1 x TBE Puffer gefüllt.

Die DNA-Proben wurden mit 6 x Loading - Buffer (MBI Fermentas) versetzt und in die Probetaschen geladen. Des weiteren wurden 5 µl eines DNA - Größenstandards mitaufgetragen, um die Größe der erhaltenen DNA-Fragmente bestimmen zu können. Durch das Anlegen der Spannung läuft die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode der Elektrophoresekammer. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad mit einer Konzentration von 0,5 µg Ethidiumbromid/ml für 20 Minuten gefärbt, um die DNA-Fragmente unter einer UV-Lampe (260nm) sichtbar zu machen. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

#### **3.4.4 Gel Extraktion**

(Qiaquick Spin Handbuch Juli 2002, Qiagen)

Mit dieser Methode konnte DNA in einer Größenordnung zwischen 70 bp und maximal 10 kb aus Agarosegelen extrahiert und gereinigt werden. Das zu extrahierende DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und gewogen. Dann wurden 3VT des Puffers QG (Fa. Qiagen) zu 1 VT des Gels hinzugegeben und 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Um das Auflösen des Gels zu beschleunigen wurde die Probe in Abständen von 2 Minuten, während der Inkubation, leicht geschüttelt. Nachdem das Gel-Fragment vollständig aufgelöst war, wurde 1 VT Isopropanol hinzugegeben, gemischt und eine Qiaquick-Säule beladen und 1 Minute bei 13000 rpm und RT zentrifugiert (Fa. Heraeus Sepatech, Zentrifuge). Daraufhin wurde die Säule zuerst mit 500 µl Puffer QG (Fa. Qiagen) und dann mit 750 µl Puffer PE (Fa. Qiagen) gewaschen. Danach wurde die Qiaprep Säule eine weitere Minute zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Zur Elution wurden 30 µl Puffer EB (Fa. Qiagen) auf die Mitte der Membran gegeben eine Minute stehen gelassen und dann 1 Minute bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Das eluierte Gelfragment wurde durch Agarose - Gelelektrophorese überprüft.

#### **3.4.5 Restriktion**

Die Restriktionsenzyme werden genutzt, um DNA Moleküle zu schneiden. Die Aktivität von Restriktionsenzymen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym die benötigt wird, um 1 µg Lambda DNA in einer bestimmten Zeit zu restringieren. Die Restriktionen wurden für die Konstruktion von Plasmiden oder Ligation von Gel Fragmenten in den Expressionsvektor pET15b angewandt.

Restriktionsansätze:

Plasmide	Gel Fragmente
5 µl DNA (0,5 – 1 µg/µl)	30 µl DNA (0,5 – 1 µg/µl)
1 µl 10x Restriktionspuffer	4 µl 10x Restriktionspuffer
1 µl (10 units/µl) Restriktionsendonuklease	4 µl (10 units/µl) Restriktionsendonuklease
3 µl H <sub>2</sub> O	2 µl H <sub>2</sub> O

Die Ansätze wurden für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, und die Reaktion mit 10 µl Probenpuffer (6x Loading Dye, Fa. MBI Fermentas) beendet. Um die Größe der Restriktionsfragmente zu bestimmen, wurde die DNA durch Agarose Gel Elektrophorese überprüft.

**3.4.6 Extraktion mit Phenol/Chloroform**

Die Phenol/Chloroform Extraktion dient zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme und zum Entfernen von Proteinen in einer DNA-haltigen Lösung. Der Restriktionsansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl gebracht und in einem Verhältnis von 1:1 mit Tris (Fa. a1-biotech) pH 8,0 gesättigtem Phenol/Chloroform (im Verhältnis 1:24) versetzt und 5 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugiert (Fa. Heraeus Sepatech, Zentrifuge). Dadurch wurden die Proteine denaturiert, die in der phenolischen Phase vorlagen. Nach anschließender Zentrifugation kam es zur Phasentrennung. In der wässrigen Phase befand sich die DNA (100 µl), die mit 1/10 VT 3M Natriumacetat und 2VT Ethanol bei – 20°C 20 Minuten, oder über Nacht, gefällt wurde. Anschließend erfolgte zur Pelletierung der DNA eine 20minütige Zentrifugation bei 13000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet getrocknet und dann in 25 µl H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen.

**3.4.7 Ligation von DNA**

Unter Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit dem Enzym T4 DNA-Ligase. Restriktionsenzyme (3.4.5) ermöglichen, dass DNA-Fragmente an spezifischen Sequenzregionen gespalten werden können. Wenn die bei der Trennung entstehenden Enden zueinander kompatibel sind, können verschiedene DNA - Fragmente durch das Enzym T4-DNA Ligase wieder miteinander verknüpft werden.

Die T4-DNA-Ligase ist für die Ligation von DNA-Fragmenten besonders geeignet, da sowohl komplementäre "sticky ends" als auch "blunt ends", jedoch mit schlechterer Effizienz, ligiert werden können. Die T4-Ligase katalysiert in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  Ionen und ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3' Hydroxy- und 5'Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Ketten, unter Abspaltung von  $OH^-$ .

Ligationsansatz:

<b>TOPO TA Cloning®</b>	<b>TOPO TA Cloning® mit pET15b als Vektor</b>	<b>AccepTor™ Vector Kit</b>
2 µl Amplifikationsprodukt	5 µl Plasmid DNA	2 µl Amplifikationsprodukt
1 µl pCR®2.1-TOPO® Vektor	1 µl pET15b Vektor (10µg)	1 µl Acceptor Vector (50ng/µl)
2 µl H <sub>2</sub> O	2 µl H <sub>2</sub> O	2 µl H <sub>2</sub> O
1µ Salzlösung	1 µl 10x Ligationspuffer (TOPO TA Cloning® Kit)	5 µl Clonables™ 2x Ligation Premix
	1 µl T4 Ligase 4units/ µl (Fa. Sigma)	

Die Ligation wurde im Fall des **TOPO TA Cloning®** vorsichtig vermischt und dann 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bei dem **AccepTor™ Vector Kit** wurde der Ansatz zwischen 30 Minuten und 2 Stunden bei 16°C inkubiert.

Salzlösung:	1,2 M NaCl
(TOPO TA Cloning® Kit)	0,06 M MgCl <sub>2</sub>
10x Ligationspuffer:	60 mM Tris-HCL, pH 8,3 (bei 42°C)
(Original TA Cloning® Kit)	60 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 mM NaCl
	1 mg/ml Bovine Serum Albumin
	70 mM β-Mercaptoethanol
	1 mM ATP
	20 mM Dithiothreitol
	10 mM Spermidin

### 3.4.8 Transformation

Die meisten Bakterien, darunter auch *E. coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nicht auf. Um Bakterien zu transformieren, muss man die Bakterien chemisch und durch Kälte behandeln. Dadurch verstärkt man ihre Fähigkeit, DNA aufzunehmen. Zellen, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, bezeichnet man als kompetent.

#### 3.4.8.1 Transformation mit dem TOPO TA Cloning® und dem AccepTor™ Vector Kit

Die durch PCR erhaltenen Fragmente wurden durch den Concert PCR Purification Kit (3.4.10) (Gibco BRL, Life Technologies) aufgereinigt und das erhaltene PCR Produkt, in das gewonnene Plasmid ligiert (3.4.7). 2 µl des Ligationsansatzes wurde zu den One Shot® chemisch kompetenten *E. coli* Zellen (INVαF' oder TOP10F') gegeben und vorsichtig vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Bei 42°C wurden die Zellen 30 Sekunden einem Hitzeschock unterzogen und dann direkt auf Eis überführt. Danach wurden 250 ml SOC Medium hinzugegeben und bei 37°C eine Stunde geschüttelt (200 rpm). Ausplattiert wurden jeweils 50 µl und jeweils 200 µl des Ansatzes auf vorgewärmte, mit 150 µl Ampicillin (50 µg/ml), 40 µl IPTG (0,24 g/ml) und 40 µl X-Gal (40 mg/ml) (2.7) vorbehandelten, LB-Agar Platten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.4.8.2 Transformation in BL21(DE3)pLysS kompetente Zellen

Bei der Transformation in BL21(DE3)pLysS kompetente Zellen wurden 1 µl eines, von einer vorhergegangenen Transformation, gewonnenen Plasmids direkt zu den kompetenten Zellen gegeben. Das weitere Verfahren ist unter 3.8.4.1 beschrieben. Die LB-Agar Platten wurden jedoch nur mit Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml, und nicht mit IPTG oder X-Gal, vorbehandelt.

#### 3.4.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Alle beschriebenen Plasmidisolierungsmethoden lag die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) zugrunde. Das Prinzip der Methode basiert auf der alkalischen Denaturierung von chromosomaler DNA mit einem hohen Molekulargewicht, während kovalent geschlossene zirkuläre DNA doppelsträngig bleibt.

#### 3.4.8.4 Plasmidpräparation mit dem Plasmidreinigungskit nach Seqlab

(Plasmid Präparationskit Protokoll, Seqlab)

2-5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. 1 ml der Übernachtskultur wurde für 10 Minuten bei 13000 rpm (Heraeus Sepatech) abzentrifugiert und das Pellet mit Tris Puffer (10 mM, pH 8.0) gewaschen, mit 100 µl Rnase versetzt und gut resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Lysispuffer (Fa. Seqlab) zugegeben, vier- bis sechsmal geschüttelt und mit 150 µl Neutralisierungspuffer (Fa. Seqlab) 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde dann 30 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (Fa. Greiner Labortechnik) überführt. Der Überstand wurde mit 2 VT 100% Ethanol versetzt, vermischt und 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit mindestens 1 ml 70 % Ethanol gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 5 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugiert (Fa. Heraeus Sepatech, Zentrifuge). Danach wurde der Ethanol Überstand abpipettiert und das Pellet bei 30°C in einem Vakuumtrockner (Fa. Christ) 15 Minuten getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und eine erfolgreiche Plasmidaufreinigung durch Agarose Gel Elektrophorese überprüft.

#### 3.4.8.5 Mini Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

(Qiaprep Miniprep Handbuch März 2001, Qiagen)

3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden mit einer Bakterienkolonie oder 100 µl einer entsprechenden Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden für 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Sepatech). Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 (Fa. Qiagen) resuspendiert und die Bakterienzellen durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 (Fa. Qiagen) durch schütteln lysiert. Zur Lyse der Bakterienzelle wurden die Proben nach der Zugabe von Puffer P2 5 Minuten stehen gelassen. Danach wurden 350 µl Puffer N3 (Fa. Qiagen) hinzugefügt, erneut durch umschütteln gemischt und 10 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugiert (Fa. Heraeus Sepatech, Zentrifuge). Die gewonnene Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde auf eine Qiaprep Säule (Silikasäulenmaterial) gegeben und 30-60 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule zuerst mit 500 µl Puffer PB (Fa. Qiagen) und dann mit 750 µl Puffer PE (Fa. Qiagen) gewaschen. Die Qiaprep Säule wurde eine weitere Minute zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Zur Elution wurden 50 µl Puffer EB

(Fa. Qiagen) auf die Säule gegeben, diese eine Minute stehen gelassen und dann 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Agarose Gel Elektrophorese überprüft.

#### **3.4.8.6 Midi Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung**

(Qiaprep Midiprep Handbuch, August 2003, Qiagen)

25 ml LB-Medium, das 50µg/ml Ampicillin enthielt, wurden mit 100 µl einer Dauerkultur des betreffenden Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Fa. Heraeus Christ, Zentrifuge). Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und die Bakterienzellen durch Zugabe von 250 µl Puffer P2, durch leichtes Schütteln, lysiert. Zur Denaturierung der DNA wurden die Proben nach der Zugabe von 4 ml Puffer P2 5 Minuten stehen gelassen. Danach wurden 4 ml Puffer N3 hinzugefügt und wieder durch leichtes Schütteln gemischt, 15-20 Minuten auf Eis stehen gelassen und dann 30 Minuten bei 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurde eine Qiagen-tip 100 Säule durch Zugabe von 4 ml QBT Puffer equilibriert. Danach wurde die gewonnene Plasmid-DNA aus dem Überstand auf die Qiaprep-tip 100 Säule (Fa. Qiagen) gegeben und konnte aufgrund des Gravitationsflusses in einem Röhrchen (Fa. Cellstar, Greiner Bio-One) aufgefangen werden. Daraufhin wurde die Säule mit 2x 10 ml QC Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt konnte die DNA mit 5 ml QF Puffer (Fa. Qiagen) eluiert werden. Das Eluat wurde mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert, dazu wurde das Eluat 30 Minuten bei 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 200 µl TE Puffer (2.7) aufgenommen. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch Agarose Gel Elektrophorese überprüft.

#### **3.4.9 Aufreinigung von PCR Fragmenten**

(Concert Rapid PCR Purification System Protokoll, Gibco BRL Life Technologies)

Zur Aufreinigung der Amplifikationsreaktion wurden 400 µl des Bindungspuffers (H1, Fa. Gibco BRL Life Technologies) hinzugefügt und gründlich vermischt. Währenddessen wurden 50 µl TE Puffer (2.7) auf 65 bis 70°C vorgeheizt. Die Probe wurde dann in ein Zentrifugationssäulchen überführt und 1 Minute bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, und anschließend das Eluat verworfen. Das Säulchen wurde mit 700 µl Waschpuffer (H2, Fa. Gibco BRL Life Technologies) bei 13000 rpm gewaschen, das Eluat erneut verworfen und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert,

um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Zur Elution wurden 50 µl des erwärmten TE Puffers (2.7) hinzugegeben, 1 Minute stehen gelassen und dann 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die gereinigte Amplifikationsreaktion wurde auf einem 1%igem Agarose Gel überprüft.

### **3.4.10 Sequenzierung**

Zur Sequenzierung wurden die gereinigten Proben eingetrocknet und zu MWG Biotech, München geschickt. Die Sequenzdaten wurden per e-mail und im Chromas Format verschickt und mit Hilfe von entsprechender software „DNA Sequencher“ analysiert.

## **3.5 Proteinchemische Methoden**

### **3.5.1 Kultivierung von *E. coli* Stämmen und Klonen**

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 3 ml LB-Medium unter Zugabe von 15 µl Ampicillin (50 µg/ml) mit einer vereinzelt *E. coli* Zellkolonie oder mit 100 µl einer entsprechenden Dauerkultur beimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Für das Anlegen von Dauerkulturen wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 1 ml Glycerin versetzt und durch Schütteln auf einem Minishaker (Fa. IKA Labortechnik) vermischt. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei – 80°C.

### **3.5.2 Proteinextraktion aus *E. coli* Expressionsstämmen**

Die Dauerkultur des Überexpressionstammes (100 µl) wurde in 200 ml LB-Medium, das 50µg/ ml Ampicillin enthielt, aufgenommen und über Nacht (15,5 Stunden) bei 37°C geschüttelt. Nach weiterem Schütteln unter Zusatz von 50 ml LB-Medium wurden die Kulturen mit 200 µl einer 0,5 M IPTG Lösung induziert. Vor der Induktion und nach ein, zwei, drei und vier Stunden wurden 1 ml Proben gezogen (8 ml für die Polyaminbestimmung). Die Proben wurden durch Zentrifugation pelletiert und bei – 80° C eingefroren.

Für die Proteinextraktion wurden die 1 ml Proben mit 400 µl Lysispuffer (2.7) gewaschen, der Überstand abgenommen und nochmals in 400 µl Lysispuffer aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung für 2 x 30 Sekunden bei 4°C (30 % Amplitude, Mikrospitze 3 mm/ 1/8“, Fa. Branson).

Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer für 10 Minuten bei 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C wurden 100 µl abgenommen mit dem SDS- Probenpuffer (2.7) im Verhältnis 1:1 gemischt. Zum Laden des Gels wurden die Proben 5 Minuten auf 96°C erhitzt und 20 µl zur Proteintrennung auf ein SDS – Polyacrylamidgel aufgetragen.

### 3.5.3 SDS - Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen

(Laemmli, 1970) (Protokoll: Manniatis/ Chapter 18.52 detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes)

Bei der SDS - PAGE (Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamidgelelectrophoresis) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Denaturierung erfolgt durch SDS (Natriumdodecylsulfat), dass sich an Proteine anlagert und so deren Eigenladung überlagert, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Diese Methode liefert Informationen über das Molekulargewicht von Proteinmonomeren. In den hier geschilderten Experimenten handelt es sich um eine diskontinuierliche SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970). Die Proteine werden in einem Sammelgel mit pH-Wert 6,8 konzentriert, aber die eigentliche Auftrennung erfolgt im Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8. Die Laufstrecke und die Dichte des Gels bestimmen die Auftrennung der Proteine. Da kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern, werden für ihre Auftrennung hochprozentige Gele eingesetzt, bei größeren Proteinen werden niedrigprozentige Gele verwendet. Die Proteingröße wird in Dalton (Da) angegeben.

In unseren Experimenten wurden 10 %ige Trenngele eingesetzt. Sie wurden zwischen zwei abgedichtete, speziell angefertigte Glasplatten (Fa. Biometra) gegossen. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde ein Kamm mit Geltaschen für die Proteinproben eingeführt. Im Sammelgel konzentrieren sich die Proteine, um dann später im Trenngel gleichmäßig aufgetrennt zu werden. Die Proteinextrakte wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer (2.7) versetzt und 5 Minuten bei 96°C denaturiert. 10 - 20 µl der Proteinproben sowie 7,5 µl des jeweiligen Größenstandards (Fa. MBI Fermentas) wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V ungefähr 1 ½ Stunden durchgeführt.

Probenpuffer:	20 mM Tris pH 6,8 2 mM EDTA 2 % SDS 20 % Glycerin 0,3 % Bromphenolblau wurden vermischt und bei 4°C gelagert
Laufpuffer:	1 x MOPS (2.7)
Sammelgel:	650 µl 0,8% Bisacrylamid/30% Acrylamid (Rotiphorese Gel 30) 1,25 ml 4x Tris Puffer (0,5M Tris/ HCL pH 6,8, 0,4 % SDS) 3,05 ml H <sub>2</sub> O bidest. 25 µl 10 % APS 5 µl TEMED
Trenngel:	2,5 ml 0,8% Bisacrylamid/30% Acrylamid (Rotiphorese Gel 30) 1,25 ml 4x Tris Puffer (0,5M Tris/ HCL pH 8,8, 0,4 % SDS) 3,15 ml H <sub>2</sub> O bidest. 30 µl 10 % APS 8 µl TEMED

Nach der Auftrennung der Proteine wurden die Gele entweder mit einer Coomassie Färbelösung gefärbt oder es wurde ein Western Blot (3.6.6) durchgeführt. Zur Färbung der Polyacrylamid-Gele wurden diese etwa 1 Stunde in der Färbelösung auf einem Schüttler (Fa. Bachofer) geschüttelt. Im folgenden Schritt wurden die Proteingele in Entfärbelösung entfärbt.

Färbelösung:	25 ml Coomassie blue R250 100 ml Methanol 20 ml Essigsäure 55 ml H <sub>2</sub> O bidest. 1g Coomassie blue R250 wurde zuvor in 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst und filtriert.
--------------	--

Entfärber:                    100 ml Methanol  
                                     20 ml Essigsäure  
                                     80 ml H<sub>2</sub>O bidest.

Zum Trocknen wurden die Gele mit Cellophanfolie in einem speziellen Rahmen (Fa. Roth) eingespannt. Vor dem Einspannen wurde das Gel in einer Glycerin-Ethanol Lösung für mindestens 30 Minuten entwässert. Bei dem Einspannen musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen die beiden Folien geraten. Das Trocknen dauerte mindestens 12 Stunden.

### **3.5.4 Aufreinigung der exprimierten Proteine über eine Nickel – Chelataffinitätschromatographie Säule**

(Ni-NTA Spin Kit Handbuch Februar 2003, Qiagen)

Die Nickel-Affinitätschromatographie stellt eine einfache Methode für die Aufreinigung von Proteinen mit 6 Histidin - Enden am C-terminalen oder N-terminalen Ende von bakteriellen Expressionskulturen dar. Ni-NTA Spin Kits enthalten eine Matrix aus Nickel-Nitrilotriessigsäure, die mit den Histidin Resten C-terminalen oder N-terminalen Ende der überexprimierten Proteine ein Chelat bilden. Somit können die Proteine in einem „Ein-Schritt“- Reinigungsmechanismus von anderen Proteinen abgetrennt werden. Der Ni-NTA Spin Kit ermöglicht das schnelle Aufreinigen von Rohextrakten unter nativen oder auch denaturierenden Bedingungen.

Die exprimierten Proteine in dieser Arbeit wurden unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Die Dauerkulturen des Überexpressionstammes (100 µl) wurde in 50 ml LB-Medium, das 50µg/ ml Ampicillin enthielt, angeimpft und über Nacht (15,5 Stunden) bei 37°C geschüttelt. Nach weiterem Schütteln unter Zusatz von 50 ml LB-Medium wurden die Kulturen mit 200 µl einer 0,5M IPTG Lösung induziert. Nach insgesamt vier Stunden wurde die Kultur durch Zentrifugation (15 Minuten, 13000 rpm, RT) abgeerntet. Danach wurden die Zellen in 1 ml Lysispuffer aufgenommen, mit 1 mg/ ml Lysozym versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung für 6 x 10 Sekunden (30 % Amplitude, Mikrospitze 3 mm / 1/8“, Fa. Branson). Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer für 30 Minuten bei 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C wurde der Überstand auf eine mit 600 µl Lysispuffer equilibrierte Ni-NTA - Säule gegeben und 2 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule zweimal mit 600 µl Waschpuffer gewaschen und dann mit 200 µl Elutionspuffer eluiert.

Die eluierten Protein - Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert, um zu sehen bei welchem Schritt das gesuchte Protein heruntergewaschen wird.

Lysispuffer:                    50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                      300 mM NaCl  
                                      10 mM Imidazole  
                                      der pH wurde auf 8.0 eingestellt

Waschpuffer :                 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                      300 mM NaCl  
                                      20 mM Imidazole  
                                      der pH wurde auf 8.0 eingestellt

Elutionspuffer:                50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                      300 mM NaCl  
                                      250 mM Imidazole  
                                      der pH wurde auf 8.0 eingestellt

### **3.5.5 Gehaltsbestimmung von Proteinen nach einer modifizierten Methode nach Bradford**

(Advanced Protein Assay Reagent (CAT#ADV01) Protokoll)

Bei der im folgendem beschriebenen Technik handelt es sich um eine modifizierte Methode nach Bradford. Der Proteingehalt der einzelnen Proben wurde in einer 96-Loch Microtiter Platte mit Hilfe eines „Plate reader“ (Spectra Max 340PC, Fa. Molecular Device) bestimmt. Hierzu wurden jeweils 10 µl der zu untersuchenden Protein Lösung in die Vertiefungen A1 und A2 gegeben. Anschließend wurde 0,3 ml 1xADV01 in die Vertiefungen A1, A2, B1 und B2 pipettiert. Die Proben in B1 und B2 dienen als Kontrolle ohne Proteinprobe. Die Microtiter Platte wurde in den „Plate Reader“ gestellt, kurz geschüttelt und dann bei einer Wellenlänge von 595nm photometrisch vermessen.

Kalkulation: (gemessene OD) x (37,5) x 30\* x (gegebenen Falls die Verdünnung der Proteinlösung)

30\* ist die Verdünnung des Proteins in der ADV01 Lösung

### 3.6 Western Blot

(Novex Western Transfer Apparatus Instructions)

Der Western Blot ist eine Methode, um Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einer positiv geladenen Membran immunologisch nachzuweisen. Um die Proteine auf die Nitrozellulose Membran (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) zu transferieren wurde die Elektroblob Methode (Fa. Novex) verwendet. Die Membran und das Filter Papier (Fa. Whatmann) wurde zunächst genau auf die Größe des Gels zugeschnitten. Für den Transfer wurden zunächst zwei Lagen Whatman 3 MM Filterpapier in Transferpuffer getränkt und auf die untere Elektrode der Blotapparatur gelegt. Darauf wurde das Acrylamid-Gel, dann die getränkte Nitrozellulose Membran und dann wieder zwei Lagen Filterpapier geschichtet. Danach wurde die obere Elektrode aufgelegt und die Spannungsquelle angeschlossen. Der Transfer dauerte 2 Stunden bei einer Spannung von 25 V.

Transfer Puffer:                    12 mM Tris  
    96 mM Glycin  
    20 %Methanol

#### 3.6.1 Detektion

(Amersham Blotting Detection Kit Protokoll)

Nach einem Transfer der Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose- Membran wurde die Membran in TBS-T mit 5 % fettfreiem Milchpulver über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Im Anschluss daran wurde die Membran 2 x 10 Minuten in TBS-T Puffer (2.7) gewaschen. Der primäre Antikörper wurde nach Vorschrift mit TBS Puffer (2.7) verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nach einem zweiten Waschschrift von 2 x 10 Minuten in TBS-T Puffer wurde der zweite Antikörper, ein anti IgG (Maus oder Kaninchen) – Biotin - Konjugat (Fa. Sigma), nach Vorschrift in TBS Puffer verdünnt und die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur darin inkubiert.

Danach wurde die Membran erneut 2 x 10 Minuten mit TBS-T Puffer gewaschen, und Streptavidin Alkalische Phosphatase - Konjugat, im Verhältnis 1:10000 mit TBS - Puffer verdünnt, zugesetzt, und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde erneut 2 x 10 Minuten in TBS-T - Puffer gewaschen. Das Substrat [70 µl NBT/BCIP Stammlösung (Fa. Roche)] wurde in 10 ml 1x Detektionspuffer zu der Membran gegeben und es wurde unter Ausschluss von Licht, entwickelt. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung des Phosphatrestes aus dem Substrat. Der Farbstoff oxidiert an der Luft zum blauen Indigofarbstoff. Die Anfärbung erfolgte so lange, bis die gewünschten Banden gut sichtbar waren (in der Regel 5 bis 30 Minuten bei RT, manchmal mehrere Stunden). Die Reaktion wurde durch intensives Waschen mit Wasser gestoppt.

10 x Detektionspuffer :            100 mM Tris  
    100 mM NaCl  
    wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. aufgelöst und der pH  
    mit HCL auf 9,5 eingestellt und bei 4°C gelagert.

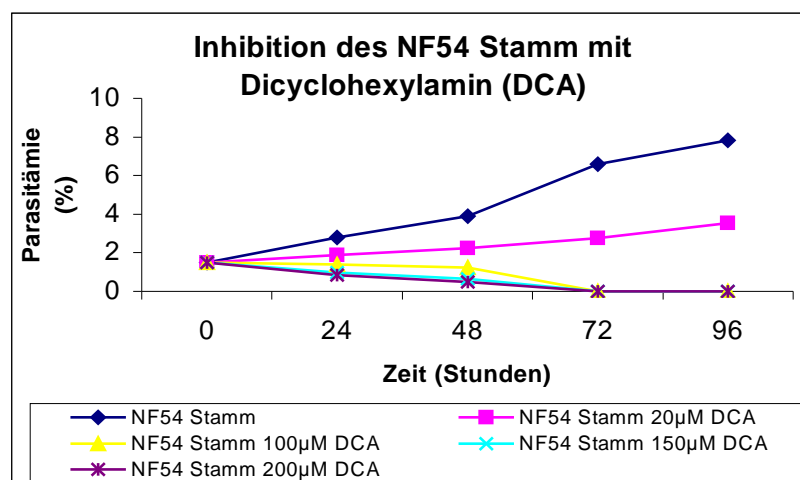
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Biochemische Untersuchungen durch Inhibitionsexperimente mit den *Plasmodium falciparum* Stämmen NF54, Dd2 und R

#### 4.1.1 Der Effekt des Spermidinsynthese Inhibitors Dicyclohexylamin auf Entwicklungsstadien von *Plasmodium falciparum*

In einem der ersten Experimente wurde der Effekt von Dicyclohexylamin (DCA), einem Inhibitor der Spermidinsynthese in Pro- und Eukaryonten, auf das *in vitro* Wachstum von zwei *P. falciparum* Stämmen, mit unterschiedlicher Chloroquin Resistenz, untersucht. Während der NF54 - Stamm Chloroquin sensibel (CQS) ist, ist der R-Stamm Chloroquin resistent (CQR). Die eingesetzten Konzentrationen von DCA betragen bei dem NF54 - Stamm zwischen 20  $\mu$ M und 200  $\mu$ M. Die Parasitämie wurde jeweils nach 24 Stunden über einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt. Die Ausgangsparasitämie der *P. falciparum* Kulturen betrug 1,5%.

Bei einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M bis 200  $\mu$ M DCA wurde beim NF54 - Stamm eine vollständige Inhibition nach 72 Stunden festgestellt (Abb. 4.1a). Sogar bei einer Inhibitorkonzentration von 20  $\mu$ M konnte eine 50% Inhibition des Wachstums festgestellt werden. Der errechnete  $IC_{50}$ -Wert lag bei 97.2  $\mu$ M nach 48 Stunden für den NF54 - Stamm (Tabelle 3). Die Ergebnisse in der Tabelle 1 zeigen, dass Dicyclohexylamin keinen spezifischen Einfluss auf die Entwicklung eines bestimmten erythrozytären Stadiums, wie Trophozoiten und Schizonten, hat.

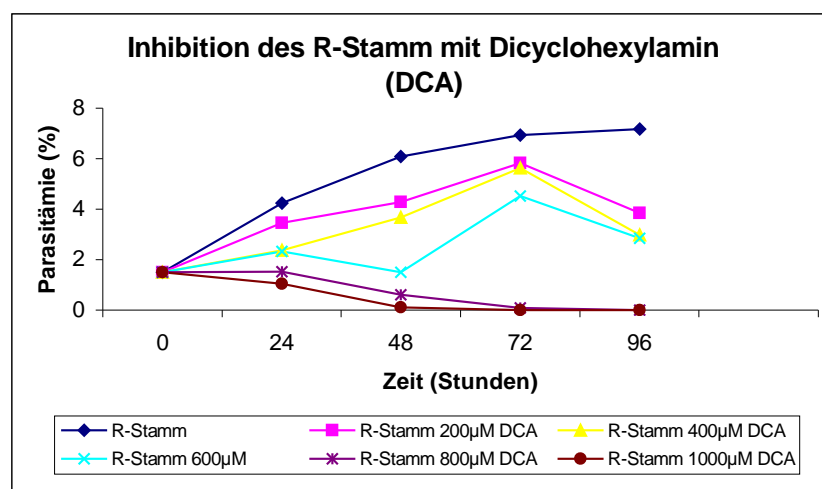


4.1 a. Abbildung: Wachstum des *P. falciparum* NF54 - Stammes nach Gabe verschiedener Konzentrationen von DCA. Die Parasiten wurden nach Trager und Jensen (1976) in einer aus 12 Bohrungen bestehenden Microtiter Platte, über einen Zeitraum von 4 Tagen, kultiviert. Die Parasitämie wurde anhand von Ausstrichen und anschließender Giemsa Färbung bestimmt.

Stamm	Inhibitorkonzentration	Parasitämie (%)	Trophozoiten	Schizonten
NF54	Kontrolle	3,9	4,0 ± 1	2,9 ± 0,4
NF54	20 µM DCA	2,23	1,17 ± 0,7	2,7 ± 0,81
NF54	100 µM DCA	1,8	2,0 ± 0,5	1,8 ± 0,2
NF54	150 µM DCA	0,96	1,9 ± 0,5	0,02 ± 0
NF54	200 µM DCA	0,86	0	1,7 ± 0,1

1. Tabelle: Anzahl der Trophozoiten und Schizonten des NF54 - Stammes nach 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Dicyclohexylamin (Kaiser, *et al.*, 2001a).

In den weiteren Experimenten wurde der Einfluss von Dicyclohexylamin auf den Chloroquin resistenten R-Stamm untersucht (Abb. 4.1b). Die eingesetzten Konzentrationen von DCA betragen bei dem R-Stamm zwischen 200 µM und 1000 µM. Inhibitorkonzentrationen unter 200 µM zeigten so gut wie keinen Einfluss auf die Parasitämie (nicht dargestellt). Bei Konzentrationen zwischen 600 – 1000 µM konnte eine 50% Abnahme der Parasitämie nach 48 Stunden beobachtet werden, wobei eine vollständige Inhibition nach 72 Stunden mit einer Konzentration von 1000 µM erreicht wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt. Die Abbildung 4.2 und die Tabelle 2 zeigen, dass beim Einsatz von Konzentrationen zwischen 600 µM und 1000 µM, die größte Abnahme an Trophozoiten und Schizonten nach 48 Stunden erreicht wurde. Die in Tabelle 3 aufgeführten IC<sub>50</sub>-Werte machen deutlich, dass die Inhibition des NF54 - Stammes mit Dicyclohexylamin am effektivsten war, da der R-Stamm einen IC<sub>50</sub>-Wert von 501 µM aufwies und somit ca. fünfmal so hoch war wie der des NF54 - Stammes.



4.1b Abbildung: Wachstum des *P. falciparum* R-Stammes unter verschiedenen Konzentrationen von DCA. Die Parasiten wurden, wie in der Legende von Abb. 4.1a beschrieben, kultiviert und die Parasitämie bestimmt.

Stamm	Inhibitorkonzentration	Parasitämie (%)	Trophozoiten	Schizonten
R-Stamm	Kontrolle	4,8	4,2 ± 10,8	5,4 ± 0,6
R-Stamm	200 µM DCA	4,28	4,06 ± 0,7	4,1 ± 0,5
R-Stamm	400 µM DCA	3,7	6,0 ± 1,0	1,4 ± 0,5
R-Stamm	600 µM DCA	1,5	0,9 ± 0,4	2,1 ± 0,8
R-Stamm	800 µM DCA	0,6	0,2 ± 0	1,0 ± 0,2
R-Stamm	1000 µM DCA	0,1	0,2 ± 0	0

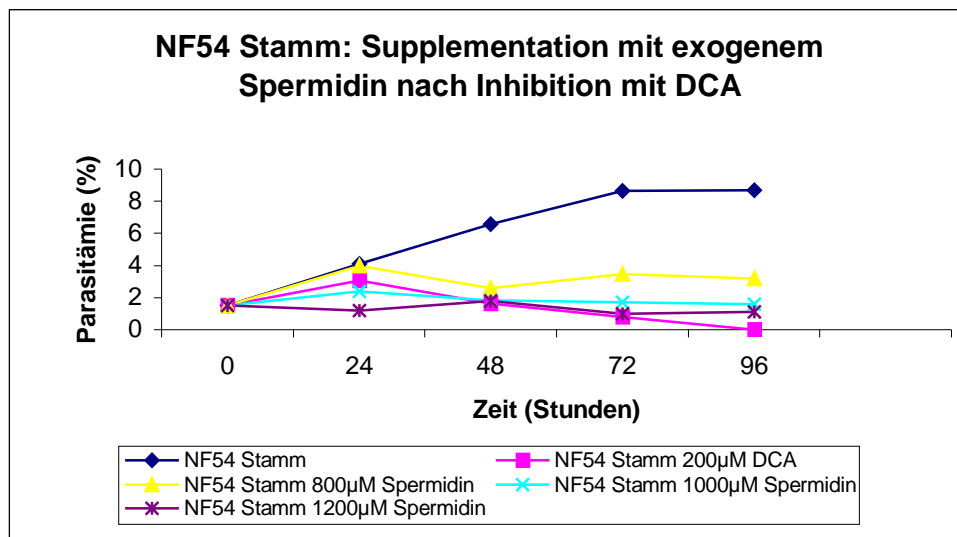
2. Tabelle: Die Anzahl der Trophozoiten und Schizonten des R-Stammes nach 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Dicyclohexylamin (Kaiser, *et al.*, 2001a).

Inhibitor	Stamm	IC <sub>50</sub> -Werte (µM)
Agmatin	NF54	431
	R-St	340
Dicyclohexylamin	NF54	97.2
	R-St	501
1,7-Diaminoheptan	NF54	466
	R-St	319

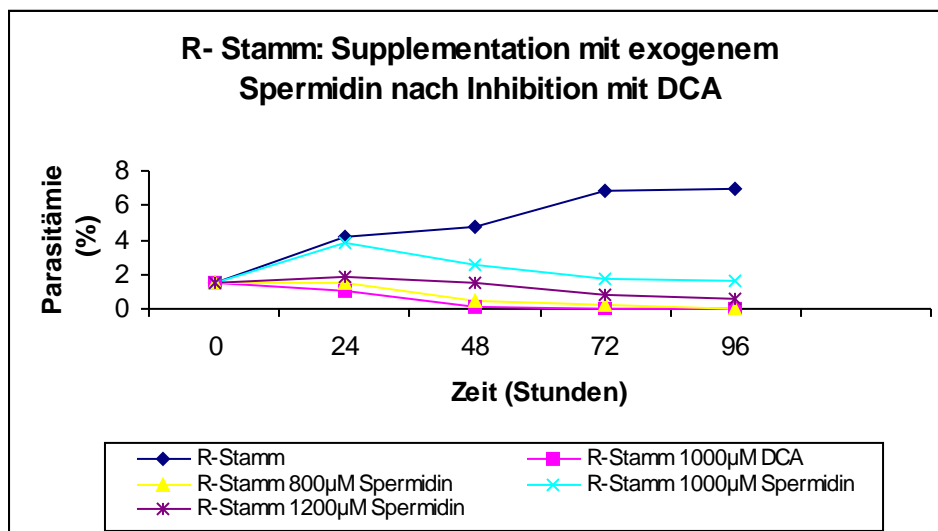
3. Tabelle: IC<sub>50</sub>-Werte des NF54 und R-Stammes 48 Stunden nach der Behandlung mit Agmatin, Dicyclohexylamin und 1,7-Diaminoheptan (Kaiser, *et al.*, 2001a).

#### 4.1.2 Supplementation von exogenem Spermidin nach der Inhibition mit Dicyclohexylamin

Durch Supplementation von exogenem Spermidin sollte gezeigt werden, dass DCA, spezifisch die Spermidinsynthase (SPS) hemmt. Dicyclohexylamin ist ein Inhibitor der SPS in Prokaryonten und Eukaryonten. Nach der Inhibition mit 200 µM DCA im Fall des NF54 - Stammes (CQS) und 1000 µM DCA im Fall des R-Stammes (CQR), wurde für beide *P. falciparum* Stämme eine Konzentration von 800 µM bis 1200 µM Spermidin zur Supplementation eingesetzt. Im Falle des R-Stammes war eine Supplementation mit 1000 µM exogenem Spermidin notwendig (Abb. 4.2 b), im Falle des NF54 - Stammes konnte durch Zugabe von 800 µM exogenem Spermidin der inhibitorische Effekt von DCA teilweise aufgehoben werden (Abb. 4.2a). Der NF54 - Stamm zeigte einen weitaus besseren Supplementationseffekt im Vergleich zum R-Stamm.



4.2 a Abbildung: Supplementation des *P. falciparum* NF54 - Stammes mit exogenen Spermidin Konzentrationen zwischen 800 µM und 1200 µM nach Inhibition mit 200 µM DCA. Durch Supplementation mit 800 µM exogenem Spermidin konnte die Wachstumsinhibition teilweise aufgehoben werden.



4.2 b Abbildung: Supplementation des *P. falciparum* R-Stammes mit exogenem Spermidin Konzentrationen zwischen 800 µM und 1200 µM, nach der Inhibition mit 1000 µM DCA. Durch Supplementation mit 1000 µM Spermidin konnte die Inhibition des R-Stammes teilweise aufgehoben werden.

#### 4.1.3 Die inhibitorische Wirkung von 1,7-Diaminoheptan auf das Wachstum und die Vermehrung der *Plasmodium falciparum* Stämme NF54 und R

Da eine Hypusinsynthese in *P. falciparum* zu vermuten war, wurde ein möglicher Effekt von 1,7-Diaminoheptan, einem Inhibitor der Deoxyhypusinsynthese (DHS), auf das Wachstum und die Vermehrung von *P. falciparum* in *in vitro* Kulturen untersucht. 1,7-Diaminoheptan, ist ein Spermidinanalogen und konkurriert mit Spermidin, einem wichtigen Substrat der Deoxyhypusinsynthese (DHS), um die Bindungsstellen des Enzyms (Lee *et al.*, 1998).

In den Experimenten wurden Konzentrationen des Inhibitors zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  für den NF54 - Stamm (CQS), und zwischen 200  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  für den R-Stamm (CQR) eingesetzt. Die Parasitämie wurde jeweils nach 24 Stunden über einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt. Die Ausgangsparasitämie betrug 1,5%. Bei dem NF54 - Stamm konnte eine eindeutige Abnahme der Parasitämie nach 48 Stunden beobachtet werden (Abb. 4.3a). Nach 48 Stunden war zunächst eine geringfügige Zunahme der Parasitämie in fast allen Konzentrationsbereichen bis auf die Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Nach 72 Stunden trat jedoch eine Erniedrigung der Parasitämie auf.

Es konnte hinsichtlich der Entwicklungsstadien kein wesentlicher Unterschied zwischen der Abnahme von Trophozoiten und Schizonten festgestellt werden (Tabelle 4). Der errechnete  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei 466  $\mu\text{M}$  nach 48 Stunden für den NF54 – Stamm (Tabelle 3).

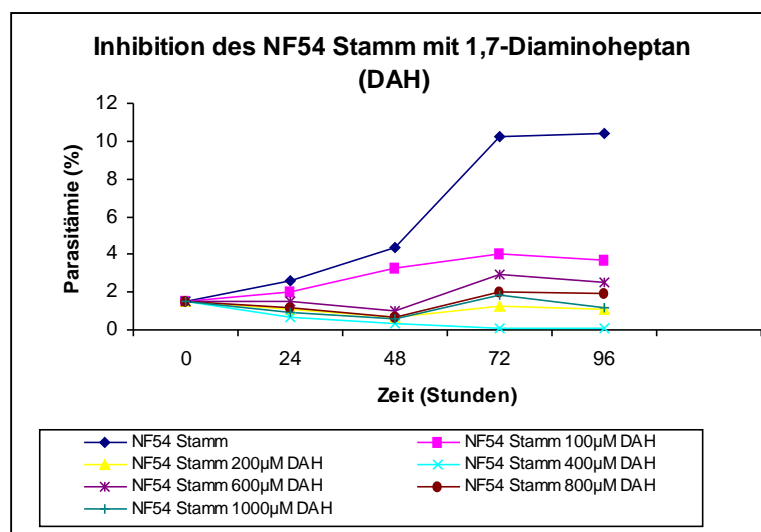
Für den R-Stamm wurde erst bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  nach 96 Stunden eine vollständige Hemmung des Wachstums erzielt (Abb. 4.3b). Die Umwandlung von Trophozoiten zu Schizonten wurde nicht beeinflusst. Der errechnete  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei 319  $\mu\text{M}$  nach 48 Stunden für den R-Stamm (Tabelle 3) und war somit geringer als der des NF54 - Stammes. Im Gegensatz zu den Inhibitorexperimenten mit DCA konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert des NF54 - Stamm und des R-Stamm festgestellt werden und auch der Effekt des Inhibitors auf die beiden Entwicklungsstadien wies keine Unterschiede auf (Tabelle 4).

Diese Ergebnisse ließen die Existenz einer Deoxyhypusinsynthese (DHS) in *P. falciparum* vermuten.

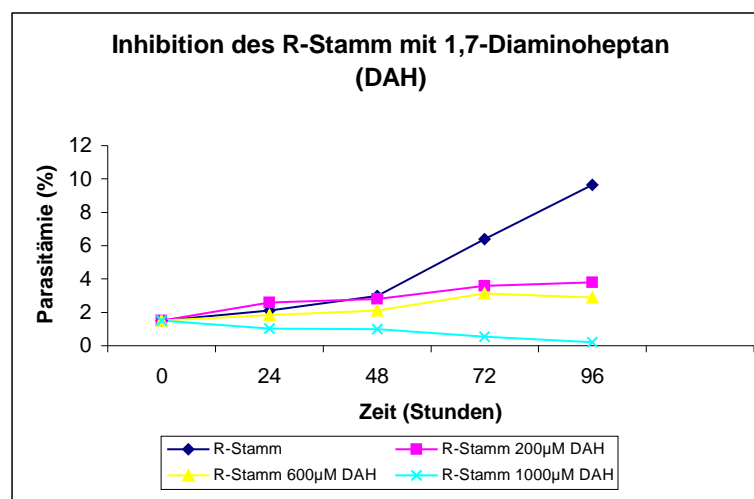
Stamm	Inhibitorkonzentration	Parasitämie (%)	Trophozoiten	Schizonten
NF54	Kontrolle	4,0	4,0 $\pm$ 1	4,0 $\pm$ 0,5
NF54	100 $\mu$ M DAH	3,3	2,2 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,5
NF54	200 $\mu$ M DAH	1,17	2,1 $\pm$ 0,5	1,24 $\pm$ 0,1
NF54	400 $\mu$ M DAH	0,9	0,8 $\pm$ 0,1	1,08 $\pm$ 0,1
NF54	1000 $\mu$ M DAH	0,5	0,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
R-Stamm	Kontrolle	3,0	2,9 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 1,8
R-Stamm	200 $\mu$ M DAH	2,8	3,0 $\pm$ 2,0	2,6 $\pm$ 2,0
R-Stamm	600 $\mu$ M DAH	2,1	2,3 $\pm$ 1,26	2,0 $\pm$ 1,0
R-Stamm	1000 $\mu$ M DAH	1,0	1,1 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,5

4. Tabelle: Der Einfluss verschiedener 1,7 Diaminoheptan Konzentrationen auf die Anzahl der Schizonten und Trophozoiten des NF54 und R-Stammes nach 48 Stunden (Kaiser, et al., 2001a).

## 4.3 a



## 4.3 b



4.3 a und b Abbildung: Der Einfluss verschiedener Konzentrationen von 1,7-Diaminoheptan auf das Wachstum der *P. falciparum* Stämme NF54 und R. Der Verlauf des Experiments ist in der Legende von Abb. 4.1.a beschrieben.

#### 4.1.4 Untersuchungen zum inhibitorische Effekt von Agmatin auf das Wachstum und die Vermehrung der *Plasmodium falciparum* Stämme NF54 und R

Agmatin, ein Struktur analogon des Putrescin stellt in höheren Pflanzen einen moderaten Inhibitor der pflanzlichen Homospermidinsynthese (HSS) dar (Böttcher, 1994). Agmatin ist ein biogenes Amin mit der Funktion, eine Anzahl von Nicht-Rezeptor vermittelten Prozessen in Säugetier-Zellen, einschließlich den intrazellulären Polyamin Gehalt und die Stickoxiderzeugung zu regulieren (Satriano *et al.*, 2001). Auch wird Agmatin eine Rolle als Neurotransmitter zugeschrieben, die jedoch Rezeptor-vermittelt ist (Reis *et al.*, 2000, Raasch *et al.*, 2001). Um indirekt das Vorkommen einer HSS in *P. falciparum* zu untersuchen, wurden Inhibitorexperimente mit Agmatin mit dem Chloroquin-sensitiven (CQS) Stamm NF54 und dem Chloroquin-resistenten (CQR) R-Stamm durchgeführt.

In den Experimenten wurden Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  für den NF54 - Stamm (CQS) und zwischen 200  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  für den R-Stamm (CQR) eingesetzt. Der Verlauf des Inhibitorexperiments erfolgte wie unter 4.1.4 beschrieben.

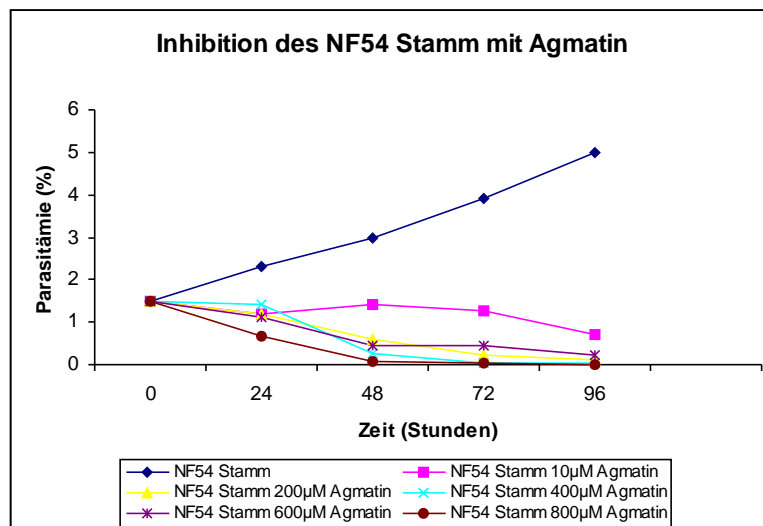
Die Wachstumskurve des NF54 - Stammes (CQS) nach Agmatingabe zeigte, dass bereits 10  $\mu\text{M}$  Agmatin ausreichend waren, die Parasitämie nach 24 Stunden signifikant zu verringern (Abb. 4.4a). Die effektivste Wachstumsinhibition für alle eingesetzten Konzentrationen war für den NF54 - Stamm zwischen 48 und 72 Stunden zu beobachten. Im Falle des R-Stammes (CQR) war eine wesentlich höhere Konzentration an Agmatin (200  $\mu\text{M}$ ) erforderlich, um eine inhibitorische Wirkung nachzuweisen (Abb. 4.4b). Die nach 48 Stunden ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte allerdings wichen stammspezifisch nicht signifikant voneinander ab und lagen bei 431  $\mu\text{M}$  für den NF54 - Stamm und 340  $\mu\text{M}$  für den R-Stamm (Tabelle 3). Beim R-Stamm und auch beim NF54 - Stamm konnte eine vollständige Inhibition nach 72 Stunden bei einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  beobachtet werden.

Die Entwicklung von Trophozoiten zu Schizonten blieb durch den Inhibitor unbeeinträchtigt (Tabelle 5). Aufgrund dieser Daten wurde das Vorliegen einer separaten HSS vermutet.

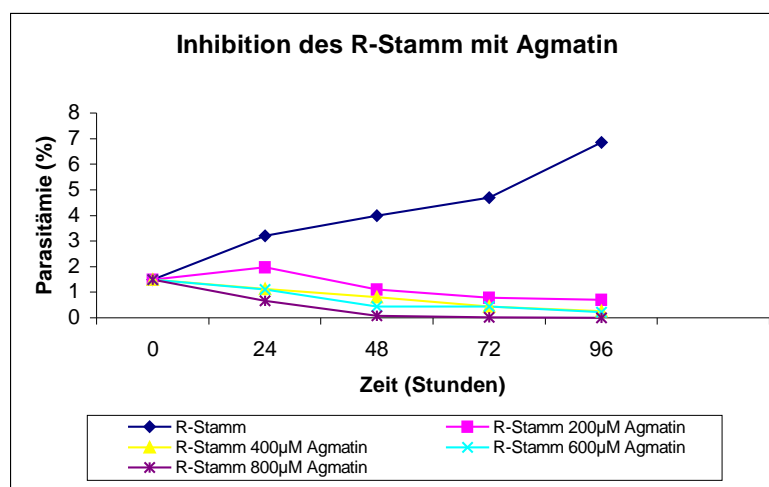
Stamm	Inhibitorkonzentration	Parasitämie (%)	Trophozoiten	Schizonten
NF54	Kontrolle	5,8	8,0 ± 1	2,6 ± 0,2
NF54	10 µM Agmatin	1,15	1,42 ± 0,89	0,94 ± 0,2
NF54	200 µM Agmatin	0,6	0,25 ± 0,01	0,98 ± 0,1
NF54	400 µM Agmatin	0,16	0,04 ± 0,01	0,28 ± 0,01
NF54	800 µM Agmatin	0,05	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
R-Stamm	Kontrolle	4,0	6,0 ± 1,5	2,0 ± 1,0
R-Stamm	200 µM Agmatin	1,1	0,21 ± 0,8	2,5 ± 1,0
R-Stamm	400 µM Agmatin	0,8	0,21 ± 0,6	2,5 ± 1,0
R-Stamm	600 µM Agmatin	0,44	0	1,0 ± 0,5
R-Stamm	800 µM Agmatin	0,08	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,5

5. Tabelle: Effekt von Agmatin auf die beiden erythrozytären Stadien, Trophozoiten und Schizonten, des NF54 und R-Stammes nach 48 Stunden (Kaiser, et al., 2001a).

## 4.4 a



## 4.4 b



4.4a und b Abbildung: Wachstum der *P. falciparum* Stämme NF54 und R bei verschiedenen Konzentrationen von Agmatin. Die Parasiten wurden, wie in der Legende von Abb. 4.1a beschrieben, kultiviert und die Parasitämie bestimmt.

#### 4.1.5 Bestimmung des intrazellulären Spermidin Gehalts des *Plasmodium falciparum* R- Stammes und des NF54 - Stammes nach der Inhibition mit Dicyclohexylamin, 1,7-Diaminoheptan und Agmatin

Da Spermidin das Hauptpolyamin in *P. falciparum* ist, wurde vor und nach der Inhibition mit Inhibitoren, die den Spermidingehalt beeinflussen, eine Polyaminanalyse durch GC/MS Analyse (3.2.2) durchgeführt. Der Spermidingehalt des Chloroquin-sensitiven (CQS) NF54 und Chloroquin-resistenten (CQR) R-Stammes wurde vor und nach der Inhibition mit Dicyclohexylamin (DCA), 1,7-Diaminoheptan (DAH) und Agmatin in einer Konzentration von je 200  $\mu\text{M}$ , nach 48 Stunden (Tabelle 6), bestimmt. Die eingesetzte Konzentration der drei Inhibitoren betrug 200  $\mu\text{M}$ , da durch diese Konzentration eine starke Abnahme der Parasitämie nach 24 Stunden erzielt wurde. Spermidin ist in nicht infizierten Erythrozyten vorhanden. Der gemessene Wert betrug 1,16 pmol pro  $10^6$  Erythrozyten (Tabelle 6). Der Spermidin Gehalt des (CQS) NF54 - Stammes und des (CQR) R- Stammes unterschieden sich signifikant. Während der NF54 - Stamm 35 pmol Spermidin pro  $10^6$  infizierter Erythrozyten aufwies, hatte der R-Stamm einen Spermidin Gehalt von 11,6 pmol Spermidin pro  $10^6$  infizierte Erythrozyten (Tabelle 6). Nach der Inhibition mit den drei Inhibitoren konnte jedoch kein Spermidin bestimmt werden. Die Tatsache, dass die beiden Stämme einen beachtlichen Unterschied in ihrem Spermidin Gehalt aufwiesen, wird unterstützt durch die Ergebnisse der Inhibitorexperimente nach der Supplementation von exogenem Spermidin. Bei dem (CQS) NF54 - Stamm, konnte eine Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  Spermidin teilweise den inhibitorischen Effekt verhindern, während 1000  $\mu\text{M}$  Spermidin benötigt wurden, um den Wachstumseffekt des (CQR) R-Stammes wiederherzustellen.

<i>P. falciparum</i> Stämme	Zeit [Stunden]	Inhibitor [ $\mu\text{M}$ ]	Spermidin Gehalt [ $\text{pmol}/10^6\text{pE}$ ]
NF54	48	/	35
R	48	/	11,6
R	48	200 $\mu\text{M}$ DCA	Nicht detektierbar (0)
R	48	200 $\mu\text{M}$ DAH	Nicht detektierbar (0)
R	48	200 $\mu\text{M}$ Agmatin	Nicht detektierbar (0)
Kontrolle <sup>o</sup>	48	/	1,16

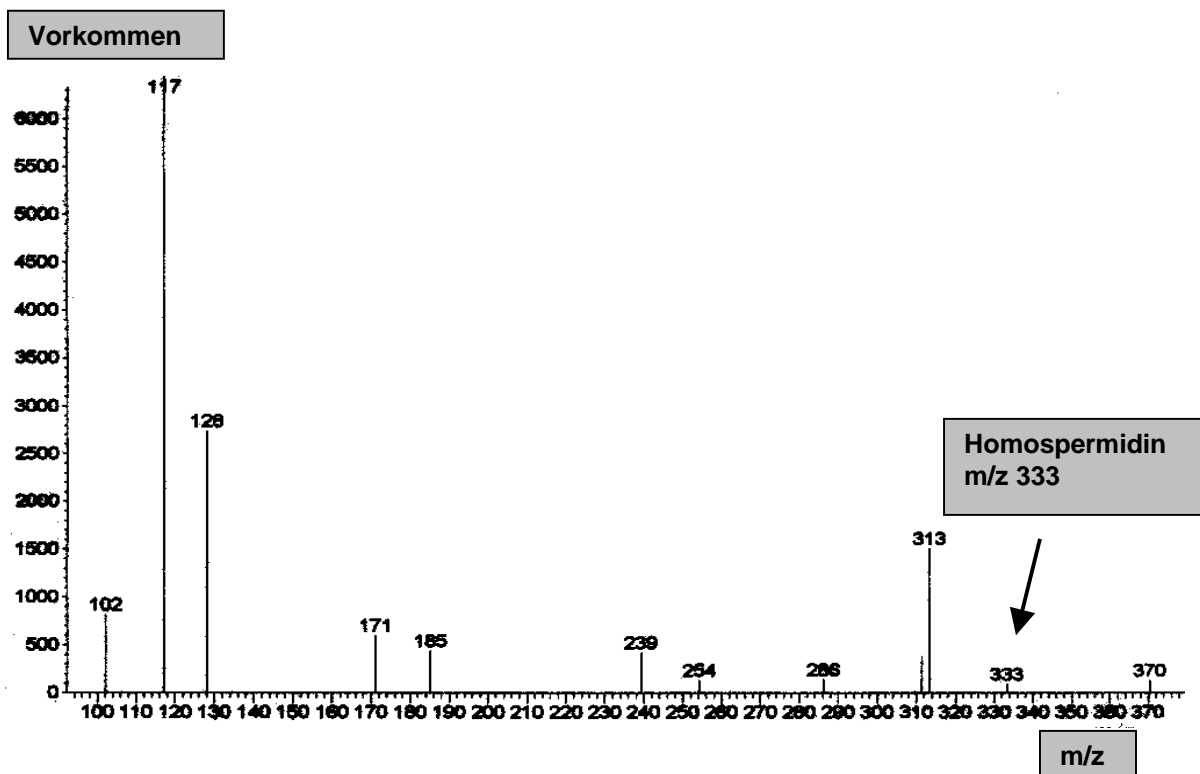
6. Tabelle: Der Effekt von Dicyclohexylamin, 1,7-Diaminoheptan und Agmatin auf den Spermidingehalt in *P. falciparum* infizierten Erythrozyten der Stämme NF54 und R. Die Kulturen wurden abgeerntet und analysiert wie unter 3.2.2 beschrieben (Kaiser, *et al.*, 2001a).

\* Pro infizierten Erythrozyten      <sup>o</sup> nicht infizierte Erythrozyten

#### 4.1.6 Der Nachweis von Homospermidin in den *P. falciparum* Stämmen NF54 und R durch GC/MS Analyse

In Eukaryonten sind die Enzyme DHS und HSS an der Metabolisierung des Spermidins beteiligt (Chen *et al.*, 1996, Lee und Folk, 1998). Die Inhibition mit 1,7 - Diaminoheptan, Dicyclohexylamin und Agmatin dieser beiden Enzyme zeigte einen wachstumshemmenden Effekt in *in vitro* Kulturen von *P. falciparum*. Diese Umstände veranlassten uns, mittels einer GC/MS Analyse, nach einem Protokoll von Husek *et al.* (1992), die *P. falciparum* Stämme, NF54 und R, auf das Vorkommen von Homospermidin zu untersuchen.

Der Nachweis des Homospermidins mit seiner charakteristischen Massenzahl  $m/z$  von 333 gelang sowohl für den NF54 - Stamm als auch für den R-Stamm (Abb. 4.5). Allerdings war der gemessene Homospermidin Gehalt im NF54 - Stamm um ca. 50% höher als der im R-Stamm. Durch das erhaltene Massenspektrum konnte das Vorkommen von Homospermidin in *P. falciparum* erstmalig bewiesen werden.

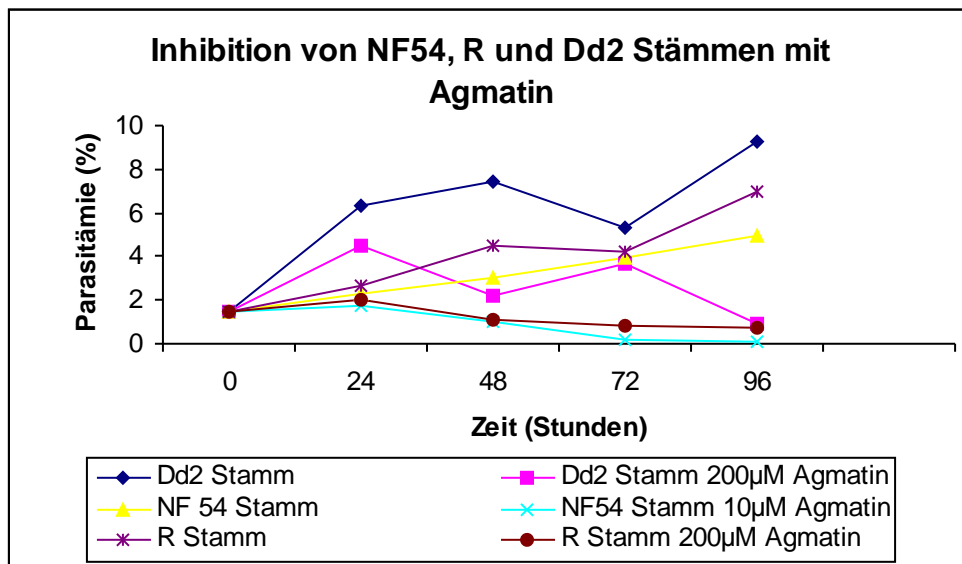


4.5 Abbildung: Fragmentierungsspektrum des *P. falciparum* R-Stammes erhalten aus einer *in vitro* Kultur mit einer Parasitämie von 6,03%. Das Massenspektrum zeigt Homospermidin mit seiner charakteristischen Massenzahl  $m/z$  von 333 (Kaiser, *et al.*, 2001a).

#### 4.1.7 Der inhibitorische Effekt des Polyamin Inhibitors Agmatin auf das Wachstum von verschiedenen *P. falciparum* Stämmen im Vergleich zu Artemisinin, Triclosan und Chloroquin

Die Inhibitorexperimente mit Agmatin (Abb. 4.4 a und b) hatten eine effektive Hemmung der drei untersuchten Stämme NF54 und R gezeigt. Aus diesem Grunde wurde der inhibitorische Effekt von Agmatin im Vergleich zu neuen Chemotherapeutika in der Malariatherapie wie Artemisinin und Triclosan, sowie zum konventionellen Chloroquin untersucht.

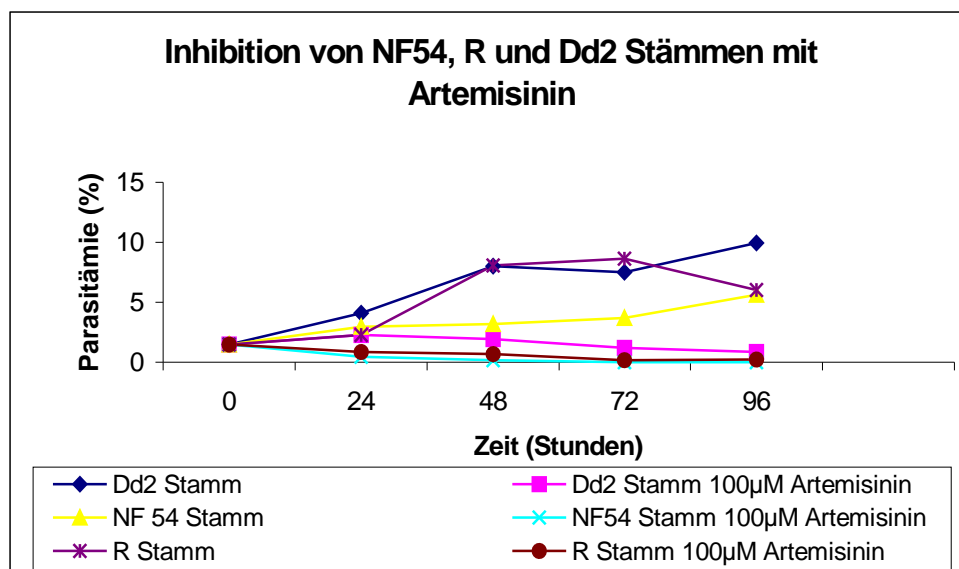
In einem weiteren Experiment wurde auch der Inhibitionseffekt von Agmatin auf den Dd2 - Stamm (CQR) untersucht, der für die Genomsequenzierung des *P. falciparum* Genoms verwendet wurde. Wie unter 4.1.4 beschrieben konnte beim R-Stamm (CQR) und auch beim NF54 - Stamm (CQS) eine vollständige Inhibition nach 72 Stunden bei einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Agmatin konnte eine 30% Reduktion der Parasitämie des R-Stammes nach 48 Stunden gezeigt werden. Der Dd2 - Stamm (CQR) konnte nach 96 Stunden mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Agmatin fast vollständig inhibiert werden ( Abb. 4.6).



4.6 Abbildung: Inhibition der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R mit unterschiedlichen Konzentrationen von Agmatin. Der Verlauf des Experiments ist in der Legende von Abb. 4.1.a beschrieben.

Artemisinin ist ein Sesquiterpenlaktone, welches aus der Pflanze *Artemisia annua* (Asteraceae) isoliert wurde. Artemisinin wird derzeit als neues Chemotherapeutikum eingesetzt, das gegen resistente *P. falciparum* Stämme wirksam ist (Svensson *et al.*, 1999). Hauptangriffspunkt des Artemisinins ist wie bei Chloroquin das Häm. Während Chloroquin blutschizontozid wirkt, wird dem Artemisinin eine blut- und gewebeschizontozide Wirkung zugeschrieben. Darüber hinaus soll im Falle des Artemisinins ein sekundärer Hemmeffekt auf die Nucleinsäurebiosynthese des Malariaparasiten vorliegen.

Aufgrund der Ergebnisse von Pandey *et al.* (1999) wurde für die Inhibitorexperimente eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Artemisinin eingesetzt, und der Einfluss auf den NF54, R und Dd2 - Stamm untersucht. Die Versuchsbedingungen sind unter 3.2.1 beschrieben.



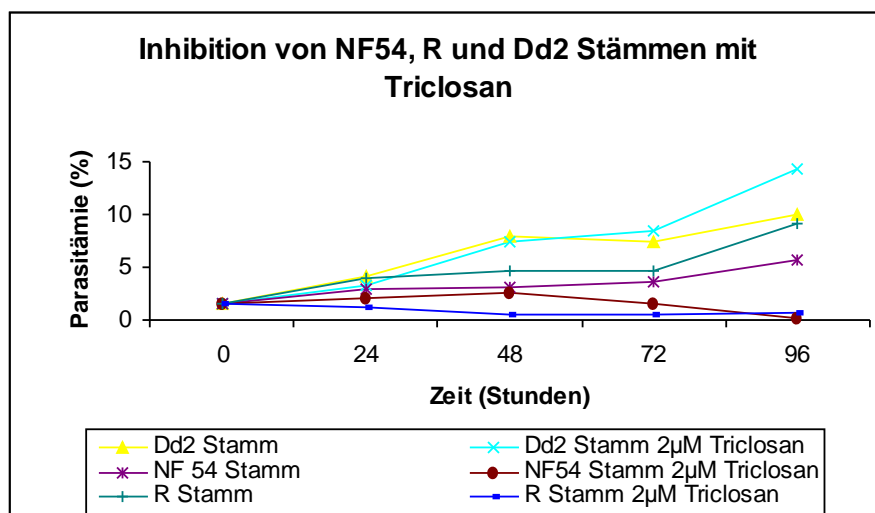
**4.7 Abbildung:** Inhibition der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R-Stamm mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Artemisinin. Der Verlauf des Inhibitorexperiments ist in der Legende von Abbildung 4.1.a beschrieben.

Eine hemmende Wirkung konnte im Falle aller drei Stämme erzielt werden, jedoch war der Dd2 - Stamm etwas weniger sensibel als der R-Stamm, ließ sich aber hemmen. Nach 72 Stunden konnte eine komplette Hemmung des NF54 - Stammes mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Artemisinin erzielt werden (Abb. 4.7). Die Tatsache, dass sich der Dd2 - Stamm durch Artemisinin hemmen ließ (0,85% Parasitämie nach 96 Stunden) korreliert mit den Befunden zur Hemmbarkeit dieses Stammes durch Agmatin. Eine Inhibition mit 200  $\mu\text{M}$  Artemisinin verstärkte den inhibitorischen Effekt auf den Dd2 - Stamm nicht (Ergebnis nicht dargestellt). Es ist anzunehmen, dass der

Dd2 - Stamm eine Resistenz gegen beide Inhibitoren aufweist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Dd2 - Stammes führte die Inhibition mit 100  $\mu\text{M}$  Artemisinin beim R-Stamm nach 96 Stunden zu einer vollständigen Inhibition. Die Ergebnisse der beiden Inhibitorexperimente weisen daraufhin, dass Agmatin und Artemisinin den NF54 - Stamm effizienter hemmen, jedoch eine Hemmbarkeit der *P. falciparum* Stämme (CQR) Dd2 und R besteht.

Der Hemmstoff Triclosan ist ein Inhibitor des Typ II Fettsäurebiosynthese Enzyms Enoyl-ACP Reduktase, einem Schlüsselenzym in der parasitären Fettsäurebiosynthese (Surolia und Surolia, 2001). Diese Fettsäurebiosynthese ist im Menschen nicht vorhanden. Die Enoyl-ACP Reduktase wird durch das *fabI* Gen codiert.

In einer Studie von Surolia und Surolia (2001) konnte gezeigt werden, dass Triclosan das Wachstum von *P. falciparum in vitro* Kulturen inhibierte. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei 0,7  $\mu\text{M}$ . In einer Studie von Beeson (2001) führte eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  Triclosan zu einer 50-fachen Inhibition der Enzym Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den Experimenten dieser Arbeit eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  Triclosan für die Stämme NF54, R und Dd2 eingesetzt.

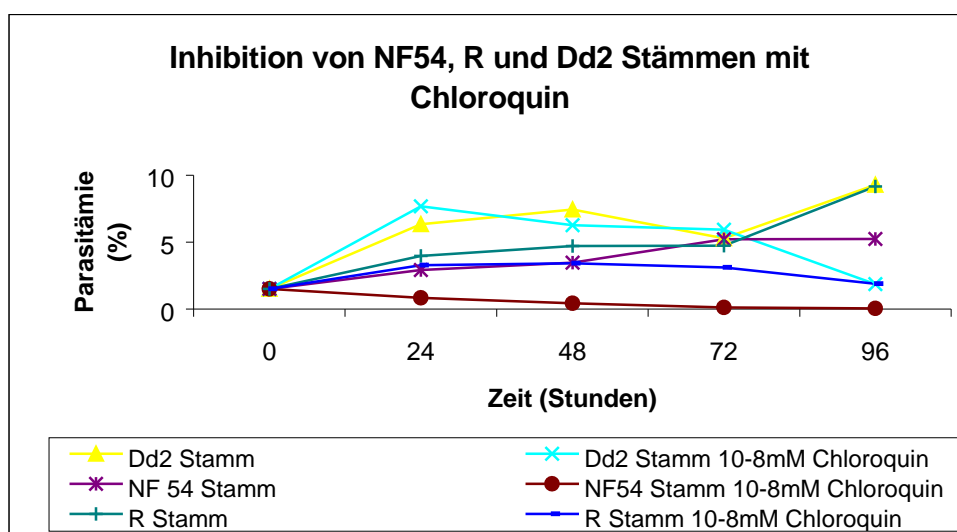


**4.8 Abbildung:** Inhibition der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R-Stamm mit 2  $\mu\text{M}$  Triclosan. Der Verlauf des Experiments ist in der Legende von Abbildung 4.1a beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  Triclosan eine signifikante Hemmung des Wachstums der beiden *P. falciparum* Stämme NF54 und R bewirkte. Insbesondere verhindert Triclosan die Invasion von Trophozoiten in die Erythrozyten. Der Dd2 - Stamm, ein Chloroquin-resistenter Stamm, war im Vergleich

zu den Experimenten mit Agmatin und Artemisinin weniger empfindlich und zeigte keine Hemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der NF54 - Stamm war nach 96 Stunden vollständig gehemmt (Abb. 4.8).

Chloroquin (z.B. *Resochin* oder *Aralen*) ist trotz der Entwicklung von Resistenzen eines der kostengünstigsten Chemotherapeutika für die Behandlung und Prophylaxe der Malaria. Neue Erkenntnisse zeigen, dass Chloroquin die effektive Formation eines Hämzoin Dimers durch Bindung an das Häm mittels „ $\pi$ - $\pi$  stacking“ seiner planaren Ringstruktur verhindert (Ridley *et al.*, 1997). Dies bedeutet, dass nicht die Häm-Polymerase inhibiert.



**4.9 Abbildung: Inhibition der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R mit  $10^{-8}$  mM Chloroquin. Siehe Legende 4.1a für Versuchsbedingungen.**

In den Experimenten wurde eine Konzentration von  $10^{-8}$  mM Chloroquin für den NF54, den R und den Dd2 - Stamm eingesetzt. Inhibitorexperimente in *in vitro* Kulturen des Chloroquin-sensitiven Stammes NF54 mit Chloroquin zeigten, dass bereits  $10^{-8}$  mM Chloroquin ausreichend waren, um eine vollständige Hemmung nach 96 Stunden zu erzielen. Im Falle der Chloroquin-resistenten Stämme, R-Stamm und Dd2, konnte nur eine geringe Hemmung nach 96 Stunden erreicht werden ( Abb. 4.9). Dieses Ergebnis sichert noch einmal die bereits ermittelte Chloroquin-Resistenz des Dd2 und R-Stammes ab.

Zusammenfassend zeigten die Inhibitorexperimente an *in vitro* Kulturen des (CQR) Dd2 - Stammes und auch des R-Stammes, dass im Gegensatz zu Triclosan (Abb. 4.8) und Chloroquin (Abb. 4.9), Agmatin (Abb. 4.6) und Artemisinin (Abb. 4.7) einen deutlichen inhibitorischen Effekt ausübten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits 10  $\mu$ M Agmatin ausreichend waren, die Parasitämie nach 24 Stunden im (CQS) NF54 - Stamm signifikant zu verringern (Abb. 4.6).

Im Fall von Artemisinin reichte eine Konzentration von 100  $\mu$ M aus, um den NF54 - Stamm nach 72 Stunden vollständig zu hemmen (Abb. 4.7) während 2  $\mu$ M Triclosan notwendig waren, um diesen Stamm nach 96 Stunden gänzlich zu inhibieren (Abb. 4.8).

#### **4.1.8 Die inhibitorische Wirkung von Agmatin im Vergleich zu Artemisinin, Chloroquin und Triclosan auf die erythrozytären Entwicklungsstadien der Chloroquin-resistenten Stämme Dd2 und R und des Chloroquin-sensitiven *P. falciparum* Stammes NF54**

Die Inhibition mit Agmatin führte zu einer Abnahme von Trophozoiten und Schizonten in allen untersuchten Stämmen (Abb. 4.10 a und b). Die Abnahme der Trophozoiten des Dd2 - Stammes allerdings war signifikanter als nach der Behandlung mit Artemisinin (Abb. 4.10 e). Im Gegensatz zu Ergebnissen einer Inhibitorstudie mit MDL73811, einem Inhibitor der S-Adenosylmethionindecaboxylase (AdoMetDC, EC 4.1.1.50) (Wright *et al.*, 1991), hemmte Agmatin die Entwicklung von Trophozoiten zu Schizonten nicht.

Der inhibitorische Effekt von Artemisinin auf die Entwicklung der Trophozoiten war vergleichbar mit den Ergebnissen von Agmatin (Abb. 4.10 a und b). Die Abnahme der Trophozoiten in den einzelnen Stämmen war weniger signifikant nach der Behandlung mit Artemisinin. Andererseits führte Artemisinin zu einer etwas stärkeren Abnahme von Schizonten in allen untersuchten Stämmen.

In einer Studie von Surolia und Surolia (2001) wurde untersucht, ob Triclosan den Wachstumsstillstand von *P. falciparum* Stadium-spezifisch hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass junge Trophozoiten sehr empfindlich waren. Die Abnahme der Trophozoiten konnte direkt nach der Zugabe von 2  $\mu$ M Triclosan beobachtet werden, mit Ausnahme des Chloroquin-resistenten Dd2 - Stammes (Abb. 4.10 c). Die Anzahl der Schizonten nahm in allen Stämmen nach der Behandlung mit Triclosan ab (Abb. 4.10 d).

Das Kontroll Experiment mit  $10^{-8}$  mM Chloroquin zeigte keine inhibitorische Wirkung auf die Trophozoiten der Chloroquin-resistenten Stämme Dd2 und R, beim Chloroquin-sensitiven NF54 - Stamm dagegen konnte eine signifikante Abnahme von Trophozoiten beobachtet werden (Abb. 4.10 g). Die Schizonten nahmen in allen Stämmen ab (Abb. 4.10 h). Dies bestätigt die blutschizontozide Wirkung des Chloroquins.

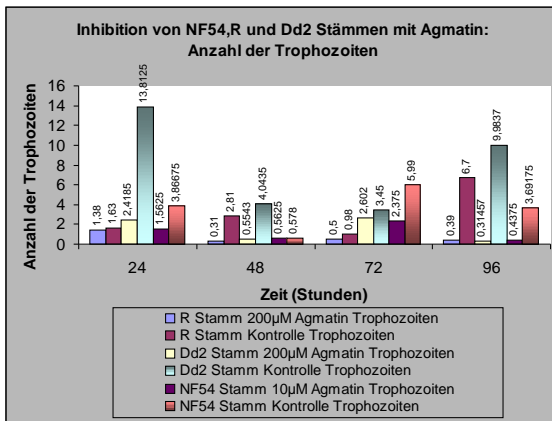


Abb. 4.10 a

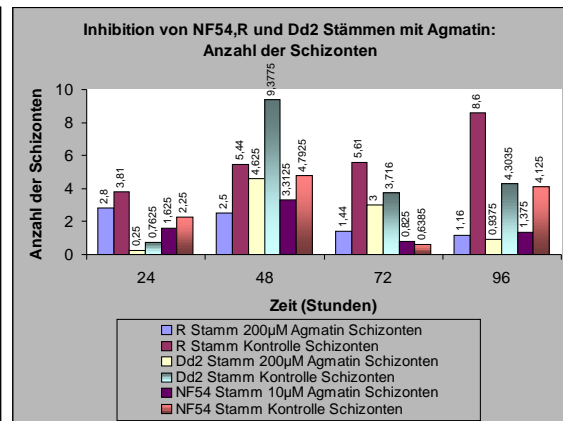


Abb. 4.10 b

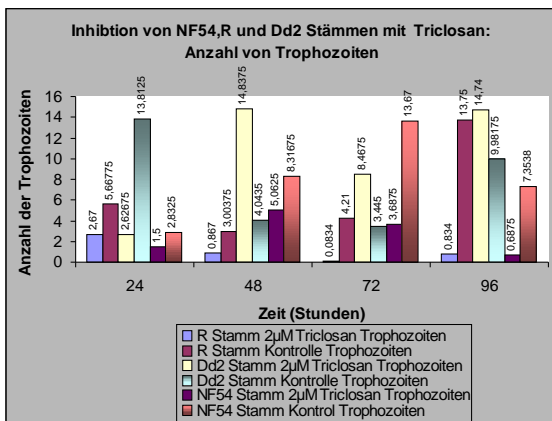


Abb. 4.10 c

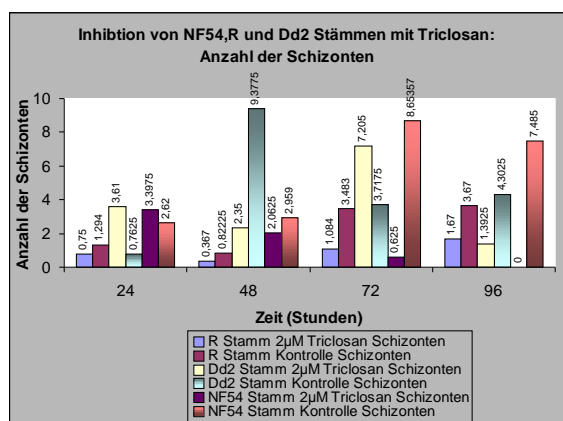


Abb. 4.10 d

4.10 a, b, c und d Abbildung: Anzahl von Trophozoiten und Schizonten der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R unter verschiedenen Konzentrationen von Agmatin (4.10a und b) und einer Konzentration von 2 µM Triclosan (4.10c und d). Die Parasiten wurden wie in der Legende 4.1a beschrieben, kultiviert und bestimmt.

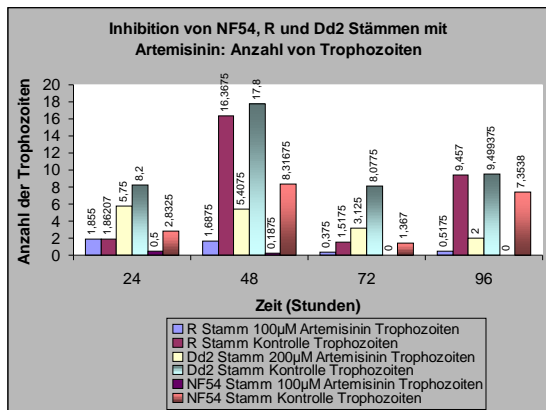


Abb. 4.10 e

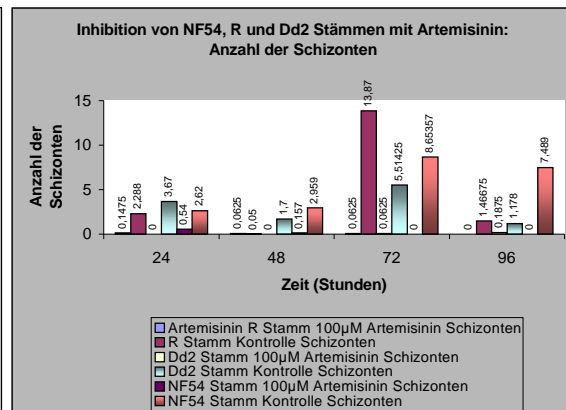


Abb. 4.10 f

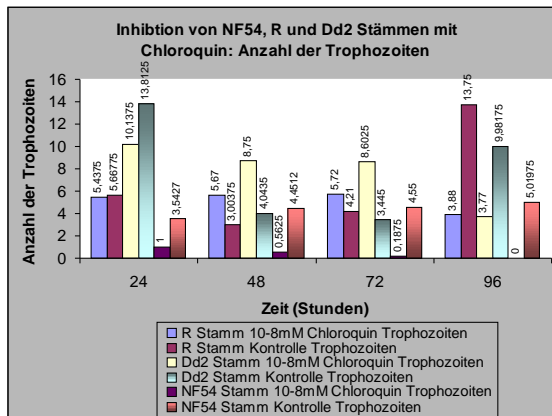


Abb. 4.10 g

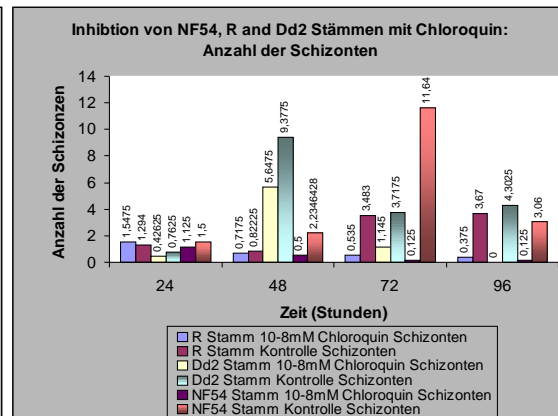


Abb. 4.10 h

4.10 e, f, g und h Abbildung: Bestimmung der Anzahl von Trophozoiten und Schizonten der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R unter verschiedenen Konzentrationen von Artemisinin (4.10 e und f) und einer Konzentration von  $10^{-8}$  mM Chloroquin (4.10 g und h). Der Verlauf des Experiments und die Anzahl der Schizonten und Trophozoiten wurde wie unter Abbildung 4.1a beschrieben, gehandhabt und bestimmt.

#### **4.2 Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Chemotherapeutika wie Artemisinin, Triclosan und Chloroquin und des Polyaminbiosyntheseinhibitors Agmatin auf die RNA Biosynthese der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R**

Der inhibitorische Effekt von 200  $\mu\text{M}$  Agmatin nach 24 Stunden auf die RNA Biosynthese wurde bei den Chloroquin-resistenten (CQR) Stämmen Dd2 und R und dem Chloroquin-sensitiven Stamm (CQS) NF54 untersucht. Die ribosomale RNA (rRNA) von *P. falciparum* repräsentiert 80 – 90% der zellulären RNA. Die RNA Isolierung wurde in Anlehnung an das Qiagen Protokoll für den Rneasy Mini Plant Kit mit Modifizierungen durchgeführt (3.3.2). Aus einer 5ml Kulturschale der verschiedenen, mit oder ohne Inhibitor, behandelten *P. falciparum* Stämme (Parasitämie von 7 bis 9%), die in einer kontinuierlichen Kultur nach einem Protokoll von Trager und Jensen (1976) gehalten worden war, wurde die zelluläre RNA der Parasiten isoliert. Die Auftrennung der RNA wurde auf einem 1% Agarose Gel oder auf einem 1,2% Formaldehydgel überprüft. Allerdings konnten bei der Auftrennung auf einem 1,2% Formaldehydgel keine deutlich besseren Ergebnisse erzielt werden. Somit wurde in den weiteren Experimenten die ribosomale RNA auf 1% Agarose Gelen untersucht. Eine Inhibition mit Agmatin hatte keine Auswirkungen auf die Bildung zellulärer RNA, da das Vorkommen der verschiedenen RNA Spezies und deren Quantität unbeeinflusst blieb. Nach der Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Agmatin zeigte sich kein Unterschied im Muster und in der Konzentration der zwei prominenten 19S und 26S rRNA Spezies, obgleich ungefähr die gleiche Mengen an RNA (25 $\mu\text{g}$  RNA pro Spur) auf das Gel aufgetragen wurden (Abb. 4.11b).

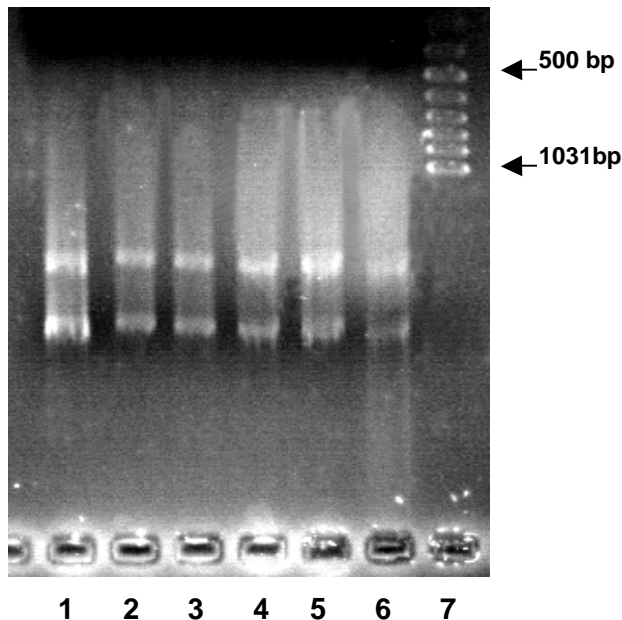
Da für Artemisinin ein sekundärer Effekt auf die Biosynthese von Nukleinsäuren vermutet wird, wurden die oben genannten *P. falciparum* Stämme gleichermaßen auf das Vorkommen der beiden ribosomalen RNA Spezies hin untersucht. Eine Isolierung von rRNA der verschiedenen *P. falciparum* Stämme gelang jedoch bei Einsatz verschiedener Konzentrationen von Artemisinin (20 – 400  $\mu\text{M}$ ) nicht.

Die Wirkung von Triclosan auf die RNA Biosynthese wurde, nach unseren Kenntnissen, bislang noch nicht untersucht. Aufgrund dieser Tatsache, wurden der Chloroquin-sensitive Stamm NF54 und die beiden Chloroquin-resistenten Stämme Dd2 und R 24 Stunden mit 2  $\mu\text{M}$  Triclosan inhibiert und die ribosomale RNA untersucht.

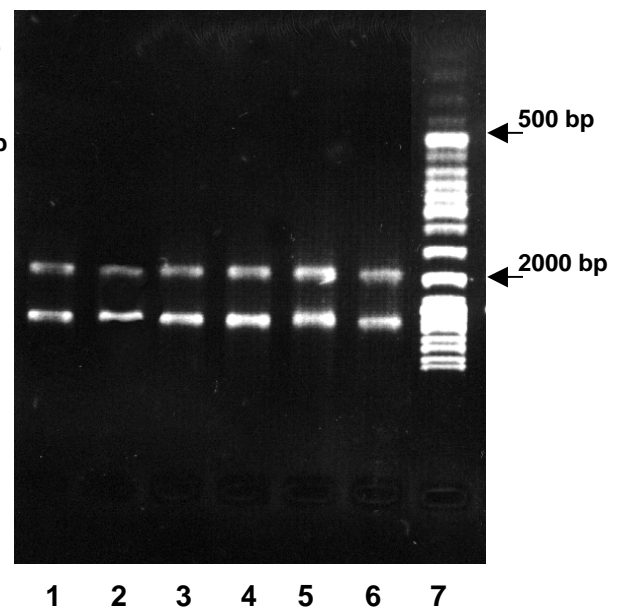
Triclosan wies keinen inhibitorischen Effekt auf die RNA Biosynthese der drei Stämme auf. Beide Banden der 19S und der 26S rRNA Spezies konnten auf einem 1% Agarose Gel nachgewiesen werden, wobei 10µg RNA der verschiedenen Stämme pro Gelspur aufgetragen wurden. Ein Vergleich zwischen der unbehandelten rRNA der verschiedenen Stämme und der rRNA nach der Behandlung mit 2 µM Triclosan, zeigte keinen Unterschied im Muster und in der Konzentration der zwei prominenten rRNA Spezies (Abb. 4.11a).

Auch wurde der Einfluss von Chloroquin ( $10^{-8}$  mM) auf die RNA Biosynthese der oben genannten Stämme untersucht. Trotz mehrfacher Versuche gelang die Isolierung von rRNA der zu untersuchenden *P. falciparum* Stämme, nach der Behandlung mit Chloroquin ( $10^{-8}$  mM) nicht.

4.11 a



4.11 b



4.11 a Abbildung: 1%-iges Agarose Gel welches den Einfluss von Triclosan auf die RNA Biosynthese der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R zeigt. Spur 1. Dd2 - Stamm mit Triclosan, Spur 2. Dd2 - Stamm, Spur 3. NF54 - Stamm und Triclosan, Spur 4. NF54 - Stamm, Spur 5. R-Stamm mit Triclosan, Spur 6. R-Stamm, Spur 7. DNA Leiter (Fa. MBI Fermentas, Low Range Ladder).

4.11 b Abbildung: Untersuchungen zum Einfluss von Agmatin auf die RNA Biosynthese der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R (1%ige Agarose Gel). Spur 1. Dd2 - Stamm, Spur 2. Dd2 - Stamm mit Agmatin, Spur 3. R-Stamm, Spur 4. R-Stamm mit Agmatin, Spur 5. NF54 - Stamm, Spur 6. NF54 - Stamm mit Agmatin, Spur 7. DNA Leiter (Fa. MBI Fermentas, Laddermix) (Kaiser, *et al.*, 2004).

### 4.3 Isolierung, Sequenzierung und Analyse einer Deoxyhypusinsynthase/ Homospermidinsynthase (DHS/HSS) codierenden Genregion aus *P. falciparum*

#### 4.3.1 Amplifikation einer DHS/HSS codierenden Partialsequenz aus der genomischen DNA der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R

Daten der Genomsequenzierung von *P. falciparum* deuteten erstmalig auf das Vorkommen einer Deoxyhypusinsynthase (DHS) codierenden Genregion hin. Untersucht werden sollte in zweiter Linie die Existenz einer separaten Homospermidinsynthase (HSS) codierenden Genregion in *P. falciparum*. Die Gründe für die Suche nach einer separaten HSS codierenden Genregion waren: I.) durch Gaschromatographie/Massenspektroskopie (4.1.6) konnte Homospermidin in *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* nachgewiesen werden. II.) die eukaryontische HSS rekrutiert sich aus der DHS (Kaiser, 1999b).

Aufgrund der bioinformatischen Datenlage der aus der *P. falciparum* Genomsequenzierungsdaten des Dd2 - Stammes stammenden Nukleinsäuresequenzen, wurde zunächst ein Sequenzabschnitt im Genom von *P. falciparum* identifiziert, der eine hohe Homologie zu der Nukleinsäuresequenz der HSS aus *Senecio vulgaris* (Asteraceae) aufweist. Dieser DNA Abschnitt wurde für die Konstruktion genspezifischer Primer 73% Homologie zwischen den Aminosäurepositionen 292 – 346 und 100% Homologie zwischen den Aminosäurepositionen 182 – 189) verwendet.

Da ein RT-PCR Verfahren und ein anschließender Amplifikationsversuch aus der cDNA von *P. falciparum* erfolglos waren, wurde genomische DNA verwendet um eine Partialsequenz zu amplifizieren. Für die Amplifikation wurde genomische DNA der drei *P. falciparum* Stämme mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit (3.4.1) gewonnen. Ausgehend von der genomischen DNA der verschiedenen *P. falciparum* Stämme und den sequenzspezifischen Primer 4 forward # ATA GTG CCT AAT GAT AAT TAT (Aminosäureposition 208 – 215 im *dhs* Gen des Dd2 - Stammes) und 6 reverse # AAC CTC CTC CGA GAA TAA TAA TAC CAG (Aminosäureposition 404 – 411 im *dhs* Gen des Dd2 - Stammes) (Abb. 4.12) konnte, mit Hilfe einer Touchdown PCR (3.4.2.2), eine 544 bp große Partialsequenz aus den verschiedenen Stämmen amplifiziert werden (Abb. 4.12).



#### 4.3.2 Aminosäuresequenz Vergleich der erhaltenen Partialsequenzen des NF54, Dd2 und R-Stammes

Ein Vergleich auf der Aminosäureebene zwischen der hochkonservierten HSS und DHS Region (Aminosäureposition 208 – 411 bezogen auf das Deoxyhypusinsynthase Gen (*dhs*) des Dd2 - Stammes, zeigte einige wenige Unterschiede zwischen dem Dd2, NF54 und R-Stamm. Interessant ist, dass im Gegensatz zur DHS codierenden Genregion des Menschen in Plasmodien eine Asparaginreiche Region vorkommt (Abb. 4.13).

Im Vergleich zum Dd2 - Stamm unterscheidet sich die erhaltene Partialsequenz des NF54 - Stammes in einer Aminosäure, dem Leucin 164. Hier liegt in der genomischen DNA des NF54 - Stammes ein Phenylalanin vor. Der R-Stamm unterscheidet sich im Vergleich zum Dd2 - Stamm in 2 Aminosäuren hier liegt in der genomischen DNA des R-Stammes in Position 70 Glutaminsäure statt Glutamin und in Position 164 statt Leucin Phenylalanin vor (siehe Abb. 4.13). Vermutlich sind diese Unterschiede auf stammspezifische Unterschiede oder Polymorphismen zurückzuführen, da ansonsten keine wesentlichen Aminosäureidentitätsunterschiede in der Partialsequenz gefunden wurden. Diese möglichen Polymorphismen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Expression der Gesamtsequenz der beiden *Plasmodium falciparum* Stämme NF54 und R, und die Bestimmung der spezifischen Aktivität wird endgültig zeigen, ob eine separate HSS codierende Genregion vorliegt.

## DHS und HSS Partialesequenzen von *Plasmodium falciparum* und *Senecio vulgaris*

```

1.Dd2  IVPNDNYCKFEDWLQPIILNKMLHEQNEKNEQMFLKKLEKRKKKYNNNKNKNDNNNDNDNV
2.NF54 IVPNDNYCKFEDWLQPIILNKMLHEQNEKNEQMFLKKLEKRKKKYNNNKNKNDNNNDNDNV
3.R-St IVPNDNYCKFEDWLQPIILNKMLHEQNEKNEQMFLKKLEKRKKKYNNNKNKNDNNNDNDNV
4.S.v.  IVPNDNYIKFEDWIIPIFDQMLIEQKTQN-----
          *****  *****: **::** ** : *
          70
          WGNEKNDQENQYNQGQESFKKDSNIYTNDVSNKKNHINNYINNYSDSDDDQCDMYLSP
          WGNEKNDQENQYNQGQESFKKDSNIYTNDVSNKKNHINNYINNYSDSDDDQCDMYLSP
          WGNEKNDQENQYNQGQESFKKDSNIYTNDVSNKKNHINNYINNYSDSDDDQCDMYLSP
          -----VLWTP
          164                               : *
          SEFINTLGKEINDESSLIYWCYKNDIPIFCPGLTDGSLGDNLFHNYGKIKNNLILDI
          SEFINTLGKEINDESSLIYWCYKNDIPIFCPGLTDGSLGDNLFHNYGKIKNNLILDI
          SEFINTLGKEINDESSLIYWCYKNDIPIFCPGLTDGSLGDNLFHNYGKIKNNLILDI
          SKMIARLGKEINNETSYLYWAYKNNIPVFCPSITDGSVGDMLYFHS--VSNPGAGLVVDI
          *:*  *****:* :*.***:***:***.*****:*** *:: .: .*::**

          VKDIKKINSLAMNCE--KSGIILGGG
          VKDIKKXNSLAMNCE--KSGIILGGG
          VKDIKKINSLAMNCE--KSGIILGGG
          VQDVIAAMDNEAVHASPQKTGIILGGG
          *:*  :. *::.. *::*****

```

4.13 **Abbildung:** Aminosäuresequenzen der Partialesequenzen *dhs/hss* codierenden Genregionen der *P. falciparum* Stämme Dd2 (CQR) (1.Zeile), NF54 (CQS) (2.Zeile) und R (CQR) (3.Zeile). Die Partialesequenzen wurden mittels PCR Amplifikation mit hoch konservierten Primern IVPNDNY (Aminosäureposition 208 – 215 im *dhs* Gen des Dd2 - Stammes) und GIIILGGG (Aminosäureposition 404 – 411 im *dhs* Gen des Dd2 - Stammes) isoliert. Zeile. 4 entspricht der HSS codierenden Sequenz aus *Senecio vulgaris* (Asteraceae). Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen sind grau unterlegt. Die Sternchen markieren übereinstimmende Aminosäuren und die Doppelpunkte markieren die Ähnlichkeit der Aminosäuren (Kaiser, *et al.*, 2003a).

#### 4.3.3 Ein Vergleich der Substratbindungsstelle des Spermidins und der NAD Bindungsstelle der Deoxyhypusinsynthase (DHS) des Menschen, der parasitären DHS aus dem *P. falciparum* Dd2 - Stamm und aus *Trypanosoma brucei rhodesiense*, und der pflanzlichen Homospermidinsynthase (HSS) aus *Senecio vulgaris*

Die erste Genregion, die eine mögliche DHS des *P. falciparum* Stamm Dd2 codiert, wurde aufgrund von Sequenzierungsdaten des *P. falciparum* Genom-Sequenzierungsprojekts identifiziert. Die beiden Enzyme DHS und HSS sind in ihren reaktionsmechanistischen Eigenschaften sehr ähnlich. Im ersten Schritt erfolgt die NAD-abhängige Dehydrierung zu Dehydrospermidin und im zweiten Schritt die Übertragung der Aminobutyleinheit von Spermidin auf den eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF5A durch die Deoxyhypusinsynthase. Im Falle der Homospermidinsynthase erfolgt die Übertragung der Aminobutyleinheit auf Putrescin. Die DHS aus *P. falciparum* zeigt eine 57% Übereinstimmung auf der Aminosäureebene zur DHS der Pflanze *Nicotiana tabacum* und 53% bzw. 57% Übereinstimmung zur HSS von *Senecio vulgaris* (Kaiser *et al.*, 1999b) und *Senecio vernalis* (Ober *et al.*, 1999). Auf der Nukleinsäureebene beträgt die Homologie zur HSS von *S. vulgaris* 73% (Basenpaar Positionen 881 - 1043) und 100% (Basenpaar Positionen 550 - 569). Bislang wurden *dhs* codierende Nukleinsäuresequenzen aus Parasiten wie *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma cruzi* Epimastigoten (El-Sayed *et al.*, 2000) und *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Djikeng *et al.*, 1996) isoliert. Die DHS aus *P. falciparum* zeigt eine 39% Übereinstimmung zur DHS von *T. b. rhodesiense* auf der Aminosäureebene.

Ein Aminosäurealignment der DHS Sequenzen des *P. falciparum* Stammes Dd2, des Menschen und der pflanzlichen HSS (Abb. 4.14) weist eine signifikante Homologie der Spermidin ( Position 243 Asparaginsäure - Position 329 Lysin) und der NAD (Position 105 Serin - Position 342 Asparaginsäure) Substratbindungsstellen auf. Im Gegensatz hierzu weist das Alignment aber auch signifikante Unterschiede in der Spermidinbindungstasche zwischen den beiden parasitären Aminosäuresequenzen (*T. b. rhodesiense* und *P. falciparum*) auf (Abb. 4.14).

Neue Erkenntnisse der Daten der Röntgen-Strukturanalyse der menschlichen DHS, sowie die Konstruktion von Deletionsmutanten der Spermidin-Bindungsregion zeigten, dass eine Deletion bestimmter Aminosäuren einen Verlust der menschlichen Spermidin - Bindungskapazität zur Folge hat (Umland *et al.*, 2004). Eine Substitution dieser hochkonservierten Aminosäuren, Asp-243 , Asp-316, Glu-323 und Trp-327 (hellgrau unterlegte Aminosäuren in Abb. 4.14), mit Alanin verursacht einen fast vollständigen

Verlust der Spermidinbindung und Enzymaktivität (Lee *et al.*, 2001). Die für die Spermidinbindung essentiellen Aminosäuren, die durch Deletionsmutationen ermittelt wurden, sind auch in der DHS des Menschen, in *P. falciparum* und der HSS von *S. vulgaris* hochkonserviert.

Im Gegensatz hierzu sind bei *T. b. rhodesiense* drei der hochkonservierten Aminosäuren ersetzt. Anstatt Asparaginsäure (316) befindet sich Glutamin in der Spermidinbindungsstelle und Glutaminsäure (323) ist durch Alanin und Tryptophan (327) ist durch Asparagin ersetzt. Interessant ist auch, dass laut Umland *et al.* (2004), vier Aminosäuren (Lys-287, Tyr-305, Asp-316 und Glu-323) die hochkonserviert in DHS codierenden Regionen von verschiedenen Spezies vorkommen, eine funktionale Bedeutung haben sollen. In der menschlichen und der *P. falciparum* DHS codierenden Sequenz sind diese Aminosäuren konserviert. Die Aminosäuresequenz von *S. vulgaris* weist eine Substitution bei Tyr-305 auf und in der Sequenz von *T. b. rhodesiense* liegen gleich zwei Substitutionen vor (Asp-316 ist ersetzt durch Glutamin und Glu-323 ist ersetzt durch Alanin), die bereits beschrieben wurden. Diese Substitutionen machen noch einmal deutlich, dass die Spermidinbindungsstelle, von *T. b. rhodesiense*, nicht hoch konserviert ist.

Im Gegensatz zur Spermidinbindungsstelle, ist die NAD Bindungsstelle der menschlichen DHS, pflanzlichen HSS und der DHS aus den Parasiten *P. falciparum* (Dd2) und *T. b. rhodesiense* hoch konserviert. Nur Punktmutationen von drei Aminosäuren (Asp-342, Asp-313 und Asp-238, grau unterlegt in Abb. 4.14) führen zu einem signifikanten Verlust der NAD-Bindung. Diese drei Aminosäuren sind in den dargestellten DHS Sequenzen der vier Spezies konserviert (Abb. 4.14).

Zusammenfassend zeigt das Alignment, dass alle hochkonservierten Aminosäuren der NAD Bindungsstelle in den vier Spezies vorliegen und somit keine reduzierte NAD Bindungskapazität durch eventuelle Substitutionen dieser Aminosäuren verursacht wird.

## Ein Clustal W Alignment verschiedener DHS Sequenzen und der pflanzlichen HSS

```

Mensch          -----MEGS-----LEREAPAGALAAVLKHSSTLPPESTQVRGYDFNRGV 40
S.vulgaris    -----MHNSSNSRELIKKWPRSNKEAIDSARSNVFKESESLEGTCAIGGYDFNNGI 53
P.falciparum MVDHVSFIEVVKIRSDDECDADSHNEGDNIEDAKASVFKSSLIPEKTDVVKGLNFDKVE 60
T.brucei     -----

Mensch          NYRALLEAFGTTGFQATNFGRAVQVQVNAMEKK-----LEPLSQDEQHAD 86
S.vulgaris    DSKLLKSMVSTGFQASNLGDAMIITNQMLDWR-----LSHDEVPEN-CSE 98
P.falciparum DLHEFINNYKYMGFQATNLGISIDEINKMIYKYKDENIKSENNENNLCNNVSEDLNKD 120
T.brucei     AIRCVLNAYPNIGLEATNLGRARRIVQRALNDN----- 33
      .::      *::**:* : : : .

Mensch          LT---QRRPLTSCITFLGYTSNLISSGIRETIRYLVQHNMVDVLVTTAGGVEEDLIK 142
S.vulgaris    EE---RKNRESVKCKIFLGFTSNLISSGVRETICYLTQHRMVDVLVTTGGIEEDFIK 154
P.falciparum QENHLYHYEKKKKSCIIWLSFTSNMISSGLREIFVYLAKNKFIDVVVTTAGGIEEDIK 180
T.brucei     -----GMDGNKVMLAYTSNLISSGLRDTFACLARENRIGAVVTTAGGVEEDVIK 83
      : * . : * * : * * * * * : : * . . . : . : * * * * * : * * * * *

Mensch          LAPTYLGEFSLRGKELRENGINRIGNLLVPNENYCKFEDWLMPILQVMQEONTEG---- 198
S.vulgaris    LASTYKGEFSLPGADLRSKGLNRIGNLIVPNDNYIKFEDWIIPIFDQMLIEQKTQN---- 210
P.falciparum FSNTYIGDFNLNGKLRKKGWNRIGNLIVPNDNYCKFEDWLQPILNKMLHEQNEKNEQMF 240
T.brucei     LGDTLVGDFALNDHALRNNGLNRVNLLVPNDNYRNFEDFVPILLRRLHEQQRDSR---- 139
      : . * * : * * . * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Mensch          -----
S.vulgaris    -----
P.falciparum LKKLEKRRKKYNNNKKNNDNNNDNDNVWGNEKNDQENQYNQGQESFKKDSNIYTNDVSN 300
T.brucei     -----

Mensch          -----VKWTPSKMIARLGKEINNP-----ESVYYWAQKNHIP 230
S.vulgaris    -----VLWTPSKMIARLGKEINNE-----TSYLYWAYKNNIP 242
P.falciparum KKNHINNYINNYDSDDQCDMYLSPSEFINTLGKEINDE-----SSLIYWCYKNDIP 354
T.brucei     -----WTKTTPSQIIAEGAALESVRPNDCGSSLIYWCYRNDIP 179
      : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Mensch          238 243
VFSPALTDGSLGDMIFFHSYKNP---GLVLDIVEDLRLINTQAIFA---KCTGMIILGGG 284
S.vulgaris    VFCPSITDGSVGDMLYFHSVSNPGA-GLVVDIVQDVIAMDNEAVHAS-PQKTGIIILGGG 300
P.falciparum IFCPGLTDGSLGDNLFLHNYGKKIKNNLILDIVKDIKINSLAMNC---EKSGIIILGGG 411
T.brucei     VFSPAFTDGSMGDMIYFNYSRK---GLVVDFVPDVRRRLQLGCKSTNVGRITCIVLGAG 236
      : * . : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Mensch          288 305 313 316 323 327 329 342
VVKHHIANANLMRNGADYAVYINTAQEFDSGDSGARPDEAVSWGKIRV--DAQPVKYVYAD 342
S.vulgaris    LPKHHICNANMRNGADFAVYINTAQEYDSGDSGARPDEAVSWGKISS--TGKAVEVHCD 358
P.falciparum LPKHHVCNANMRNGADFAVVNTASEYDSGDSGANTEALSWGKIKYQTNNHVKVFGD 471
T.brucei     LPKHLLRN---VQADAVVYVTGSDADGCESSCNVMADRANGLLSP--NCDVVRVHGD 290
      : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Mensch          ASLVFPLVAETFAQKMDAFMHEKNED 369
S.vulgaris    ATIAFPLVAETFAVKKEKASKVNGF- 384
P.falciparum ATILFPLVAETFAVKKEKASKVNGF- 495
T.brucei     ATIISPLVAETFAVKKEKASKVNGF- 316
      * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *

```

4.14 Abbildung: Ein Clustal W Alignment verschiedener DHS Sequenzen und der pflanzlichen HSS. Zeile 1. DHS des Menschen (L39068), Zeile 2. pflanzliche HSS von *Senecio vulgaris* (AJ010120), Zeile 3. DHS von *P. falciparum* Dd2 (AF290977) und Zeile 4. DHS von *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Die unterlegten Aminosäuren sind konservierte Aminosäuren in der NAD-Bindungsstelle (grau) zwischen Position 105 Serin und Position 342 (fettgedruckt) Asparaginsäure und der Spermidinbindungsstelle (hellgrau) zwischen Position 243 Asparaginsäure und Position 329 Lysin (eingerahmt). Die Sternchen markieren übereinstimmende Aminosäuren und die Doppelpunkte markieren die Ähnlichkeit der Aminosäuren (Kaiser, et al., 2003a).

#### 4.3.4 Amplifikation des Fulllength - Klons der DHS/HSS codierenden Sequenz aus der genomischen DNA des *P. falciparum* NF54 - Stammes

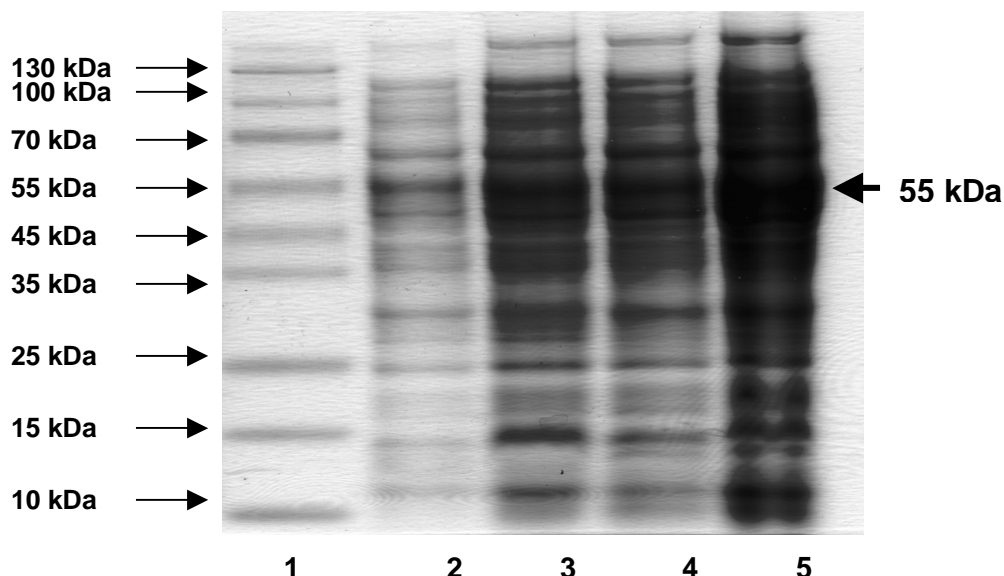
Der Fulllength - Klon der DHS/HSS codierenden Sequenz aus dem *P. falciparum* Chloroquin-sensitiven NF54 - Stamm konnte mittels spezifischer Primer amplifiziert werden. Anhand der N-terminalen und C-terminalen Endes der DHS codierenden Sequenz des Dd2 - Stammes wurden die spezifischen Primer 7 F # (ATG GTG GAT CAC GTT TC) und 8 R # (TCA CAT ATC TTT TTT CCT C) konstruiert. Die Gesamtlänge des DHS/HSS Klons betrug 1491 bp. Das isolierte Fragment wurde in einen multicopy Vektor "pSTBlue Acceptor" (Fa. Novagen) kloniert. Die Selektion erfolgte durch Insertionsinaktivierung der  $\beta$ -Galactosidase. Ein Aminosäuresequenz Alignment, der durch Sequenzierung erhaltenen DHS/HSS codierenden Sequenz des NF54 - Stammes und der DHS codierenden Sequenz des Dd2 - Stammes, wies zwei Unterschiede auf (Abb. 4.15). Der erste Unterschied in der Aminosäuresequenz liegt in der Position 328, der zweite Unterschied in der Aminosäuresequenz liegt in der Position 372. Dort befindet sich in der Dd2 Sequenz ein Leucin im Gegensatz zum Phenylalanin beim NF54 - Stamm. Diese beiden Unterschiede bewirken keine Verschiebung des Leserahmes.

**MVDHVSFIEV NKIRSDDECDADSHNEGDNIEDAKASVFKSSLIPEKTDVVKGLNFDK**  
 EVDLHEFINNYKYMFGFQATNLGISIDEINKMIYYKYKDENIKSEPNNENLNCNNVSED  
 LNKDQENHLYHYEKKKKSCIIWLSFTSNMISSGLREIFVYLAKNKFIDVVVTTAGGIEEDI  
 IKCFSNTYIGDFNLNGKKLRKKGWNRIGNLIVPNDNYCKFEDWLQPILNKMLHEQNEK  
 NEQMFLKKLEKRKKKYNNNKNKNDNNNDNDNVWGNEKNDQNFNQYNQGQESFKK  
 DSNIYTNDVSNKKNHINNYINNYDSDSDDQCDMYYLSP\*SEFINTLGKEINDESSLIYW  
 CYKNDIPIFCPGLTDGSLGDNLFFHNYGKKIKNNLILDIVKDIKKNLAMNCEKSGIILG  
 GGLPKHHVCNANLMRNGADFAVYVNTASEYDGS DSGANTTEALSWGKIKYGGQTNNH  
 VKVFGDATILFPLMVLNSFYLYDQKRKKDM

4.15 Abbildung: Die Aminosäuresequenz der DHS/HSS codierenden Sequenz aus *P. falciparum* (NF54 - Stamm) (467 Aminosäuren). Die zwei Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind zum einen durch ein \* (Position 328) gekennzeichnet und zum anderen grau unterlegt (Position 372). Die fettgedruckten Aminosäuren zeigen die Primer 7 # (MVDHV) und 8 # (RKKDM).

#### 4.3.5 Überexpression der DHS/HSS codierenden Sequenz aus dem *P. falciparum* Stamm NF54 im pET15b Expressionsvektor und Nachweis des DHS/HSS Proteins nach Transformation in BL21(DE3)plysS kompetente *E. coli* Zellen

Für die Überexpression des DHS/HSS Proteins wurde das T7 Polymerase-Promotorsystem nach Tabor und Richardson (1992) mit den Expressionsprimern Pex forward #GGT ATC ATA TGG TGG ATC ACG TTT TC (Nde Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen) und Pex reverse #TTA ATG GAT CCT CAC ATA TCT TTT TTC CTC (Bam HI Schnittstelle ist unterstrichen) verwendet. Die DNA des bereits selektierten Klons wurde als Template DNA ausgewählt. Dann erfolgte eine Subklonierung in den mit BamHI und NdeI restringierten Expressionsvektor pET15b (5708 bp). Eine Sequenzierung ermöglichte die Überprüfung des Konstrukts auf die richtige Insertion des Leserahmens. Ein Aliquot von 20µl der Zellysate wurde auf einem 10%-igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und wies ein Protein mit einer Größe von 55 kDa auf. Nach der Transformation in einen *E. coli* Stamm mit T7 Polymerase erfolgte die Bindung der T7 Polymerase induktorabhängig an den T7 Promotor des Expressionsplasmids. Dieser Vorgang bedingt die Expression des Proteins. Die Expression fiel jedoch, wie bereits für die Dihydrofolatreduktase von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, schwach aus. Ein möglicher Grund könnte der AT-Reichtums des Gens (52,23%) sein. Die Abb. 4.16 zeigt, dass ein 55 kDa großes Protein exprimiert wurde.

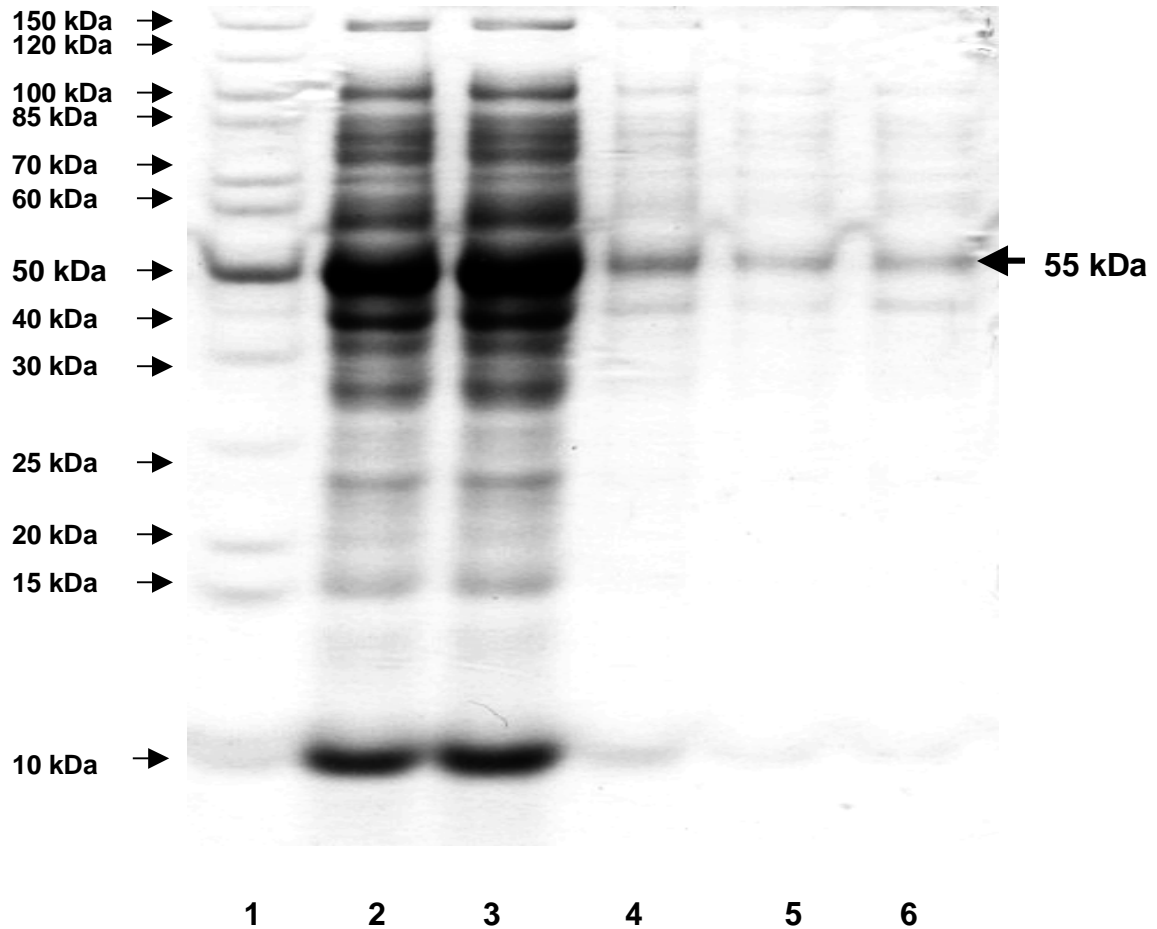


4.16 Abbildung: Nachweis des DHS/HSS Proteins aus *P. falciparum* nach IPTG induzierter Genexpression in *E. coli* BL21 auf einem 10%-igem SDS Polyacrylamidgel. Spur 1. Prestained Protein Marker Fa. MBI Fermentas 10 – 180kDa, #SM0671 DHS/HSS 0 Stunden nach der Induktion, Spur 3. DHS/HSS 1 Stunde nach der Induktion, Spur 4. DHS/HSS 2 Stunden nach der Induktion, Spur 5. DHS/HSS 3 Stunden nach der Induktion.

#### 4.3.6 Aufreinigung des exprimierten HSS/DHS Proteins aus *P. falciparum* mittels einer Nickel-Chelataffinitätschromatographie

Für die spezifische Aufreinigung der Proteine wurde der Rohextrakt der bakteriellen Expressionskultur auf eine Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) Säule gegeben. Die Ni-NTA-Agarose besteht aus dem Chelatbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) mit den gebundenen Ni<sup>2+</sup> Ionen und der Agarose gebildet wird. Aufgrund der 6x His-Tags des DHS/HSS Proteins am N-terminalen Ende bindet das Protein an die Ni<sup>2+</sup> Ionen, die mit NTA als Chelatkomplex gebunden an die Agarose vorliegen (Hochuli *et al.*, 1988). Das DHS/HSS Protein wird somit mit seinem 6x His-Tag von der Säule zurückgehalten, während andere Proteine die Säule durchlaufen. Aufgrund der starken Bindungsaffinität des 6x His-Tags können unter stringenten Waschbedingungen andere Proteine, die an die Ni-NTA Säule binden, leicht entfernt werden. Das an die Ni-NTA Säule gebundene Protein kann auf zwei Arten von der Säule eluiert werden. Die native Methode beruht auf Konkurrenz mit Imidazol, das an die Ni-NTA Säule bindet und das gebundene Protein verdrängt. Mit einer zunehmenden Imidazol Konzentration im Waschpuffer wird das gebundene Protein von der Säule eluiert (Janknecht *et al.*, 1991). Die denaturierende Methode basiert auf unterschiedlichen pH-Werten, hierbei werden mit zunehmend sauren pH-Werten die Histidinreste protoniert und dissoziieren von der Ni-NTA Säule. Die exprimierten Proteine in dieser Arbeit wurden unter nativen Bedingungen aufgereinigt, um sie anschließend einem Enzymaktivitätsassay zu unterziehen.

Der Nachweis des eluierten DHS/HSS Proteins erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wurde mit einer Coomassieblau Färbung sichtbar gemacht (Abb. 4.17). Eine schwache Bande von 55 kDa trat in den beiden Waschschrritten und im ersten Eluat auf, im zweiten Eluat war keine Bande mehr zu sehen. Die Protein Konzentration des DHS/HSS Proteins wurde nach einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt. Die Konzentration des DHS/HSS Proteins betrug 0,16 µg/µl im Eluat.



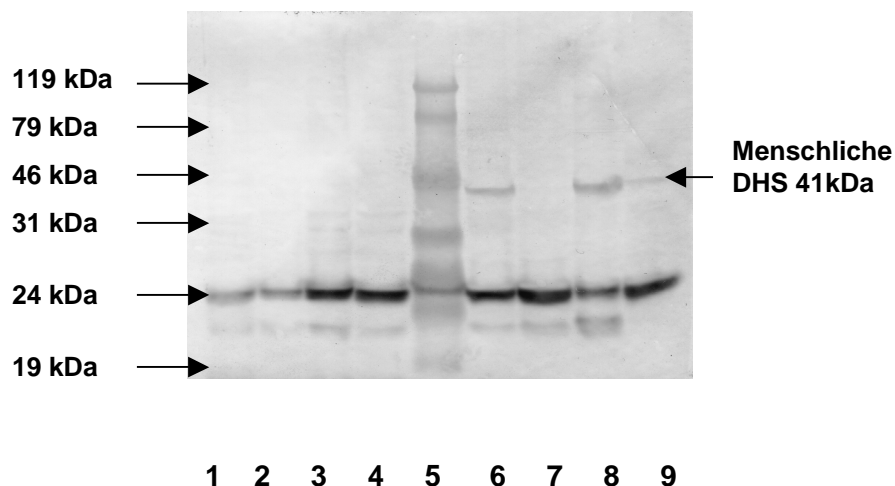
4.17 Abbildung: 10%-iges SDS Polyacrylamidgel mit den gereinigten Fraktionen des DHS/HSS Proteins nach Reinigung durch den Ni-NTA Spin Kit. Spur 1. Protein Marker Fa. MBI Fermentas 10 – 200kDa, #SM0661 2. DHS/HSS Rohextrakt 3 Stunden nach der Induktion, Spur 3. DHS/HSS Zellen nach der Lyse, Spur 4. DHS/HSS Erste Waschfraktion, Spur 5. DHS/HSS Zweite Waschfraktion, Spur 6. DHS/HSS Erstes Eluat

#### 4.3.7 Untersuchung zur Kreuzreaktion zwischen dem DHS/HSS Protein aus *P. falciparum* und einem polyklonalen Antikörper gegen das menschliche DHS Protein

Mit Hilfe der Western Blot Technik sollte eine mögliche Kreuzreaktion zwischen dem exprimierten DHS/HSS Protein aus *P. falciparum* und einem polyklonalen Antikörper, der gegen die menschliche Deoxyhypusinsynthese gerichtet ist, erfolgen. Der primäre Antikörper (anti DHS) wurde mit einem biotinylierten sekundären Antikörper aus der Ziege (anti IgG), sowie einem Konjugat aus Streptavidin mit alkalischer Phosphatase detektiert. Die Farbreaktion erfolgte mit p-Nitro Blau Tetrazolium Chlorid (NBT).

Als Kontrolle diente das aufgereinigte menschliche DHS Protein von zwei verschiedenen Klonen. Der primäre Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:2500, der sekundäre Antikörper und das alkalische Phosphatase-Konjugat wurden in einem Verhältnis von 1:10.000 eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass keine Kreuzreaktion zwischen dem parasitären DHS/HSS Protein und dem polyklonalen menschlichen Anti-DHS Antikörper stattgefunden hatte ( Abb. 4.18). Dieses Ergebnis war erwartet worden, da bei einem Alignment der DHS/HSS aus *P. falciparum* und der menschlichen DHS nur eine 44%-ige Homologie bestand (nicht dargestellt). Der Western Blot zeigt (Spur 6 und 8) das menschliche DHS Protein mit einer Größe von 41 kDa nach einer Induktion von 3 Stunden.



4.18 Abbildung: Western Blot mit einem polyklonalem Antikörper gegen das menschliche DHS Protein. Spur 1. Rhodopseudomonas HSS (0 Stunden), Spur 2. Rhodopseudomonas HSS (3 Stunden), Spur 3. NF54 HSS/DHS (0 Stunden), Spur 4. NF54 HSS/DHS (3Stunden), Spur 5. Prestained Protein Marker (Fa. MBI Fermentas #SM0441), Spur 6. DHS Mensch Klon 2 (0 Stunden), Spur 7. DHS Mensch Klon 2 (3 Stunden), Spur 8. DHS Mensch Klon 4 (3 Stunden), Spur 9. DHS Mensch Klon 4 (0 Stunden).

## 4.4 Isolierung, Sequenzierung und Analyse einer eIF5A codierenden Genregion aus *P. vivax*

### 4.4.1 Klonierung einer eIF5A codierenden Sequenz aus *P. vivax* durch Amplifikation und Überexpression in einen pET15b Expressionsvektor

Auch der eukaryontische Translationinitiationsfaktor eIF5A könnte ein wichtiges Target für die Chemotherapie der Malaria in der Zukunft darstellen. Die Rolle und Funktion dieses Faktors ist jedoch nach dreißig Jahren Forschung nur partiell geklärt. Derzeit vermutet man, dass eIF5A an der Biosynthese und am Metabolismus von RNA beteiligt ist und seine Funktion auf der Translation spezifischer mRNA Moleküle beruht. Neuere Untersuchungen sprechen dafür, dass der Faktor eine Rolle in der Expression von Proteinen in der G1-S Phase des Zellzyklus spielt (Jin *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass eIF5A in der AIDS-Therapie den Co-Faktor der Rev und Rex Proteine (Bevec und Hauber, 1997) darstellt, sowie auch in den Signaltransduktionsprozessen in der Krebstherapie ein wichtiges Target ist, veranlasste uns, den eIF5A Faktor aus *P. vivax* zu isolieren. Ferner ließ das Vorhandensein einer DHS/HSS codierenden Genregion in *P. falciparum* auch das Vorhandensein des zu aktivierenden eIF5A vermuten.

Da der eIF5A Faktor aus *P. falciparum* bereits sequenziert war (Gardner *et al.*, 2002, Molitor *et al.*, 2004) und die Genomsequenzierung von *P. vivax* momentan erfolgte fassten wir den Entschluss den eukaryontischen Translationinitiationsfaktor aus *P. vivax* zu isolieren. Aus den „expressed sequence tags“ Genbibliotheken im Rahmen der Genomsequenzierung von *P. vivax*, konnte ein 330 bp codierendes, genomisches DNA Fragment identifiziert werden, das eine signifikante Homologie zu dem eukaryontischen Translationinitiationsfaktor 5A aus *P. falciparum* und eIF5A aus *Nicotiana plumbaginifolia* aufwies. Die Gesamtsequenz wurde durch Verlängerung der Partialsequenz erhalten und betrug 486 bp (162 Aminosäuren) (Abb. 4.19 und 4.20).

Da es bislang nicht möglich ist, *P. vivax* in einer kontinuierlichen Kultur zu halten, um möglicherweise genomische DNA isolieren zu können, wurde genomische DNA, die uns hierfür freundlicher Weise von James Barnwell vom Konsortium der Genomsequenzierung zur Verfügung gestellt wurde, verwendet.

Die verwendeten Primer für die Partialsequenz waren: P.v. EIF5A 1# ATG TCA GAC CAC GAA ACG T und P.v. EIF5A 2# CCT TGT CTC TCC ATT ATC A). Ausgehend von der Proteinsequenz der eIF5A Partialsequenz wurde an Hand von Datenbankvergleichen gegen die erhaltenen Aminosäuresequenzen des Konsortiums (The TIGR *Plasmodium vivax* genome project), die gesamte Nukleinsäuresequenz von eIF5A zunächst auf bioinformatischem Weg gefunden. Dies ermöglichte die Konstruktion eines 3' Primers #-GGA GGA CAA CTCC TTCACCG- (P.v. rev 4, Abschnitt 2.10) und die Isolierung eines 486 Basenpaaren großen Fragments (Abb. 4.19) aus genomischer DNA von *P. vivax*, und somit dem *Fulllength* - Klon. Das isolierte Fragment wurde in einen multicopy Vektor "pSTBlue Acceptor" (Fa. Novagen) kloniert. Die Selektion erfolgte durch Insertionsinaktivierung des  $\beta$ -Galactosidasegens.

```

ATGTCAGACCACGAAACGTATGATAACATCGATGCGGGAGCATCCCAGACGTACC
CTGTGCAGGCAGGTGCCATAAAGAAAAACGGCCACGTGATGCTAAAGGAGCATC
CTTGCAAAGTGGTAGATTACTCCACGTCCAAAACGGGAAAGCACGGTCATGCCAA
GGCACATATTGTAGGCATCGACATTTTTACGGGAAAAAATATGAAGATATATGCC
CCACCTCTCACAATATGGATGTTCTGTGGTGAAGAGAACTGAGTTGCAGCTGAT
TGACATTACAGAGGATGGTTTTGTTTCTTTACTGTATGATAATGGAGAGACAAAGG
ATGATTGAGCTTACCAAAGGACTCGGATGGCAACCCCGATGACGTGGCCAAGCA
GATTCGTACCCTCTTCGATGGCGGCAAGTCTGTGCTGGTCAGCGTGTTGTCCGCG
TGTGGCCAGGAGAAGATCATCGCGGTGAAGGAGTTGTCCTCCTAG

```

#### 4.19 Abbildung: Die Nukleinsäuresequenz von eIF5A aus *P. vivax* (486 Basenpaare)

```

MSDHETYDNIDAGASQTYPVQAGAIKKNHVMLKEHPCKVVDYSTSKTGKHGHAKA
HIVGIDIFTGKKYEDICPTSHNMDVPVVKRTELQLIDITEDGFVSLLYDNGETKDDLSP
KSDSGNPDDVAKQIRTLFDGGKSVLVSVLSACGQEKIIAVKELSS

```

#### 4.20 Abbildung: Die Aminosäuresequenz von eIF5A aus *P. vivax* (162 Aminosäuren)

Ein Alignment (Abb. 4.21) des eukaryontischen Translationinitiationsfaktors aus *P. vivax* zeigt eine hohe Homologie zu *P. falciparum*, *Toxoplasma gondii* und *Arabidopsis thaliana*. Das klonierte eIF5A Gen zeigt eine Nukleinsäureidentität von 82% und eine 97% Identität auf der Aminosäureebene zu *P. falciparum*. Im Gegensatz dazu beträgt die Homologie von eIF5A der zwei Plasmodien Spezies zur Aminosäuresequenz des Menschen nur 52% und macht eIF5A zu einem attraktiven Target. Interessant ist auch, dass das eIF5A Gen aus *P. vivax* zu seinem Homologen aus *A. thaliana* eine 58%ige und zu *Nicotiana plumbaginifolia* eine 62%ige Übereinstimmung auf der Aminosäureebene zeigt. Die Homologie von eIF5A aus *P. vivax* zu *T. gondii* beträgt 74%. Aufgrund der Tatsache, dass eIF5A aus *P. vivax* und eIF5A aus *Arabidopsis* eine hohe Homologie aufweisen, liegt der Schluss nahe, dass sich eIF5A aus *P. vivax* aus den pflanzlichen Homologen aus *Arabidopsis* und *Nicotiana* rekrutiert.

```

P.v.  --MSDHETYDNIDAGASQTYPVQAGAIKKNGHVMLKEHPCKVVDYSTSKTGKHGHAKAHI
P.f.  --MSDHEMYDNIDAGASQTYPVQAGAIKKNGHVMLKEHPCKVVDYSTSKTGKHGHAKAHI
T.g.  MSDAEDVTFETADAGASHTYPMQAGAIKKNGFVMLKGNPCKVVDYSTSKTGKHGHAKAHI
A.t.  -MSDDEHHFEASESGASKTYPQSAGNIRKGGHIVIKNRPCVVVEVSTSKTGKHGHAKCHF
      ***  ***  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

P.v.  VGIDIFTGKKYEDICPTSHNMDVPVVKRTELQLIDITEDGFVSLLYDNGETKDDLSLPKD
P.f.  VGIDIFTGRKYEDICPTSHNMDVPVVKRTELQLIDITEDGFVSLLYDNGDTKDDLSLPKD
T.g.  VGLDIFTGKKYEDVCPTSHNMEVPNVKRSEFQLIDLSDDGFCTLLLENETKDDLMLPKD
A.t.  VAIDIFTAKKLEDIVPSSHNCDVPHVNRVDYQLIDITEDGFVSLLTDSGGTKDDLKLPTD
      *  ****  * ** * *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

P.v.  SDGNPDDVAKQIRTLFDGGKSVLVSVLSACGQEKIIAVKELSS
P.f.  TEGNLDEVAKQIRNLFDNGKSVLVSVLSACGQEKIIAAKELSS
T.g.  SEGNLDEVATQVKNLFTDGKSVLVTVLQACGKEKIIASKEL--
A.t.  DG-----LTAQMRLGFDEGKDIVVSVMSSMGEEQICAVKEV--
      *      *  **  * * * * * * * * * * * *

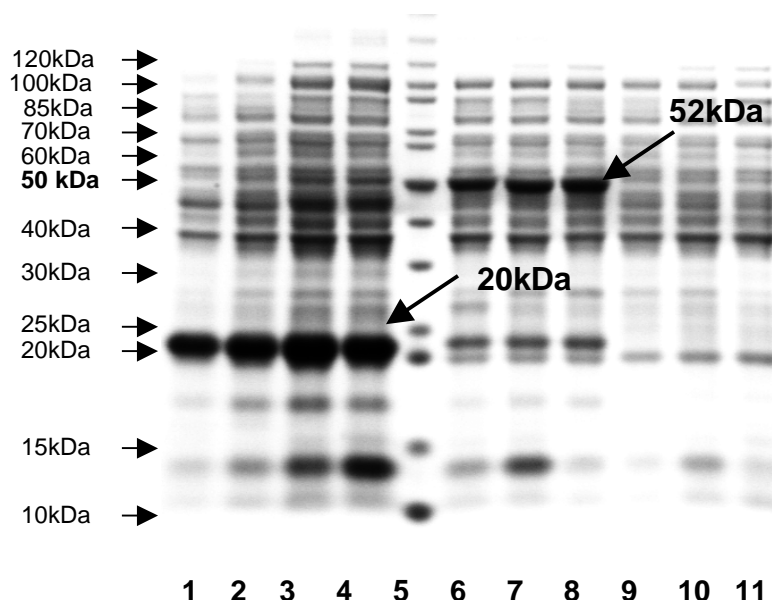
```

**4.21** Abbildung: Alignment von 4 verschiedenen eIF5A Aminosäuresequenzen, *P. vivax* (P.v.), *P. falciparum* (P.f.), *Toxoplasma gondii* (T.g.) und *Arabidopsis thaliana* (A.t.). Die fettgedruckten Aminosäuren weisen die Unterschiede von der *P. vivax* eIF5A codierenden Sequenz zu der von *P. falciparum* eIF5A codierenden Sequenz auf. Die Sternchen markieren übereinstimmende Aminosäuren (Kaiser, *et al.*, 2003a).

#### 4.4.2 Expression und Nachweis des eIF5A Proteins nach Transformation in BL21(DE3)plysS kompetente *E. coli* Zellen

Zur Überexpression wurde das T7 Polymerase-Promotorsystem nach Tabor und Richardson (1992) mit den Expressionsprimern Pex P. v. forward #-TTA ATC ATA TGT CAG ACC AAA CG- (Nde Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen) und Pex P. v. reverse #-TTA ATG GAT CCC TAG GAG GAC AAC TC (Bam HI Schnittstelle ist unterstrichen), unter Verwendung des bereits selektierten Klons der vollen Länge als Template DNA, ausgewählt. Dann erfolgte eine Subklonierung in den mit BamHI und NdeI restringierten Expressionsvektor pET15b (5708 bp). Das Konstrukt wurde auf richtige Insertion des Leserahmens durch Sequenzierung überprüft.

Nach der Transformation in einen *E. coli* Stamm mit T7 Polymerase erfolgte die Bindung der T7 Polymerase induktorabhängig an den T7 Promotor des Expressionsplasmids und dadurch bedingt die Expression des Proteins. Ein Aliquot von 20 µl der gewonnenen Zellysate wurde auf einem 10%-igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und es konnte ein 20 kDa großes Protein nachgewiesen werden (Abb. 4.22, Spur 1 – 4). Erwartet worden war aufgrund der Nukleinsäuresequenz ein ca. 18 kDa großes Protein. Das exprimierte Protein war möglicherweise bedingt durch posttranslationale Modifikation 20 kDa groß.

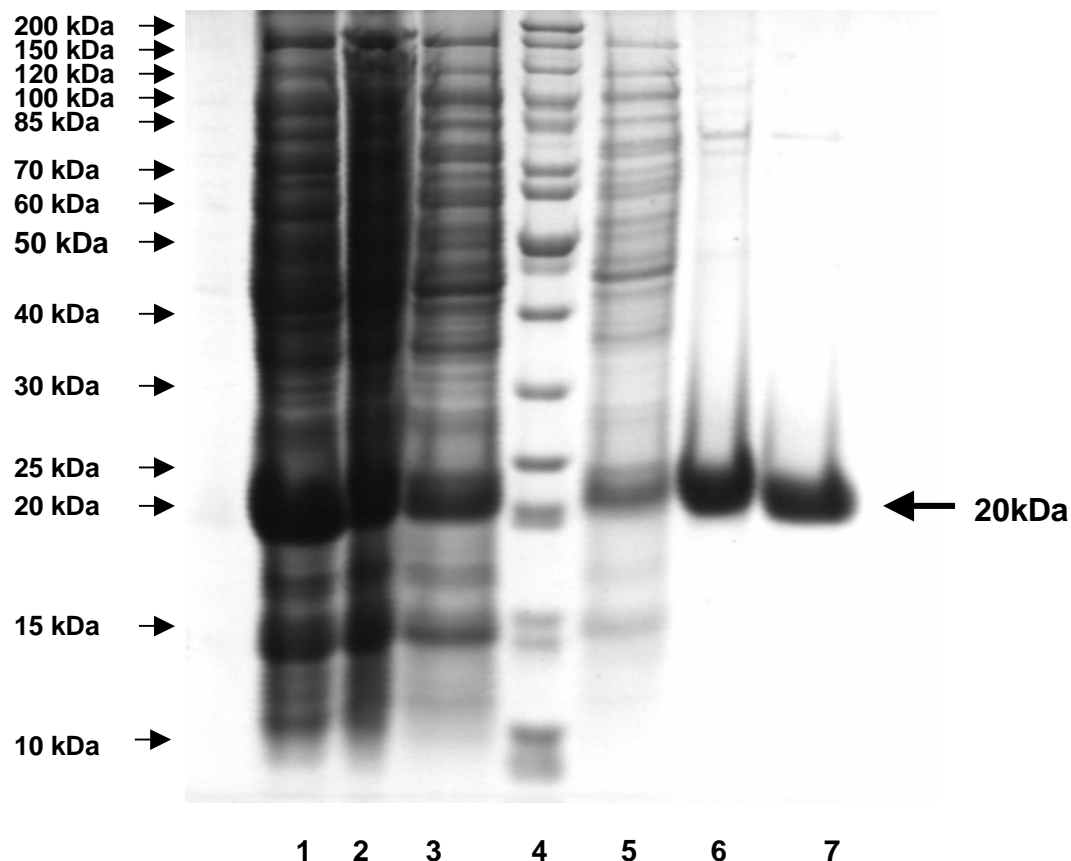


4.22 Abbildung: Nachweis des eIF5A Proteins aus *P.vivax* nach IPTG induzierter Genexpression in *E.coli* BL21 auf einem 10%-igem SDS Polyacrylamidgel. Spur 1 – 4. *P.vivax* 0 – 3 Std., Spur 5. Protein Marker (Fa. MBI Fermentas 10 – 200kDa, #SM0661), Spur 6 – 8. *Rhodospseudomonas viridis* HSS 0 – 2 Std. nach IPTG Induktion (Kontrolle ohne eIF5A Protein), Spur 9 – 11. BL21 0, 2, 3 Std. nach IPTG Induktion (Kontrolle ohne Plasmid)

#### 4.4.3 Aufreinigung des exprimierten eIF5A Proteins aus *P. vivax* mittels einer Nickel-Chelataffinitätschromatographie

Der Rohextrakt der bakteriellen Expressionskultur von eIF5A aus *P. vivax* wurde auf eine Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) Säule gegeben, um das Protein spezifisch durch einen Schritt aufzureinigen. Die Gegebenheiten dieser Methode sind unter 4.3.6 beschrieben. Das exprimierte Protein wurde, unter nativen Bedingungen aufgereinigt.

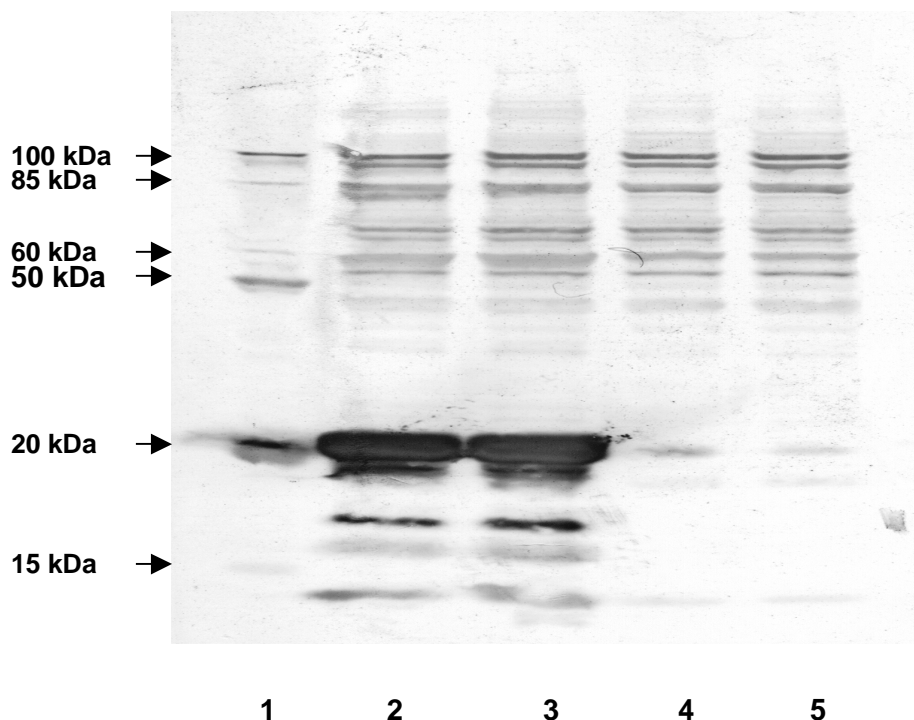
Der Nachweis des eluierten eIF5A Proteins erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wurde mit einer Coomassieblau Färbung sichtbar gemacht. Es konnte eindeutig im ersten und zweiten Eluat ein 20 kDa großes Protein nachgewiesen werden (Abb. 4.23, Spur 7). Die Protein Konzentration des eIF5A Proteins wurde nach einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt. Die Konzentration des eIF5A Proteins betrug 0,63 µg/µl.



4.23 Abbildung: 10%-iges SDS Polyacrylamidgel mit den aufgereinigten Fraktionen des exprimierten eIF5A Proteins, gewonnen durch den Ni-NTA Spin Kit. Spur 1. Rohextrakt 3 Stunden nach der Induktion, Spur 2. Zellen nach Lyse, Spur 3. Erste Washfraktion, Spur 4. Protein Marker 10 – 200kDa (#SM0661), Spur 5. Zweite Washfraktion, Spur 6. Erstes Eluat, Spur 7. Zweites Eluat.

#### 4.4.4 Western Blot Experimente mit dem eIF5A Protein aus *P.vivax* und einem polyklonalen Antikörper gegen das homologe NeIF-5A Protein aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae)

Das eIF5A Protein aus *Plasmodium vivax* wurde mit Hilfe der Western Blot Technik und einem polyklonalen gegen NeIF5A aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) gerichteten Antikörper, auf Kreuzreaktivität untersucht (Abb. 4.24). Die Detektion erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben. Als Kontrolle diente das aufgereinigte *Rhodopseudomonas viridis* HSS Protein, welches eine Größe von 52 kDa besitzt. Der primäre Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:5000, der sekundäre biotinylierte Antikörper sowie das Streptavidin alkalische Phosphatase-Konjugat wurden in einem Verhältnis von 1:10000 eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktion zwischen dem eIF5A Protein und dem NeIF5A aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) Antikörper stattgefunden hatte (Abb. 4.24). Der Western Blot zeigt (Spur 2 und 3) das eIF5A Protein aus *Plasmodium vivax* mit einer Größe von 20 kDa nach einer Induktion von 2 Stunden. Aufgrund der Homologie aus der Proteinsequenz zwischen den beiden Proteinen war eine Kreuzreaktion erwartet worden.



4.24 Abbildung: Western Blot, der die Kreuzreaktion zwischen dem eIF5A Protein von *P.vivax* mit einem polyklonalen Antikörper gegen das homologe NeIF5A Protein von *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) zeigt. Spur 1. Protein Marker (Fa. MBI Fermentas, 10 – 200kDa, #SM0661), Spur 2 und 3. *P.vivax* eIF5A 2 Stunden nach der Induktion, Spur 4.und 5. *Rhodopseudomonas viridis* HSS 2 Stunden nach der Induktion.

## 5. Diskussion

Aufgrund der zunehmenden Resistenz gegen Chemotherapeutika, die gegen Malaria wirksam sind, werden neue Strategien in der Medikamentenentwicklung benötigt. Ein neuer Ansatz ist das „Molekulare Targeting“, es handelt sich hierbei um die Isolierung einer Zielstruktur für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika. Die Suche konzentriert sich dabei auf Zielstrukturen von Genen, die möglichst nur in Parasiten vorkommen und für diesen essenziell sind. Es gibt aber auch Stoffwechselwege, die in menschlichen und parasitären Zellen vorkommen, deren Gene sich aber strukturell unterscheiden und somit auch als geeignete Zielstruktur in Frage kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden der Spermidin Metabolismus in *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* und die daran beteiligten Enzyme wie die Deoxyhypusinsynthase (DHS) und die Homospermidinsynthase (HSS) biochemisch und molekularbiologisch untersucht. Spermidin spielt in Plasmodien, ähnlich wie in anderen Eukaryonten, eine Rolle in der Zellproliferation. Die Tatsache, dass diese Spermidin metabolisierenden Enzyme bislang noch nicht untersucht wurden, liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die Aktivität dieser Enzyme ohne eine Hochreinigung nicht nachgewiesen werden kann.

Die Erforschung des Polyaminstoffwechselweges in *P. falciparum* ist momentan Gegenstand intensiver Untersuchungen. Das Plasmodium Genom Projekt liefert Sequenzinformationen von mutmaßlichen Polyaminbiosynthese Genen, die bis auf wenige Ausnahmen noch nicht charakterisiert wurden. Das Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese, die Ornithindecaboxylase (ODC), wurde bereits von Müller *et al.* (2000) kloniert, sequenziert und funktional analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um ein bifunktionales Enzym mit S-Adenosylmethionin Decarboxylase Aktivität handelt. Auch die Sequenz der Spermidin Synthase codierenden Region des 3D7 Stammes wurde bereits in „GenBank“ veröffentlicht von Luersen *et al.* (2000) und weist auf der Aminosäureebene eine 59% Homologie zu Arabidopsis und eine 42% Homologie zu der menschlichen Sequenz auf. Bislang wurde der Metabolismus des Triamins Spermidin, welches auf das Vorkommen von zwei Enzymen, d.h. der Deoxyhypusinsynthase (DHS) und Homospermidinsynthase (HSS) hindeutet, in *P. falciparum* noch nicht untersucht. Die Nukleinsäuresequenz einer mutmaßlichen DHS aus dem *P. falciparum* Dd2 - Stamm wurde im Jahr 2000 in „GenBank“

von Molitor *et al.* und später von Gardner *et al.*, (2002) aus dem *P. falciparum* 3D7 Stamm veröffentlicht.

In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass beide Nukleinsäuresequenzen von *P. falciparum* eine 73% Homologie zwischen den Aminosäurepositionen 292 und 346 zu der pflanzlichen HSS aus *Senecio vulgaris* (Asteraceae) aufweisen (Kaiser, 1999b).

### **5.1 Das Vorkommen von Spermidin metabolisierenden Enzymen in Chloroquin-sensitiven und -resistenten *Plasmodium falciparum* Stämmen**

Der erste Teil dieser Arbeit basierte auf einer biochemischen Untersuchung durch Inhibitionsexperimente mit den *Plasmodium falciparum* Stämmen NF54, Dd2 und R. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, die Existenz einer Deoxyhypusinsynthase bzw. Homospermidinsynthase unter Beweis zu stellen. Als Inhibitor der Spermidinbiosynthese wurde Dicyclohexylamin (DCA), als Hemmstoff der Deoxyhypusinsynthase wurde 1,7-Diaminoheptan (DAH) eingesetzt. Agmatin wurde zur Hemmung der Homospermidinsynthase verwendet.

In einer ersten Versuchsreihe konnte durch Einsatz von DCA, das als Inhibitor der Spermidinsynthase in Bakterien und menschlichen Zellen bereits erprobt wurde (Tholl *et al.*, 1998), gezeigt werden, dass das Triamin Spermidin in der Zellproliferation von *P. falciparum* essenziell ist. Untersucht wurden zwei *P. falciparum* Stämme NF54 (CQS) und R (CQR), die sich in ihrer Chloroquin - Sensitivität unterscheiden. Die Stämme waren unterschiedlich hemmbar durch DCA. Dies wird deutlich durch die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte nach 48 Stunden. Im Fall des NF54 - Stammes wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 97,2 µM erhalten, während der IC<sub>50</sub>-Wert für den R-Stamm 501 µM betrug (Tabelle 3). Bei einer Konzentration von 50 µM DCA konnte der NF54 - Stamm innerhalb von 72 Stunden vollständig inhibiert werden (Abb. 4.1 a), während beim R- Stamm eine Konzentration von 1000 µM und einer Dauer von 96 Stunden benötigt wurde. (Abb. 4.1 b). Diese Experimente zeigen deutlich, dass der NF54 - Stamm viel sensitiver auf den Inhibitor DCA reagiert. Die Wachstumshemmung konnte mit der Supplementation von exogenem Spermidin teilweise aufgehoben werden. Im Falle des R-Stammes war eine Supplementation mit 1000 µM exogenem Spermidin notwendig (Abb. 4.2 b), im Falle des NF54 - Stammes konnte durch Zugabe von 800 µM exogenem Spermidin der inhibitorische Effekt von DCA teilweise aufgehoben werden (Abb. 4.2a).

Der NF54 - Stamm zeigte einen weitaus besseren Supplementationseffekt im Vergleich zum R-Stamm (Abb. 4.2b). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in den ersten 24 Stunden die Supplementation die größte Wirkung aufwies, woraus man schließen kann, dass Spermidin in dieser Phase essenziell ist. Die erfolgreiche Aufhebung der Inhibition von DCA durch Supplementation von exogenem Spermidin zeigte, dass DCA spezifisch die Spermidinsynthase (SPS) hemmt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die inhibitorische Wirkung von DAH auf das Wachstum und die Vermehrung der *Plasmodium falciparum* Stämme NF54 (CQS) und R (CQR) untersucht. DAH, ein Spermidinanalogen, ist ein Inhibitor der Deoxyhypusinsynthase (DHS) in Säugetierzellen und konkurriert mit Spermidin um die Spermidinbindungsstelle des Enzyms. In einer Studie von Park *et al.* (1994) konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor eine vollständige Inhibition der Hypusinbiosynthese in Eierstockzellen von chinesischen Hamstern verursachte und eine Konzentration von 1  $\mu$ M DAH ausreichte, um mehr als 97% der Hypusin Produktion in CHO Zellen zu inhibieren.

Im Gegensatz zu dem inhibitorischen Effekt von DCA wurde mit 1,7- Diaminoheptan eine weitaus schlechtere Inhibition erzielt. Im Falle des NF54 - Stammes konnte eine 50% Abnahme der Parasitämie nach 48 Stunden bei einer Konzentration von 200  $\mu$ M DAH beobachtet werden. Nach 72 Stunden war die Parasitämie des NF54 - Stammes angehend 0 (Abb. 4.3 a). Der R-Stamm konnte bei einer Konzentration von 1000  $\mu$ M DAH nach 96 Stunden vollständig inhibiert werden (Abb. 4.3 b). Die  $IC_{50}$ -Werte, die nach 48 Stunden für die beiden *P. falciparum* Stämme ermittelt wurden, wichen nicht signifikant voneinander ab, im Falle des NF54 - Stamm betrug der  $IC_{50}$ -Wert 466  $\mu$ M, im Fall des R-Stamm lag er bei 319  $\mu$ M (Tabelle 3). Die Beobachtung, dass die Parasitämie innerhalb von 48 Stunden nach Verabreichung des Inhibitors eindeutig abnimmt, könnte darauf hindeuten, dass die DHS Aktivität in proliferierenden Zellen in diesem Zeitintervall hoch ist, da besonders in dieser Zeit die Synthese von Nucleinsäuren und Proteinen steigt. Die durch die Inhibitorstudie mit DAH erhaltenen Ergebnisse, ließen das Vorkommen einer DHS in *P. falciparum* vermuten.

In Eukaryonten wurde die biologische Bedeutung von Agmatin von Raasch *et al.* (2001) als einem endogenen Liganden an der Imidazol Bindungsstelle, der bei der Regulierung des Zentralen Blutdrucks eine Rolle spielt, beschrieben.

Eine andere wichtige Wirkung von Agmatin ist die Inhibition der Polyaminbiosynthese durch Hemmung der Ornithindecaboxylase über einen Antizym Mechanismus (Raasch *et al.*, 2001). Ferner ist Agmatin ein moderater Inhibitor der Homospermidinsynthese (HSS) (EC. 2.5.1.44) in höheren Pflanzen. Eine inhibitorische Wirkung von Agmatin konnte auch in zwei *P. falciparum* Stämmen, wie dem NF54 (CQS) Stamm mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 431  $\mu$ M und dem R-Stamm mit 340  $\mu$ M nach 48 Stunden, gezeigt werden (Tabelle 3). Auffallend war, dass für den Inhibitor Agmatin der Abfall der Parasitämie in den ersten 48 Stunden signifikant war (Abb. 4.4 a und 4.4 b). Die Ergebnisse ließen zunächst das Vorhandensein einer separaten, die Homospermidinsynthese codierenden Genregion vermuten. Es gibt zwar über die biologische Funktion des Homospermidins bislang keine Ergebnisse, aber es wäre möglich, dass die Homospermidinsynthese eine Funktion in der Zellproliferation hat. Dies könnte auch für *P. falciparum* zutreffen. Studien von Regunathan *et al.* (1996) und Satriano *et al.* (1998) weisen daraufhin, dass Agmatin möglicherweise die zelluläre Proliferation reguliert. In Säugetierzellen wirkt Agmatin durch Stimulation eines Antizyms auf die Ornithindecaboxylase, welches zu einer Reduzierung des Putrescine-Gehalts führt (Raasch *et al.*, 2001) und somit zur antiproliferierenden Aktivität beiträgt. Ein solcher Wirkungsmechanismus ist auch für den beobachteten inhibitorischen Effekt in *P. falciparum* nicht auszuschließen.

Um den Wirkungsmechanismus von Agmatin, sowie das Vorkommen von Homospermidin in *P. falciparum* näher zu untersuchen, wurde eine GC/MS Analyse durchgeführt. Tatsächlich gelang der Nachweis des Homospermidins in den beiden verschiedenen *P. falciparum* Stämmen NF54 und R. Ein Fragmentierungsspektrum wies die charakteristische Massenzahl  $m/z$  von 333 des Homospermidins auf (Abb. 4.5). Durch das Massenspektrum konnte erstmals gezeigt werden, dass Homospermidin in *P. falciparum* vorkommt. Zukünftige Untersuchungen, ob ein separater *hss* Locus in *P. falciparum* existiert, stehen noch aus. Außerdem nutzten wir die GC/MS Analyse, um den Spermidin Gehalt in den beiden *P. falciparum* Stämmen NF54 (CQS) und R (CQR), nach Anwendung verschiedener Inhibitoren, zu untersuchen. Im Kontrollexperiment unterschieden sich die erhaltenen Spermidin Konzentrationen der beiden Stämme signifikant. Während der NF54 - Stamm eine Spermidin Gehalt von 35  $\text{pmol}/10^6$  infizierte Erythrozyten aufwies, hatte der R-Stamm einen Gehalt von 11  $\text{pmol}/10^6$  infizierte Erythrozyten (Tabelle 6). Interessant ist, dass auch bei nicht infizierten Erythrozyten Spermidin gemessen werden konnte (1,16  $\text{pmol}/10^6$  Erythrozyten), obwohl diese weder über einen Nukleus noch synthetische Enzyme verfügen, die in der Polyaminbiosynthese involviert sind (Assaraf *et al.*, 1984).

Nach einer Studie von Uehara *et al.* (1980) ist der Spermidin Gehalt in normalen menschlichen Erythrozyten  $15.06 \pm 3.61 \text{ nmol}/10 \text{ Zellen}$ . Auch Mishra *et al.* (1997) wies einen Spermidin Gehalt in nicht infizierten Erythrozyten nach. Das vorhandene Spermidin könnte durch Aufnahme von exogenem Spermidin bedingt sein und auf Vorhandensein von Polyamin Transport Systemen in Erythrozyten zurückzuführen sein (Singh *et al.*, 1997). Nach der Inhibition mit jeweils  $200 \mu\text{M}$  DCA,  $200 \mu\text{M}$  DAH und  $200 \mu\text{M}$  Agmatin konnte jedoch kein Spermidin bestimmt werden (Tabelle 6). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die eingesetzten Inhibitoren den Spermidinhaushalt in infizierten Erythrozyten beeinflussen. Es könnte sein, dass aufgrund der externen Stress Stimuli, ausgelöst durch die Inhibitoren, Spermidin dazu gebracht wird entweder Spermin oder Homospermidin zu bilden.

Der signifikante Unterschied des Spermidin Gehalts zwischen den beiden *P. falciparum* Stämmen wird durch die Ergebnisse der Supplementationsexperimente mit exogenem Spermidin unterstützt (Abb. 4.2 a und b). Eine Supplementation von  $800 \mu\text{M}$  reichte aus, um im Fall des NF54 (CQS) Stamm das Wachstum wieder herzustellen, im Fall des R (CQR) Stamm wurde eine höhere Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  benötigt.

Zusammenfassend zeigten die durchgeführten Inhibitorexperimente, dass eine Spermidinbiosynthese und ein möglicher Metabolismus des Spermidins in *P. falciparum* existiert. Dies wurde durch die Klonierung einer Spermidinsynthese codierenden Genregion (Luersen *et al.*, 2000) und zusätzlich durch den Einsatz des spezifischen Inhibitors DCA, sowie durch die Supplementation mit exogenem Spermidin unter Beweis gestellt. Die Inhibitorexperimente mit DAH deuteten auf die Existenz einer DHS in *P. falciparum* hin. Ferner lässt die Publikation einer *dhs* codierenden Genregion in „GenBank“ (Molitor *et al.*, 2000/ Gardner *et al.*, 2002) diesen Schluss zu. Aufgrund der Inhibition mit Agmatin und einer GC/MS Analyse, die das Vorkommen von Homospermidin bestätigte, wurde auch das Vorliegen einer separaten HSS vermutet.

## 5.2 Der Einfluss von Agmatin im Vergleich zu Triclosan, Artemisinin und Chloroquin auf Chloroquin - resistente und Chloroquin - sensitive *P. falciparum* Stämme

In einem weiteren Experiment wurde der inhibitorische Effekt von Agmatin, in *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* Stämmen mit unterschiedlicher Chloroquin-Resistenz, mit dem Einfluss von neuen Chemotherapeutika in der Malariatherapie wie Artemisinin und Triclosan, sowie dem konventionellen Chloroquin, verglichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob das Inhibitionsprofil phänotypisch gleicher Stämme ähnlich ist. Die Ergebnisse zeigen, dass außer Artemisinin nur Agmatin die Parasitämie in den Chloroquin-resistenten (CQR) Stämmen R und Dd2, verringert.

Obwohl Artemisinin und Chloroquin beide die Bildung eines Hämозoin Dimers verhindern und daher den gleichen Angriffspunkt haben, kann eine Chloroquin Resistenz, die auf Mutationen im Chloroquin Transportgen beruht, durch Artemisinin und Agmatin aufgehoben werden (Pandey *et al.*, 1999). Agmatin, wie auch Artemisinin nutzen offensichtlich andere Transportsysteme als Chloroquin. Wahrscheinlich wird Agmatin wie auch andere Polyamine von Plasmodien durch ein aktives Polyamin Transport (PAT) System aufgenommen. Wang *et al.* (2003) charakterisierte die molekularen Anforderungen für den selektiven Transport von Polyamin Konjugaten in Zellen, die über aktive Polyamin Transporter verfügen. Die Studie zeigte, dass lineare Triamin Motive, den Transport in die Zelle verbessern, insbesondere 4,4-Triamin Konjugate. Noch überlegener im Transport waren N-(arylmethyl) Substituenten von Polyaminkonjugaten. Polyamine werden durch Vesikel -Transportsysteme in die Zellen eingeschleust. Zuerst binden Polyamine an einen Oberflächenrezeptor, dies führt zu einer Membran Evagination (Endozytose), um Polyamin reiche Vesikel in der Zelle bilden zu können. Das Derivat kann dann aus dem Vesikel in ein bestimmtes zelluläres Kompartiment via einem kationischen Symporter exportiert werden (Wang, *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen deutlich, dass die Inhibitoren Agmatin und Artemisinin eine bessere Selektivität und größere Toxizität, im Gegensatz zu Chloroquin und Triclosan, auf Chloroquin-resistente Stämme besitzen. Während Chloroquin und Artemisinin einen ähnlichen Wirkungsmechanismus haben, hat Agmatin verschiedene Möglichkeiten in die Zellproliferation einzugreifen: 1. Inhibition der HSS, 2. Inhibition der Spermidin metabolisierenden Enzyme, wie Spermidin und Spermin Acetyltransferase und 3. Kontrolle der Antizym Produktion und somit der Ornithindecaboxylase (ODC).

Ein Vergleich des Effektes auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien verschiedener *P. falciparum* Stämme von Artemisinin (Abb. 4.10 und f) und Agmatin (Abb. 4.10 a und b) zeigte, dass beide Hemmstoffe gegen alle erythrozytären Stadien aktiv waren. In den durchgeführten Untersuchungen führte allerdings Artemisinin, im Vergleich zu Agmatin, zu einer etwas stärkeren Abnahme von Schizonten in allen untersuchten Stämmen. Pandey *et al.* (1999) dagegen beobachteten, dass Artemisinin hauptsächlich das späte Trophozoiten Stadium beeinflusst, da die infizierten Erythrozyten stark mit Hemozoin Pigment beladen sind. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer *in vivo* Studie mit Artemether und dem Nagetiermalariaerreger *Plasmodium chabaudi chabaudi* von Chimanuka *et al.* (2001) erhalten. Im Gegensatz zu Chloroquin, auf das Merozoiten und junge Trophozoiten nicht sehr sensitiv reagieren, wies Artemether eine relative Inhibitionseffizienz in allen drei Entwicklungsstadien auf, aber mit einer erhöhten Effizienz während des Trophozoiten Stadiums. Artemisinin tötet aufgrund der Endoperoxidstruktur den Parasiten durch toxische freie Radikale, die nach der Spaltung der Endoperoxid Brücke durch eine molekulare Reaktion mit Hämoxoin erzeugt werden.

In der in der Einleitung wurde bereits der Hemmstoff Triclosan erwähnt, welcher ein Inhibitor der Enoyl-ACP Reduktase ist, dem Schlüsselenzym in der parasitären Fettsäurebiosynthese. Triclosan ist in der Pharmazie seit langem als Desinfektionsmittel und Antiseptikum aufgrund seiner antibakterieller Wirkung bekannt. Triclosan wirkt auf die *de novo* Biosynthese der Typ II Fettsäuren, insbesondere auf die Enoyl-ACP Reduktase im Apikoplasten des Parasiten. Interessant ist dieser Hemmstoff als Chemotherapeutikum gegen Malaria, weil *Plasmodium falciparum* Typ II Fettsäurebiosynthese Enzyme besitzt. Hingegen synthetisiert der menschliche Wirt Fettsäuren mit Hilfe eines enzymatischen Fettsäuresynthase I Komplexes. In einem Inhibitorexperiment konnte gezeigt werden, dass bereits 2  $\mu$ M Triclosan zu einer 50% Hemmung des Wachstums von *P. falciparum* (Surolia und Surolia, 2001). Insbesondere verhinderte Triclosan die Invasion von Trophozoiten in Erythrozyten.

In unseren Experimenten zeigte jedoch der Chloroquin-resistente Dd2 - Stamm wenig Empfindlichkeit gegenüber Triclosan (Abb. 4.8). Beim NF54 und R-Stamm wurde erst nach 96 Stunden eine vollständige Hemmung erreicht. Betrachtet man nun den Effekt auf die Entwicklungsstadien zeigte sich nach 24 Stunden im Fall vom NF54 und dem R-Stamm eine permanente Abnahme von Trophozoiten.

Die Tatsache, dass Triclosan die *de novo* Biosynthese der Typ II Fettsäuren inhibiert beweist die Wichtigkeit der Fettsäurebiosynthese im Energie Metabolismus für das Überleben der erythrozytären Stadien. Waller *et al.* (2003) zeigte, dass Triclosan vorwiegend auf junge Trophozoiten einen Effekt hat, da dieses Stadium möglicherweise den größten Energiebedarf hat.

Vergleicht man den entwicklungspezifischen Effekt von Triclosan und Chloroquin, so fällt bei der eingesetzten Chloroquin Konzentration von  $10^{-8}$  mM Chloroquin, in allen Stämmen auf (Abb. 4.10 h), dass der Wirkstoff vorzugsweise Schizonten hemmt.

### **5.3 Der Effekt von Agmatin, Triclosan, Artemisinin und Chloroquin auf die RNA Biosynthese der *P. falciparum* Stämme NF54, Dd2 und R**

Eine weitere Fragestellung die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, war der Einfluss der oben genannten Hemmstoffe auf die RNA Biosynthese. Hintergrund dieser Fragestellung war, dass der Wirkungsmechanismus für Agmatin durch die bisherigen Inhibitorexperimente nicht eindeutig geklärt werden konnte, aber eine wesentliche Funktion von Polyaminen in einer Wechselwirkung mit DNA oder RNA Molekülen liegt (Geneste und Hesse, 1998).

Aufgrund dieser Informationen wurde in dieser Arbeit der Effekt von Agmatin auf die Biosynthese der zellulären RNA im Vergleich zu Triclosan, Artemisinin und Chloroquin untersucht. Bei einer Konzentration von 200  $\mu$ M Agmatin und 2  $\mu$ M Triclosan konnte nach 24 Stunden kein Unterschied im Vorkommen und in dem Muster der zwei prominenten, ribosomalen 19S und 26S RNA Spezies in Bezug auf den Chloroquin-sensitiven (CQS) und die Chloroquin-resistenten (CQR) Stämme nachgewiesen werden (Abb. 4.11 a und b).

Im Fall von Artemisinin konnte bei einer Konzentration zwischen 40 und 200  $\mu$ M nach 24 Stunden, weder beim NF54 noch bei dem R (CQR) und Dd2 (CQR) Stamm rRNA isoliert werden. Dieser Effekt könnte möglicherweise auf ribosomale Veränderungen, welche schon bei Inhibitorexperimenten mit *Plasmodium berghei* und *P. falciparum* *in vitro* Kulturen mit [ $^3$ H] Artemisinin beobachtet wurden (Ellis *et al.*, 1985), zurückzuführen sein. Weiterhin zeigten experimentelle Arbeiten von Li *et al.* (1983), dass ein Rückgang der Nukleinsäurebiosynthese 2 bis 3 Stunden nach der Behandlung mit Artemisinin stattfand und Ellis *et al.* (1985) beobachtete eine Veränderung der ribosomalen Organisation nach dem Beginn der nuklearen

Segregation (nach 3 Stunden), die mit dem Beginn der Inhibition von Nukleinsäuren korreliert. In unseren Experimenten wurden die Parasiten für 24 Stunden mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Artemisinin inhibiert. In der Arbeit von Li *et al.* (1983) wurden die Parasiten maximal 5 Stunden und 20 Minuten dem Inhibitor ausgesetzt, bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$  und  $7 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ . Ellis *et al.*, (1985) beobachtete den inhibitorische Effekt über einen Zeitraum von 24 Stunden, wobei allerdings nach 24 Stunden fast keine Parasiten mehr vorhanden waren. Die nicht erfolgreiche Isolierung der rRNA nach Artemisinin Zugabe in den Experimenten der vorliegenden Arbeit, könnte somit auf einer zu langen Inkubationszeit beruhen. Auch im Fall einer Inhibition mit  $10^{-8} \text{ mM}$  Chloroquin für 24 Stunden, konnte keine rRNA aus dem NF54 (CQS), dem R (CQR) und Dd2 (CQR) Stamm isoliert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Zeitspanne von 24 Stunden in unserem Experiment, in der die Kulturen dem Hemmstoff ausgesetzt waren. Im Gegensatz zu 24 Stunden Chloroquin Inhibition wie in den Experimenten dieser Arbeit, zeigte eine experimentelle Arbeit von Gunasekera *et al.* (2003) eine erfolgreiche RNA Isolation des Dd2 - Stammes bei einer Inhibitorkonzentration von 50nM über einen Zeitraum von 6 Stunden. Damit liegt eine vierfach kürzere Einwirkungszeit und eine 50% niedrigere Inhibitorkonzentration vor, um RNA erfolgreich isolieren zu können.

#### **5.4 Isolierung und Expression des DHS/HSS Gens aus *P. falciparum* und Analyse der Spermidin und NAD Bindungsstellen**

Die pflanzliche Homospermidinsynthase (HSS) aus *Senecio vulgaris* (Asteraceae) (Kaiser, 1999b) zeigte eine signifikante Homologie zu verschiedenen DHS Genen anderer Eukaryonten (am signifikantesten zur menschlichen Deoxyhypusinsynthase, 59% auf der Aminosäureebene) und einer mutmaßlichen Deoxyhypusinsynthase codierenden Genregion aus dem *P. falciparum* Stamm Dd2 (Homologie auf der Aminosäureebene 41%). Die Homologie trat zwischen den Aminosäurepositionen 292 und 346 (73% Aminosäureidentität) und den Aminosäurepositionen 182 und 189 (100%) auf. Eine weitere, konservierte Region lag im Bereich der Positionen 625 und 1237 (Abb. 4.12 und 4.13). Da sich die eukaryontische HSS aus der DHS rekrutiert, konnten spezifische Primer aus konservierten Regionen des *dhs* und *hss* Gens konstruiert werden (Abb. 4.12). Diese Primer wurden eingesetzt, um mit Hilfe einer speziell entwickelten „Touchdown PCR“ (3.4.2.2) genomische Teilsequenzen aus verschiedenen *P. falciparum* Stämmen, in einer Größenordnung von 544 Basenpaaren, isolieren zu können.

Das „Touchdown PCR“ Verfahren bedingt eine definierte Temperaturerniedrigung pro Zyklus. Um eine spezifische Annäherung an die optimale Annealing Temperatur der Primer zu erzielen, wurde für die Touchdown PCR in unserem Experiment eine Erniedrigung von 0,5°C pro Zyklus, für insgesamt 10 Zyklen, durchgeführt. Durch Mißpriming kann eine zweifache Menge an falschem Amplifikationsprodukt pro Zyklus (vierfach pro Grad C) vermieden werden, und das korrekte Amplifikationsprodukt gegenüber den Amplifikationsartefakten angereichert werden (Don *et al.*, 1991).

Die so erhaltenen Amplifikate der *P. falciparum* Stämme R und NF54 unterschieden sich geringfügig von der *dhs* codierenden Genregion des Dd2 - Stammes (Abb. 4.13). Im Vergleich zum Dd2 - Stamm unterschied sich die erhaltene Partialsequenz des NF54 - Stammes in einer Aminosäure (Position 164 Phenylalanin statt Leucin 164) und die Partialsequenz des R-Stammes im Vergleich zum Dd2 - Stamm in 2 Aminosäuren (Position 70 Glutaminsäure statt Glutamin und in Position 164 statt Leucin Phenylalanin). Wie schon im Ergebnisteil erwähnt sind diese Unterschiede vermutlich auf stammspezifische Unterschiede oder Polymorphismen zurückzuführen, da ansonsten keine wesentlichen Aminosäureidentitätsunterschiede in der Partialsequenz gefunden wurden. Die Aminosäureunterschiede, die die Partialsequenzen des Dd2 - Stammes und R - Stammes zeigen, korrelierten nicht mit einer Resistenz gegen Chloroquin.

Seit dem Aufkommen von Chloroquin-resistenten *P. falciparum* Stämmen wurden einige genetische Polymorphismen in Plasmodien identifiziert, die als Indikatoren für eine Voraussage der Medikamentenantwort diskutiert werden (Binder, *et al.*, 2002). Allerdings bleibt es umstritten in wieweit diese Indikatoren bei der Beobachtung der Chloroquin-Resistenz von Nutzen sind.

Die signifikante Homologie des pflanzlichen *hss* Gens und des *dhs* Gens von verschiedenen Spezies basiert nicht nur auf der Aminosäureebene, sondern auch im dem Reaktionsmechanismus der Proteine (Substratspezifität Spermidin und NAD als Cofaktor).

Die DHS aus dem *P. falciparum* Stamm 3D7 (Gardner *et al.*, 2002) zeigt eine 57% Übereinstimmung auf der Aminosäureebene zur DHS der Pflanze *Nicotiana tabacum* (Ober und Hartmann, 1999a) und 53% bzw. 57% Übereinstimmung zur HSS von

*Senecio vulgaris* (Kaiser *et al.*, 1999a) und *Senecio vernalis* (Ober und Hartmann, 1999b). Auf der Nukleinsäureebene beträgt die Homologie zur HSS von *S. vulgaris* 73% in den Positionen 881 - 1043 und 100% in den Positionen 550 – 569. Ein Aminosäurealignment der DHS Sequenzen des *P. falciparum* Stammes Dd2, des Menschen und der pflanzlichen HSS (Abb. 4.14) weist eine signifikante Homologie der Spermidin (Position 243 Asparaginsäure - Position 329 Lysin) und der NAD (Position 105 Serin - Position 342 Asparaginsäure) Substratbindungsstellen auf. Im Gegensatz hierzu weist das Alignment aber auch signifikante Unterschiede in der Spermidinbindungstasche zwischen den beiden parasitären Aminosäuresequenzen (*T. b. rhodesiense* und *P. falciparum*) auf (Abb. 4.14). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass eine in „GenBank“ publizierte DHS Sequenz aus dem Vektor *Anopheles gambiae*, dem Verbreitetsten Vektor der Malaria in Afrika, signifikante Unterschiede der NAD und Spermidinbindungsstellen aufweist (Holt *et al.*, 2002). Dieser Befund eröffnet auch die Möglichkeit Zielstrukturen im Vektor anzugreifen.

Die Bindungsstellen des Cofaktors NAD und des Substrats Spermidin überlappen sich in ihrer dreidimensionalen Struktur. Aus diesem Grunde ist es möglich, dass eine Mutation in der Spermidinbindungsstelle die NAD Bindung beeinflusst und umgekehrt (Lee *et al.*, 2001). Lee *et al.* (2001) zeigten, dass eine Bindung von Spermidin oder des Inhibitors GC<sub>7</sub> (N<sup>1</sup>-guanyl-1,7-Diaminoheptan) nur in Anwesenheit des Cofaktors NAD erfolgt (Umland *et al.*, 2004). Außerdem konnte in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Umland *et al.* (2004) zur menschlichen kristallinen DHS mit dem gebundenen Inhibitor gezeigt werden, dass bei der menschlichen DHS eine Deletion bestimmter Aminosäuren (Asp-243, Asp-316, Glu-323 und Trp-327 (hellgrau unterlegte Aminosäuren in Abb. 4.14) einen Verlust der menschlichen Spermidin - Bindungskapazität zur Folge hat. Eine Substitution dieser hochkonservierten Aminosäuren mit Alanin verursacht einen fast vollständigen Verlust der Spermidinbindung und der enzymatischen Aktivität (Lee *et al.*, 2001). Die durch Deletionsmutationen ermittelten, für die Spermidinbindung essenziellen Aminosäuren, sind neben dem Vorkommen in der DHS des Menschen, in *P. falciparum*, auch partiell in der HSS von *S. vulgaris* hochkonserviert. Die Aminosäuresequenz der DHS von *T. b. rhodesiense* hingegen zeigt, dass drei der hochkonservierten Aminosäuren ersetzt sind (Tabelle 7). Anstatt Asparaginsäure (316) befindet sich Glutamin in der Spermidinbindungsstelle von *T. b. rhodesiense* und Glutaminsäure (323) ist durch Alanin und Tryptophan (327) ist bei *T. b. rhodesiense* durch Asparagin ersetzt.

Interessant ist auch, dass laut Umland *et al.* (2004), vier Aminosäuren (Lys-287, Tyr-305, Asp-316 und Glu-323) die hochkonserviert in DHS codierenden Regionen von verschiedenen Spezies vorkommen, eine potenzielle funktionale Bedeutung haben. In der menschlichen und der *P. falciparum* DHS codierenden Sequenz sind diese vier Aminosäuren konserviert. Die Aminosäuresequenz von *S. vulgaris* dagegen weist eine Substitution bei Tyr-305 (Tyrosin ist durch Phenylalanin ersetzt) auf. In allen Eukaryonten hingegen ist Tyrosin an dieser Position hoch konserviert, eine Substitution mit Alanin würde die NAD- und Spermidinbindung moderat reduzieren (Umland *et al.*, 2004). In der Sequenz von *T. b. rhodesiense* liegen zwei Substitutionen vor (Asp-316 ist durch Glutamin ersetzt und Glu-323 ist ersetzt durch Alanin). Diese genannten Substitutionen verdeutlichen, dass die Spermidinbindungsstellen, von *S. vulgaris* und insbesondere von *T. b. rhodesiense*, nicht hoch konserviert sind.

<b>NAD</b> <b>Bindungs-</b> <b>stelle</b>	<b>Mensch</b>	<b>S. v.</b>	<b>P. f.</b>	<b>T. b. r.</b>	<b>Spermidin</b> <b>Bindungs-</b> <b>stelle</b>	<b>Mensch</b>	<b>S. v.</b>	<b>P. f.</b>	<b>T. b. r.</b>
<b>Ser-105</b>	K	K	K	K	<b>Asp-243</b>	K	K	K	K
<b>Ser-109</b>	K	K	K	K	<b>His-288</b>	K	K	K	K
<b>Glu-137</b>	K	K	K	K	<b>Tyr-305</b>	K	Phe	K	K
<b>Asp-238</b>	K	K	K	K	<b>Asp-316</b>	K	K	K	Glu
<b>Asp-313</b>	K	K	K	K	<b>Glu-323</b>	K	K	K	Ala
<b>Asp-342</b>	K	K	K	K	<b>Trp-327</b>	K	K	K	Asn
					<b>Lys-329</b>	K	K	K	Leu

**7. Tabelle: Hochkonservierte Aminosäuren der NAD und Spermidinbindungsstellen in *P. falciparum* (*P.f.*), *S. vulgaris* (*S.v.*), des Menschen und *T. b. rhodesiense* (*T.b.r.*). K steht für die Konserviertheit dieser Aminosäure in der entsprechenden Sequenz und die 3-Letter Code Abkürzungen, im rechten Teil der Tabelle, für die durch Substitution ersetzte Aminosäure.**

Im Gegensatz zur Spermidinbindungsstelle, ist die NAD Bindungsstelle der menschlichen DHS, pflanzlichen HSS und der DHS aus den Parasiten *P. falciparum* (Dd2) und *T. b. rhodesiense* hoch konserviert (Tabelle 7). Nur Punktmutationen von drei Aminosäuren (Asp-342, Asp-313 und Asp-238, grau unterlegt in Abb. 4.14) führen nach Umland *et al.* (2004) zu einem signifikanten Verlust der NAD-Bindung. Diese drei Aminosäuren sind in den dargestellten DHS Sequenzen der vier Spezies konserviert (Abb. 4.14). Zwei weitere Aminosäuren, die in allen Eukaryonten konserviert sind, sind Ser-105 und Ser-109. Diese Aminosäuren verursachen bei einer Substitution mit Alanin nur eine reduzierte Bindungsaffinität des Cofaktors NAD.

Bislang konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Substitution von Ser-105 oder Ser-109 einen DHS Aktivitätsverlust herbeiführt. Betrachtet man das Alignment, so wird deutlich, dass diese Aminosäuren in allen vier Spezies konserviert sind und legt die Vermutung nahe, dass Ser-105 und Ser-109 essenziell für die Enzymaktivität sind.

Umland *et al.* (2004) zeigte, dass Mutationen, die die NAD Bindungskapazität reduzierten auch die Spermidin und GC<sub>7</sub> Bindung verringerten. Interessant ist auch, dass das C4 Atom von GC<sub>7</sub>, aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Spermidin, mit Lys 329 in der Spermidinbindungsstelle reagiert (Umland *et al.*, 2004). Diese Aminosäure ist nach Ergebnissen von Lee *et al.* (2001) in der Spermidinbindungsstelle in allen Eukaryonten konserviert. In der menschlichen und *P. falciparum* Sequenz ist dies auch der Fall, aber bei *T. brucei* ist diese Aminosäure durch Leucin ersetzt.

Zusammenfassend zeigt das Aminosäurealignment, dass alle hochkonservierten Aminosäuren der NAD Bindungsstelle in den vier Spezies vorliegen und somit keine reduzierte NAD Bindungskapazität durch eventuelle Substitutionen dieser Aminosäuren verursacht wird. Andererseits zeigt das Alignment aber auch signifikante Unterschiede in der Spermidinbindungsstelle zwischen den Aminosäuresequenzen von *T. b. rhodesiense* und *P. falciparum*.

Eine Verlängerung der Partialsequenz zum Fulllength DHS Klon (1491 bp / 467 Aminosäuren) des *P. falciparum* NF54 - Stammes konnte anhand von spezifischen Primern der DHS codierenden Sequenz des Dd2 - Stammes durch Amplifikation erhalten werden. Das DHS Protein unterscheidet sich von dem menschlichen Enzym signifikant durch das Auftreten einer Asparaginreichen Region (Position 45 bis 74, Abb. 4.13). Die Homologie zu den 3 menschlichen Isoformen der DHS beträgt zur Isoform c 37% und 44% zur Isoform a. Unterschiede zwischen dem menschlichen und parasitärem Enzym machen dieses Protein zu einem potenziellen Target. Interessant macht diese Zielstruktur auch die Tatsache, dass das Enzym über eine mögliche Homospermidinsyntheseaktivität verfügen könnte, da eine Homospermidinsynthese codierende Genregion im Menschen nicht vorkommt.

Weiterhin gelang die Expression der DHS Sequenz des *P. falciparum* Stammes NF54 unter Kontrolle des T7 Promoters in das T7/RNA Promotersystem von Tabor und Richardson (1992). Nach einer Induktion mit IPTG (0,4mM) zeigte das Protein eine, mit der Nukleinsäuresequenz berechnete übereinstimmende, Größe von 55 kDa (Abb. 4.16). Die Expression fiel jedoch, wie im Ergebnisteil bereits erwähnt wurde,

schwach aus. Ein möglicher Grund könnte der AT-Reichtums des Gens (52,23%) sein. Dieses Ergebnis allerdings steht im Gegensatz zu den Daten von Molitor *et al.* (2004). Den Autoren ist es nicht gelungen, die DHS codierende Sequenz des *P. falciparum* Stammes Dd2 (AF290977) in *E. coli* überzuexprimieren. Ein möglicher Grund könnten die stammspezifischen Unterschiede in der Nukleinsäuresequenz des NF54 - Stammes (Kaiser *et al.*, 2003a) zum Dd2 - Stamm sein, der von Molitor *et al.* (2004) verwendet wurde. Ein Aminosäuresequenz Alignment, der Partialsequenz codierenden DHS Sequenz des NF54 - Stammes und der DHS codierenden Sequenz des Dd2 - Stammes einer hochkonservierten Region, wies einen Unterschied in der Aminosäuresequenz auf (Abb. 4.13). Der Unterschied in der Aminosäuresequenz liegt in der Position 164. In der Position 164 befindet sich beim Dd2 - Stamm die Aminosäure Leucin im Gegensatz zur Aminosäure Phenylalanin beim NF54 - Stamm.

Eine Kreuzreaktion zwischen dem aufgereinigten, exprimierten DHS Protein aus *P. falciparum* und einem polyklonalen Antikörper, der gegen die menschliche Deoxyhypusinsynthase gerichtet ist, konnte nicht gezeigt werden (Abb. 4.18). Wie bereits erwähnt beträgt die Homologie zwischen der DHS aus dem *P. falciparum* Stamm NF54 und der menschlichen DHS (Isoform a) nur 44%. Daher war auch keine Kreuzreaktion zu erwarten.

Fortführende Arbeiten im Rahmen einer Diplomarbeit zeigten, dass es sich bei der isolierten DHS aus dem *P. falciparum* Stamm NF54 um ein bifunktionales Enzym handelt, das neben der Bildung von Deoxyhypusin die Bildung von Homospermidin katalysiert (Hammels, 2004). Bereits in anderen Organismen konnte eine Bifunktionalität der DHS nachgewiesen werden. Die DHS aus Tabak (Ober und Hartmann, 1999) und die DHS aus *Senecio vernalis* (Ober *et al.*, 1999 und 2003) katalysieren die Übertragung einer Aminobutyleinheit von Spermidin auf Putrescin unter der Bildung von Homospermidin. Die spezifische enzymatische HSS Aktivität der DHS des *P. falciparum* Stammes NF54, gemessen durch den Einbau von <sup>14</sup>C Spermidin, war allerdings 4.98fach geringer als die durchschnittlich gemessene Aktivität der DHS Aktivität (1686,3 U/mg Protein) (Hammels *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deoxyhypusinsynthase aus *P. falciparum* ein bifunktionales Enzym ist, welches in der Lage ist eine Aminobutyleinheit von Spermidin auf Putrescin zu übertragen. Diese Ergebnisse machen das DHS Protein zu einer attraktiven neuen Zielstruktur.

## 5.5 Isolierung und Analyse des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor 5A aus *P. vivax*

Das *P. vivax* Genom wird derzeit sequenziert (Carlton und Dame, 2000), da *P. vivax* sich in seiner Pathogenität von *P. falciparum* unterscheidet. Eine Besonderheit von *P. vivax* ist das Auftreten von Hypnozoiten, präerythrozytären Dauerstadien in der Leber, sowie auch die Vermehrung des Erregers in Retikulozyten. Die Genidentifizierung wird voraussichtlich wichtige Information bezüglich der unterschiedlichen klinischen Symptome liefern (Carlton und Dame, 2000). Außerdem soll die Entschlüsselung des *P. vivax* Genoms dazu beitragen, eine *in vitro* Kultivierung von *P. vivax*, die bislang nur einmal gelungen ist, zu umgehen. Für die Sequenzierung von *P. vivax* wurde der Stamm Salvador PEST I verwendet, der durch Passagen in Aotus Affen gehalten wird. Bislang zeigen die Daten der Genomsequenzierung, dass 78% der identifizierten Proteine Homologie zu *P. falciparum* Proteinen (Carlton, 2003) aufweisen.

Auch der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A könnte eine wichtige Zielstruktur für die antiparasitäre Chemotherapie in der Zukunft darstellen. Da der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A in der AIDS- und Krebstherapie bereits eine vielversprechende, neue Zielstruktur darstellt (Chen *et al.*, 1996), war es interessant die Funktion des Faktors im Zellzyklus von *P. vivax* zu untersuchen. Ferner ließ das Vorhandensein einer DHS/HSS codierenden Genregion in *P. falciparum* vermuten, dass sie den eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor aus *P. vivax*, einer fremden Spezies, aktivieren. Trotz jahrelanger Forschung ist die Funktion von eIF5A noch nicht vollständig entschlüsselt. Versuche an Hefedeletionsmutanten zeigten in der Vergangenheit, dass es sich bei eIF5A nicht um einen richtigen Translationinitiationsfaktor handelt, da die Proteinbiosynthese trotz Deletion von eIF5A zu 30% aufrecht erhalten blieb (Kang und Hershey, 1994). Neuere Untersuchungen einer Studie aus China weisen darauf hin, dass der Faktor in der Translation von spezifischen mRNAs im Zellzyklus zwischen der G1 und der S Phase involviert ist (Jin *et al.*, 2003). Weiterhin wird angenommen, dass er in der Replikation des HIV Virus und zwar als Cofaktor der Rev und Rex Proteine eine Rolle spielt (Bevec und Hauber, 1997). Durch Modulation von eIF5A konnte direkt in die Apoptose eingegriffen werden, indem die profilierende Wirkung durch die Bildung eines  $\gamma$ -Glutamyl Konjugats gehemmt wurde (Valentini *et al.*, 2002). Da bislang eIF5A nicht direkt gehemmt werden kann, ist eine Hemmung nur über die Deoxyhypusinsynthese (DHS) oder Deoxyhypusinhydroxylase (DHH) möglich. Während Deoxyhypusinsyntheseinhibitoren bereits in *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* getestet wurden, ist die Hemmung der

DHH noch nicht untersucht worden. Ciclopiroxolamin, ein Antimykotikum (Clement *et al.*, 2002) und das Pflanzengift Mimosin verhindern die Formation eines aktiven eIF5A durch Inhibition der DHH. Diese Substanzen könnten sich auch in der Behandlung von parasitischen Protozoen von Nutzen erweisen.

In Eukaryonten und Archaeobakterien ist eIF5A ubiquitär und spielt eine essenzielle Rolle in der Zellproliferation (Yao *et al.*, 2003). Eubakterien dagegen besitzen keinen Translationinitiationsfaktor 5A, aber ein entferntes Homolog, den „elongation“ Faktor P (EF-P) (Kyrpides und Woese, 1998). Zunächst wurde vermutet, daß Eubakterien nicht über DHS ähnliche Gene verfügen. Neuere Ergebnisse, basierend auf einer Blast Suche, aber deuten daraufhin, dass Eubakterien Gene besitzen, die eine nicht zu vernachlässigende Homologie zu Deoxyhypusinsynthase Genen aufweisen (Brochier *et al.*, 2004). Brochier *et al.* vermutete, dass aufgrund einer phylogenetischen Analyse, die mutmaßlichen *dhs* Gene in Bakterien von Archaeobakterien via einem horizontalen Gen Transfer (HGT) erworben wurde. Die Funktion dieser Gene bleibt jedoch bislang ungeklärt.

Das Vorkommen des eIF5A Faktors im Malariaparasiten *P. vivax* konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben werden. Mit Hilfe eines Aminosäure Alignments zwischen eIF5A von verschiedenen Spezies konnte ausgehend von einer 330bp großen Partialsequenz der Full Length Klon isoliert werden. Die erhaltene eIF5A Sequenz von *P. vivax* (Salvador I Stamm) besitzt einen offenen Leserahmen von 486 bp und codiert ein Protein mit der Größe von 162 Aminosäuren. Das klonierte eIF5A Gen zeigt eine Nukleinsäureidentität von 82% und eine 97% Identität auf der Aminosäureebene zu *P. falciparum*. Die Aminosäureidentität zwischen den eIF5A Genen der beiden Plasmodien Spezies und den drei menschlichen homologen Isoformen (Isoformen I Varianten b, c und d) dagegen beträgt nur ca. 52%. Außerdem zeigt das eIF5A Gen aus *P. vivax* zu seinem Homologen aus *Arabidopsis thaliana* und zwei Isoformen von *Nicotiana plumbaginifolia* eine 58% beziehungsweise 59% Übereinstimmung auf der Aminosäureebene. Aufgrund der Tatsache, dass eIF5A aus *P. vivax* und eIF5A aus *Arabidopsis* eine Homologie aufweisen, liegt der Schluss nahe, dass sich eIF5A aus *P. vivax* aus seinen pflanzlichen Homologen, wie *Arabidopsis* und *Nicotiana* rekrutiert.

Das in *Escherichia coli* exprimierte eIF5A Protein wurde unter nativen Bedingungen, über eine Nickelchelate-Affinitätschromatographiesäule aufgereinigt, um es anschließend einem Enzymaktivitätsassay zu unterziehen.

Das Protein eluierte mit einer Größe von 20 kDa in der Eluat Fraktion (Abb. 4.23). Die molare Masse des Proteins aus *P. vivax* ist vergleichbar mit der molaren Masse von eIF5A aus *P. falciparum* (Molitor *et al.*, 2004). Aufgrund der Aminosäureidentität von 59% zwischen dem eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor 5A aus *P. vivax* und den Isoformen von eIF5A aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) (Chamot *et al.*, 1992), wurde mit Hilfe eines Western Blots untersucht, ob eine Kreuzreaktion zu beobachten ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktion zwischen dem eIF5A Protein und dem NeIF5A aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) Antikörper stattgefunden hatte (Abb. 4.24). Hinsichtlich der Homologie zwischen den Proteinsequenzen der beiden Proteine war eine Kreuzreaktion erwartet worden.

Weiterführende Experimente zeigten, dass eine Aktivierung von eIF5A aus *P. vivax* mit Hilfe der Deoxyhypusinsynthese des *P. falciparum* Stammes NF54 erzielt werden konnte. Im Gegensatz zu dem Dd2 - Stamm (Molitor *et al.*, 2004) wurde eine spezifische Aktivität der DHS von 1686,3 U/mg Protein gemessen (Hammels *et al.*, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Isolierung der zellulären RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien, d.h. Schizonten und Trophozoiten von *in vitro* Kulturen des CQR *P. falciparum* Stammes R und eines nachfolgenden Northern Blot Experiments, die Expression von eIF5A in den Entwicklungsstadien keine signifikanten Unterschiede aufwies. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem von Molitor *et al.* (2004). Die Autoren zeigten, dass mittels einer Real Time PCR mit zellulärer RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *P. falciparum*, keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Entwicklungsstadien erhalten wurden. Allerdings konnte eine etwas erhöhte Transkriptbildung in den Schizonten festgestellt werden. In einem genomischen Southern Blot wurde gezeigt, dass es sich bei eIF5A aus *P. falciparum* vermutlich um ein single-copy Gen handelt (Hammels *et al.*, 2004 bislang unveröffentlicht) Ein vergleichbares Ergebnis liegt auch für den *P. falciparum* Dd2 - Stamm vor. Außerdem konnte erstmalig eine Inhibitionswirkung von Ciclopiroxolamin, einem spezifischen Inhibitor der Deoxyhypusinhydroxylase, am R - Stamm einer *in vitro* Kultur von *P. falciparum* nachgewiesen werden.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der Arbeit wurde der Spermidin Metabolismus in *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* molekularbiologisch und biochemisch untersucht. Ziel war es mögliche „molekulare Targets“ für neue Chemotherapeutika gegen Malaria zu identifizieren und analysieren.

Durch ein Inhibitorexperiment mit Dicyclohexylamin (DCA) und anschließender Supplementation von exogenem Spermidin erfolgte der indirekte Nachweis, dass es eine Spermidinsynthase (SPS) in *P. falciparum* gibt. Inzwischen konnte die Spermidinsynthase des *P. falciparum* 3D7 Stammes von Luersen *et al.* (2000) erfolgreich kloniert und deren Funktion nachgewiesen werden. Weiterhin ließen die durch die Inhibitorstudie mit 1,7-Diaminoheptan (DAH) erhaltenen Ergebnisse sowie der Genbankeintrag einer DHS codierenden Genregion in *P. falciparum* (Molitor *et al.*, 2000/ Gardner *et al.*, 2002), den Schluss zu, dass eine DHS in *P. falciparum* existiert. Aufgrund der Inhibitionsexperimente mit Agmatin und einer nachfolgenden GC/MS Analyse, bei der erstmalig Homospermidin in *P. falciparum* nachgewiesen wurde, wurde das Vorliegen einer separaten Homospermidinsynthase vermutet.

Weitere Inhibitorexperimente wurden durchgeführt, um den inhibitorischen Effekt von Agmatin in *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* Stämmen mit neueren Chemotherapeutika, Artemisinin und Triclosan, sowie dem konventionellen Chloroquin, zu vergleichen. Die Ergebnisse dieser Experimente machen deutlich, dass die Inhibitoren Agmatin und Artemisinin eine bessere Selektivität und größere Toxizität, im Gegensatz zu Chloroquin und Triclosan besitzen. Außerdem zeigte ein Vergleich der Effizienz von Artemisinin und Agmatin auf die Entwicklungsstadien des Parasiten, dass beide Hemmstoffe gegen alle erythrozytären Stadien aktiv waren.

Eine weitere Fragestellung, die in unseren Experimenten untersucht wurde, war der Effekt von Agmatin auf die Biosynthese der zellulären RNA im Vergleich zu Triclosan, Artemisinin und Chloroquin. Bei einer Konzentration von 200  $\mu$ M Agmatin und 2  $\mu$ M Triclosan konnte kein Unterschied im Vorkommen und in dem Muster der zwei prominenten RNA Spezies 19S und 26S ribosomaler RNA (rRNA) in Bezug auf den Chloroquin-sensitiven (CQS) und die Chloroquin-resistenten (CQR) Stämme beobachtet werden (Abb. 4.11 a und b). Im Fall von Artemisinin und Chloroquin konnte weder beim NF54 - Stamm, noch bei dem R - (CQR) und Dd2 - (CQR) Stamm nach 24 Stunden rRNA isoliert werden.

In dieser Arbeit konnten zwei Proteine, die bislang noch nicht für den Parasiten beschrieben waren, als mögliche neue Zielstrukturen identifiziert werden. Zum einen konnte eine DHS/HSS codierende Genregion aus *P. falciparum* NF54 - Stamm isoliert, sequenziert und exprimiert werden. Die isolierte DHS/HSS Genregion besitzt eine Größe von 1491 bp und codiert ein Protein mit einer Größe von 467 Aminosäuren. Das Protein konnte exprimiert werden, dessen spezifische Aktivität gemessen und auch die Bifunktionalität (Deoxyhypusinsynthaseaktivität/ Homospermidin-synthaseaktivität) dieses Enzyms gezeigt werden (Hammels *et al.*, 2004).

Das zweite Protein, das identifiziert wurde, ist der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 5A aus *P. vivax*. Auch dieses Protein konnte isoliert, sequenziert und exprimiert werden. Die erhaltene eIF5A Sequenz von *P. vivax* (Salvador I Stamm) besitzt einen offenen Leserahmen von 486 bp und codiert ein Protein in der Größe von 162 Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktion zwischen dem exprimierten eIF5A Protein und dem homologen NeIF5A aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) mit einem polyklonalen Antikörper bestand. Dies deutet daraufhin, dass sich eIF5A aus *P. vivax* aus einer höheren Pflanze rekrutiert. In der Zukunft soll mit den überexprimierten Proteinen biologische Testsysteme aufgebaut werden, um auf potenzielle Inhibitoren zu testen. Hierfür könnten auch pflanzliche Extrakte traditioneller Arzneipflanzen, die gegen Fieber wirksam sind, zum Einsatz kommen. Außerdem soll mit Hilfe eines Versuchs zum Gensilencing von eIF5A, durch die Darstellung einer eIF5A Mutante mit Hilfe der siRNA Technik, in fortführenden Experimenten dessen Bedeutung in der Zellproliferation näher untersucht und charakterisiert werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ø Assaraf Y.G., Golenser J, Spira D.T. & Bachrach U., **1984**, Polyamine levels and the activity of their biosynthetic enzymes in human erythrocytes infected with the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*  
*Biochemical J.*, 222, 815 - 819
- Ø Bacchi C.J., Nathan H.C., Hutner S.H., McCann P.P. & Sjoerdsma A., **1980**, Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes  
*Science*, 210: 332 - 334
- Ø Banthorpe D.V., Charlwood B.V. & Francis M.J.O, **1972**, The biosynthesis of monoterpenes  
*Chem. Review*, 72: 115 - 155
- Ø Bevec D. & Hauber J., **1997**, Eukaryotic Initiation Factor 5A Activity and HIV-1 Rev Function  
*Biological Signals*, 6: 124 – 133
- Ø Beytia E.D. & Porter J.W., **1976**, Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis  
*Ann. Review Biochem.*, 45: 113 – 142
- Ø Bhat G.P. & Surolia N., **2001**, Triclosan and fatty acid synthesis in *Plasmodium falciparum*: new weapon for an old enemy  
*J. Bioscience*, 26(1): 1 - 3
- Ø Binder R.K., Borrmann S., Adegnika A.A., Missinou M.A., Kremsner P.G., & Kun J.F.J, **2002**, Polymorphisms in the parasite genes for pfcr1 and pfmdr-1 as molecular markers for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Lambarene, Gabon  
*Parasitology Research* , 88(5):475-6
- Ø Birnboim H.C. & Doly J., **1979**, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA  
*Nucleic Acid Research*, 7(6): 1513 – 1523

- Ø Böttcher, **1994**, Nachweis, Reinigung und Charakterisierung der sym-Homospermidinsynthese, Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese in Wurzelkulturen verschiedener Asteraceae  
*Dissertation, Technische Universität Braunschweig*
- Ø Bracher F., **2002**, Neue Erkenntnisse zum molekularen Wirkmechanismus von Artemisinin  
*Pharmazie in unserer Zeit*, 1: 10 - 11
- Ø Brochier C., Lopez-Garcia P. & Moreira D, **2004**, Horizontal gene transfer and archaeal origin of deoxyhypusine synthase homologous genes in bacteria  
*Gene*, 330: 169 - 176
- Ø Burri C. & Brun R., **2003**, Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis  
*Parasitology Research*, 90 (1): 49-52
- Ø Caraglia M., Marra M., Giuberti G., D'Alessandro A.M., Baldi A., Tassone P., Venuta S., Tagliaferri P. & Abbruzzese A., **2003**, The Eukaryotic Initiation Factor 5A Is Involved in the Regulation of Proliferation and Apoptosis Induced by Interferon- $\alpha$  and EGF in Human Cancer Cells  
*Journal of Biochemistry*, 133: 757 – 765
- Ø Carlton J., **2003**, The *Plasmodium vivax* genome sequencing project  
*Trends in Parasitology*, 19(5): 227 – 231
- Ø Carlton J. & Dame J., **2000**, The *Plasmodium vivax* and *P. berghei* Gene Sequence Tag Projects  
*Parasitology Today*, 16(10): 409
- Ø Cauto A.S., Kinimura E.A., Peres V.J., Uhrig M.L. & Katzin A.M., **1999**, Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units  
*Biochem. J.*, 341: 629 – 637

- Ø Chamot D. & Kuhlemeier C., **1992**, Differential expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco  
*Nucleic Acids Research*, 20(4): 665 – 669
- Ø Chandra H.M., Pandey V.C., Tekwani B.L., **1997**, Polyamine metabolism in various tissues during pathogenesis of chloroquine-susceptible and resistant malaria  
*Cell Biochemistry and Function*, 15(4): 229 – 235
- Ø Chen Z.P., Yan Y.P., Ding Q.J., Knapp S., Potenza J.A., Schugar H.J. & Chen K.Y., **1996**, Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells  
*Cancer letters*, 105: 233 – 239
- Ø Chimanuka B., Francois G., Timperman G., Yander Heyden Y., Holenz J., Plaizier-Vercammen, & Bringmann G., **2001**, A comparison of the stage-specific efficacy of chloroquine, artemether and dioncophylline B against the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi in vivo*  
*Parasitology Research*, 87: 795 -803
- Ø Clement P.M.J., Hanauske – Abel H.M., Wolff E.C., Kleinman H.K. & Park M.H., **2002**, The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis *in vitro*  
*International Journal of Cancer*, 100(4): 491 - 498
- Ø Cohen S., **1998**, A guide to polyamines  
*Oxford University Press*, New York, Seite 595
- Ø Dallmann K., Junker H., Balabanov S., Zimmermann U., Giebel J. & Walther R., **2004**, Human agmatinase is diminished in the clear cell type of renal cell carcinoma  
*International J. Cancer*, 108: 342 – 347
- Ø Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., & Mattick J.S., **1991**, 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification  
*Nucleic Acids Research*, 19(14): 4008

- Ø Drummelsmith J. Brochu V., Girard I., Messier N & Ouelette, **2003**, Proteome mapping of the protozoan parasite leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanism  
*Mol. Cell. Proteomics*, 2: 146 - 155
- Ø Ellis D.S., Li Z.L., Gu H.M., Peters W., Robinson B.L., Tovey G., & Warhurst D.C., **1985**, The chemotherapy of rodent malaria, XXXIX; Ultrastructural changes following treatment with artemisinin of *Plasmodium berghei* infection in mice, with observations of the localization of (<sup>3</sup>H)- dihydroartemisinin in *P.falciparum* in vitro  
*Annals of Tropical Medicine and Parasitology* , 79(4): 367 - 374
- Ø El-Sayed N., Hegde P., Quadenbush J., Melville S.E. & Doulsen J.E., **2000**, The African trypanosome genome  
*International J. Parasitology*, 30: 329 – 345
- Ø El-Sayed N., Alarcon C.M., Beck J.C., Sheffield V.C. & Donelson J.E., **1995**, cDNA expressed sequence tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into the biology of the parasite  
*Mol Biochem Parasitol*, 73(1-2):75-90
- Ø Ferreras A. Triana L., Sanchez E., & Herrera F., **2002**, Effect of Antimalarial Drugs on Plasmodia Cell-Free Protein Synthesis  
*Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 97(3) : 377 - 380
- Ø Flüeck T.P.F., **2002**, Korrelation von *in vivo*-Resistenz gegen Chloroquin mit allelischen Polymorphismen bei *Plasmodium falciparum* Isolaten aus Uganda  
Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät

- Ø Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M.S., Nene V., Shallom S.J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Pertea M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M.W., Vaidya A.B., Martin D.M., Fairlamb A.H., Fraunholz M.J., Roos D.S., Ralph S.A., McFadden G.L., Cummings L.M., Subramaniam G.M., Mungall C., Venter J.C. Carucci D.J., Hoffman S.L., Newbold C., Davies R.W., Fraser C.M. & Barrell B., **2002**, Genome Sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*  
*Nature*, 419: 498 : 511
- Ø Geneste H. & Hesse M., **1998**, Polyamine und Polyamin-Derivate in der Natur  
*Chemie in unserer Zeit*, 32(4): 216 – 217
- Ø Gilman T.M., Paulson Y.J., Cohen J.L., Heseltine P.N.R. & Boylen C.T., **1987**, Multiple-dose pharmacokinetics of Eflornithine in AIDS patients treated for *Pneumocystis carinii*  
Abstract book, Third International AIDS Conference on AIDS, Seite 188
- Ø Griffin C.A., Slavik M., Chien S.C., Hermann J., Thompson G., Blanc O., Luk G.D., Baylin S.B. & Abeloff M.D., **1987**, Phase I trial and pharmacokinetic study of intravenous and oral alpha-difluoromethylornithine  
*Invest. New Drugs*, 5: 177 - 186
- Ø Gunasekera A.M., Patankar S., Schug J., Eisen G. & Wirth D.F., **2003**, Drug-induced alterations in gene expression of the asexual blood forms of *Plasmodium falciparum*  
*Molecular Microbiology*, 50 (4): 1229 – 1239
- Ø Guyatt H.L., Noor A.M., Ochala S.A. & Snow R.W., **2004**, Use of intermittent presumptive treatment and insecticide treated bed nets by pregnant women in four Kenyan districts  
*Tropical Medicine and International Health*, 9 (2): 255 – 261
- Ø Hammels I., Gottwald A., Hoerauf A. & Kaiser A., **2004**, Biochemical analysis of eukaryotic initiation factor 5A from *Plasmodium vivax*  
*Handed in for publication*

- Ø Harwood J.L., **1996**, Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1301: 7 – 56
- Ø Heath R.J. & Rock C.O., **2000**, A triclosan- resistant bacterial enzyme  
*Nature* (London), 406: 145 - 146
- Ø Heby O., Roberts S.C. & Ullman B., **2003**, Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa  
*Biochemical Society Transactions*, 31(2): 415 – 419
- Ø Hochuli E., **1988**, Large-scale chromatography of recombinant proteins  
*J. Chromatogr.*, 444 : 293 - 302
- Ø Holt R.A., Subramian G.M., Halpern A., Sutton G.G., Charlab R. Nusskern D.R., Wincker P., Clark A.G., Ribeiro J.M., Wides R., Salzberg S.L., Loftus B., Yandell M., Majoros W.H., Rusch D.B., Lai Z., Kraft C.L., Abril J.F., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson P.W., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chaturverdi K., Christophides G.K., Chrystal M.A., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans C.A., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer M.E., Hladun S.L., Hogan J.R., Hong Y.S., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin J.J., Lobo N.F., Lopez J.R., Malek J.A., McIntosh T.C., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S.D., O'Brochta D.A., Pfannkoch C., Qi R., Regier M.A., Remington K., Shao H., Sharakhova M.V., Sitter C.D., Shetty J., Smith T.J., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton L.Q., Topalis P., Tu Z., Unger M.F., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford K.J., Wortman J.R., Wu M., Yao A., Zdobnov E.M., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu S.C., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth C.W., Louis C., Kalush F., Mural R.J., Myers E.W., Adams M.D., Smith H.O., Broder S., Gardner M.J., Fraser C.M., Birney E., Bork P., Brey P.T., Venter J.C., Weissenbach J., Kafatos F.C., Collins F.H. & Hoffman S.L., **2002**,  
The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*  
*Science*, 298: 129 – 149

- Ø Husek P., **1992**, Gas chromatographic determination of amines, aminoalcohols and acids after treatment with alkyl chloroformates  
*Analytica Chimica Acta*, 259, 185 – 192
- Ø Iten M., Mett H., Evans A., Enyaru J.C., Brun R. & Kaminsky R., **1997**, Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei rhodesiense* to D,L-alpha-difluoromethylornithine  
*Antimicrobial Agents Chemother.*, 41: 1922 – 1925
- Ø Iyer R.K., Kim H.K., Tsoa R.W., Grody W.W. & Cederbaum C.D., **2002**, Cloning and characterization of human agmatinase  
*Mol Genet Metab*, 5: 209 - 218
- Ø Janknecht R., de Martynoff G., Hipskind R.A., Nordheim A. & Stunnenberg H.G., **1991**, Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (20): 8972 - 8976
- Ø Jiang J.B., Li G.Q., Kong Y.C. & Arnold K., **1982**, Antimalarial activity of mefloquine and qinghaosu  
*Lancet*, 2: 285 - 288
- Ø Jin B.F., He K., Hu M.R., Yu M., Shen B.F. & Zhang X.M., **2003**, The effect of eIF5A on the G1-S in cell cycle regulation (Article in chinese)  
*Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 11(4): 325 – 328
- Ø Kaiser A., Gottwald A., Maier W. & Seitz H.M, **2003a**, Targeting enzymes involved in spermidine metabolism – a possible new strategy for anti-parasitic treatment  
*Parasitology Research*, 91: 508 - 516
- Ø Kaiser A., Gottwald A., Wiersch C., Maier W. & Seitz H.M, **2003b**, Spermidine metabolism in parasitic protozoa – a comparison to the situation in prokaryotes, viruses and fungi  
*Folia Parasitologica*, 50: 3 – 18

- Ø Kaiser A., Gottwald A., Wiersch C., Lindenthal B., Maier W. & Seitz H.M., **2001a**, Effect of drugs inhibiting spermidine biosynthesis and metabolism on the *in vitro* development of *P. falciparum*  
*Parasitology Research*, 87: 963 – 972
- Ø Kaiser A., Gottwald A., Wiersch C., **2001b**, Triclosan gegen Malaria  
*Deutsche Apotheker Zeitung*, 141(25): 76 – 78
- Ø Kaiser A., Vollmert M., Tholl D., Graves M.V., Gurnon J.R. Xing W., Lisec A.D., Nickerson W. & van Etten J.L., **1999a** , Chlorella Virus PBCV-1 encodes a functional homospermidine synthase  
*Virology* ; Vol. 263, 254 – 262
- Ø Kaiser A., **1999b**, Cloning and expression of a cDNA encoding homospermidine synthase from *Senecio vulgaris* (Asteraceae) in *Escherichia coli*  
*The Plant Journal*, 19(2): 195 – 201
- Ø Kang H.A. & Hershey J.W., **1994**, Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein biosynthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*  
*J. Biol. Chem.*, 269: 3934 – 3940
- Ø Kapoor M., Gopalakrishnapai J., Surolia N. & Surolia A., **2004**, Mutational analysis of the triclosan-binding region of enoyl-ACP reductase from *Plasmodium falciparum*  
*Biochemical Journal*, 381: 835 – 741
- Ø Kinch L.N., Scott J.R., Ullmann B. & Phillips M.A., **1999**, Cloning and kinetic characterization of the *Trypanosoma cruzi* S-adenosylmethionine decarboxylase.  
*Mol. Biochem. Parasitology*, 101: 1 - 11
- Ø Kissinger J.C., Gajria B., Li L., & Roos D.S., **2003**, ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome  
*Nucleic Acids Research*, 31: 234 – 236

- Ø Köhler S., Delwiche C., Denny P., Tilney L., Webster, Wilson R., Palmer J. & Roos D., **1997**, A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites  
*Science*, 275: 1485 – 1488
- Ø Kuntz L., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C., Hemmerlin A., Willem A., Bach T. J. & Rohmer M., **2004**, Isoprenoid biosynthesis as target for antibacterial and antiparasitic drugs: posphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyhypusine phosphate reducto-isomerase  
*Biochemical J.*, Published on 11. October as manuscript BJ20041378
- Ø Kyrpides N.C. & Woese C.R., **1998**, Universally conserved translation initiation factor  
*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95: 224 - 228
- Ø Laemmli U.K., **1970**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4  
*Nature*, 227(259): 680-5
- Ø Lee C.H., Um P.Y. & Park M.H., **2001**, Structure-function studies of human deoxyhypusine synthase amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD  
*Biochem. J.*, 355(Pt3): 841 –849
- Ø Lee C.H. & Park M.H. , **2000**, Human deoxyhypusine synthase: interrelationship between binding of NAD and substrates  
*Biochemical J.*, 352: 851 – 857
- Ø Lee Y.B. & Folk J.E. , **1998**, Branched–chain and unsaturated 1,7-Diaminoheptane derivatives as deoxyhypusine synthase inhibitors  
*Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 6: 253 – 270

- Ø Li Z.L., Gu H.M., Warhurst D.C. & Peters W., **1983**, Effects of qinghaosu and related compounds on incorporation of [G-<sup>3</sup>H] hypoxanthine by *Plasmodium falciparum* *in vitro*  
*Transactions of the Royal Soc of Trop Med and Hyg*, 77: 522 - 523
- Ø Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A. & Rohmer M., **1997**, Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway  
*FEBS Letters*, 400(3): 271 – 274
- Ø Liu D.Q., Liu R.J., Ren D.X., Gao D.Q., Zhang C.Y., Qiu C.P., Ling C.F., Song A.H. & Tang X., **1995**, changes in the resistance of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine in Hainan, China  
*Bulletin WHO*, 73: 483 - 486
- Ø Looareesuwan S., **1996**, Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs for the treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand.  
*American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54:62–66.
- Ø Luersen K., Eschbach M.L., Muller S. & Walter R.D., **2000**, The spermidine synthase gene from the malaria parasite  
unpublished (spermidine synthase [*Plasmodium falciparum* 3D7]ACCESSION CAB71155)
- Ø McMurry L.M., Oethinger M. & Levy S.B., **2001**, Triclosan targets lipid synthesis  
*Nature*, 394: 531 – 532
- Ø Mishra M., Chandra S., Pandey V.C. & Tekwani B.L., **1997**, Polyamine metabolism in various tissues during pathogenesis of chloroquine-susceptible and resistant malaria  
*Cell Biochem Func.*, 15: 229 – 235
- Ø Molitor I.M., Knobel S., Dang C., Spielmann T., Allera A. & König G.M., **2004**, Translation initiation factor eIF-5A from *Plasmodium falciparum*  
*Mol Biochem Parasitol.*, 137(1):65-74

- Ø Moritz E., Seidensticker S., Gottwald A., Maier W., Brun R., Hoerauf A. & Kaiser A., **2004**, The efficacy of inhibitors involved in spermidine metabolism in *P. falciparum*, *Anopheles stephensi* and *Trypanosoma evansi*  
*Parasitology Research*, 94(1): 37-48
- Ø Müller S., Coombs G.H. and Walter R.D., **2001**, Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy  
*Trends in Parasitology*, 17(5): 242 – 249
- Ø Müller S., Da'dara A., K., Luersen K., Wrenger C., Das Gupta R., Madhubala R. & Walter R.D., **2000** , In the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase  
*J. Biolog. Chem.* , 275(11): 8097 – 8102
- Ø Mullis K.B. & Faloona F., **1987**, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction  
*Methods Enzymol.*, 155: 335 – 350
- Ø Ober D., Gibas L., Witte L. & Hartmann T., **2003**, Evidence for general occurrence of homospermidine in plants and its supposed origin as by-product of deoxyhypusine synthase  
*Phytochemistry*, 62: 339-344
- Ø Ober D. & Hartmann T., **1999a**, Deoxyhypusine Synthase from Tobacco  
*J. Biol Chem.*, 274 (45): 32040 – 32047
- Ø Ober D. & Hartmann T., **1999b**, Homospermidine synthase, the first pathway specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (26): 14777 – 14782
- Ø Pandey A.V., Tekwani B.L., Singh R.L. & Chauhan V.S., **1999**, Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial , Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification Systems in Malarial Parasite  
*Journal of Biological Chemistry*, 274(27): 19383 – 19388

- Ø Park J-H., Wolff E.C., Folk J.E. & Park M.H., **2003**, Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction: generation of spermidine or homosperidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase  
*J. Biological Chemistry*, 278(35): 32683-91
- Ø Park M.H., Wolff E.C., Lee Y.B. & Folk J.E., **1994**, Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanidyl diamines  
*J. Biological Chemistry*, 269(45): 27827-32
- Ø Park M.H., Wolff E.C., Folk J.E., **1993**, Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation  
*Biofactors*, 4(2):95-104.
- Ø Persson K., Aslund L., Grahn B., Hanke J. & Heby O., **1998**, *Trypanosoma cruzi* has not lost its S-adenosylmethionine decarboxylase: characterization of the gene and the encoded enzyme  
*Biochem. J.*, 333: 527 – 537
- Ø Phillips M.A., Coffino P., & Wang C.C., **1987**, Cloning and Sequencing of the Ornithine Decarboxylase Gene from *Trypanosoma brucei*  
*The Journal of Biological Chemistry*, 262(18): 8721 - 8727
- Ø Raasch W., Schäfer U., Chun J., & Dominiak P., **2001**, Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazole binding sites  
*British Journal of Pharmacology*, 133: 755 – 780
- Ø Regunathan S., Youngson C., Raasch W., Wang H. & Reis D.J., **1996**, Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation  
*J. Pharmacology Exp. Therapy*, 276: 1272 – 1282
- Ø Reis D.J. & Regunathan S., **2000**, Is agmatine a novel neurotransmitter in brain?  
*Trends Pharmacol Sci*, 21(5): 187 – 193

- Ø Ridley R., Dorn A., Vippagumta S., & Vennerstrom J., **1997**, Haematin (haem) polymerisation and its inhibition by quinoline antimalarials  
*Ann Trop Parasitology*, 91: 559 – 566
- Ø Robert A., Cazelles B. & Meunier B., **2001**, Characterization of the alkylation product of heme by the antimalarial drug artemisinin  
*Angewandte Chemie*, 113: 2008
- Ø Rosorius O., Reichart B., Kratzer F., Heger P., Dabauvalle M.C. & Hauber J., **1999**, Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1  
*J. Cell Science*, 112(Pt14): 2369 - 2380.
- Ø Satriano J., Isome M., Casero Rr. R.A., Thomson S.C. & Blantz R.C., 2001, Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells  
*Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 281: C329 – C334; 0363 – 6143/01
- Ø Satriano J., Matsufuji S., Murakami Y., Lortie m.J., Schwartz D., Kelly C.J., Hayashi S-I. and Blantz R.C., **1998**, Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels  
*The Journal of Biological Chemistry*, 273 (25): 15313 - 15316
- Ø Schneider R., Brors B., Burger F., Camrath S. & Weiss H., **1997**, Two genes of the putative mitochondrial fatty acid synthase in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*  
*Curr. Genet.*, 32: 384 – 388
- Ø Schwender J., Seemann M., Lichtenthaler H.K. & Rohmer M., **1996**, Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side – chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/ glyceraldehydes 3-phosphate non-mevalonate pathway in green alga *Scenedesmus obliquus*  
*Biochem J.*, 316 (Pt1): 73 – 80

- Ø Singh S., Puri S.K., Singh S.K., Srivastava R., Gupta R.C. & Pandey V.C., **1997**, Characterization of Simian Malarial Parasite (*Plasmodium knowlesi*)-induced Putrescine Transport in Rhesus Monkey Erythrocytes  
*Journal of Biological Chemistry*, 272 (21): 13506 – 11
- Ø Sommer M.-N., Bevec D., Klebl B., Flicke B., Hölscher K., Freudenreich T., Hauber I., Hauber J. & Mett H., **2004**, Screening Assay for the Identification of Deoxyhypusine Synthase Inhibitors  
*Journal of Biomolecular Screening*, 9(5): 434 – 438
- Ø Surolia N., RamachandraRao S.P. & Surolia A., **2002**, Paradigm shifts in malaria parasite biochemistry and anti-malarial chemotherapy  
*BioEssays*, 24: 192 - 196
- Ø Surolia N. & Surolia A., **2001**, Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*  
*Nature Medicine*, 7(2): 167 – 173
- Ø Svensson, U.S.H., Sandström R., Carlborg Ö. Lennernäs H. & Ashton M., **1999**, High In Situ Rat Intestinal Permeability of Artemisinin Unaffected by Multiple Dosing and with No Evidence of P-glycoprotein Involvement  
*Drug Metabolism and Disposition*, 27(2): 227 - 232
- Ø Tabor S. & Richardson C.C., **1992**, A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.1985.  
*Biotechnology*, 24: 280 – 284
- Ø Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H & Seto H., **1998**, A deoxy-D-xylulose 5- phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4- phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95: 9879 – 9884,

- Ø Tholl D., Harms R., Ludwig A. & Kaiser A., **1998**, Retarded growth of an *Escherichia coli* mutant deficient in spermidine synthase can be unspecifically repaired by addition of various polyamines  
*World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 857 - 863
- Ø Tholl D., Ober D., Martin W., Kellermann J. & Hartmann T., **1996**, Purification, molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of homospermidine synthase from *Rhodopseudomonas viridis*  
*Eur. J. Biochem.*, 240: 373 – 370
- Ø Trager W. & Jensen J., **1976**, Human Malaria Parasites in Continuous Culture  
*Science*, 193: 673 –675
- Ø Uehara N., Kita K., Shirakawa S., Uchino H. & Saeki Y., **1980**, Elevated polyamine content in erythrocytes of malignant lymphoma patients.  
*Gann.*, 71(3):393-7.
- Ø Umland T.C., Wolff E.C., Park M.H. & Davies D.R., **2004**, A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme: NAD:inhibitor ternary complex  
*J. Biol. Chem.*, 279(27): 28697 - 28705
- Ø Walgate R., **2004**, Malaria vaccines get real – Trial offers evidence that an effective vaccine is feasible- but the WHO expresses caution  
*The Scientist*, News 15 October
- Ø Waller R.F., Ralph S.A., Reed M.B., Su V., Douglas J.D., Minnikin D.E., Cowman A.F., Besra G.S. & McFadden G.I., **2003**, A Type II Pathway for Fatty Acid Biosynthesis Presents Drug Therapy in *Plasmodium falciparum*  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 297 – 301
- Ø Wang C., Delcros J.-G., Cannon L., Konate F., Carias H., Biggerstaff J., Gardner R.A. & Phanstiel IV O., **2003**, Defining the Molecular Requirements for the Selective Delivery of Polyamine Conjugates into Cells Containing Active Polyamine Transporters  
*Journal of Medicinal Chemistry.*, 46: 5129 – 5138

- Ø Whitty C.J.M., Allan R., Wiseman V., Ochola S., Nakyanzi-Mugisha M.V., Vonhm B., Mwita M., Miaka C., Oloo A., Premji Z., Burgess C. & Mutabingwa T.K., **2004**, Averting a malaria disaster in Africa – where does the buck stop?  
*Bulletin of the World Health Organization*, 82(5): 381 – 384
- Ø WHO The World Health Organization Report, **2004**  
*Geneva, World Health Organization*
- Ø WHO The World Health Organization Report, **2002**  
*Geneva, World Health Organization*
- Ø WHO. Antimalarial drug combination therapy – Report of a WHO Technical Consultation, 2001  
Ø *Geneva, World Health Organization*
- Ø Wrenger C., Luersen K., Krause T., Müller S. & Walter R.D., **2001**, The *Plasmodium falciparum* bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosyl-L-methionine decarboxylase, enables a well balanced polyamine synthesis without domain-domain interaction  
*J. Biol. Chem.*, 276: 29651 - 29656
- Ø Wright P.S., Byers T.L., Cross-Doersen D.E., McCann P.P., & Bionti A.J., **1991**, Irreversible inhibition of S-adenosylmethionine decarboxylase in *P. falciparum* infected erythrocytes: growth inhibition *in vitro*  
*Biochem Pharmacol.*, 41: 1713 – 1718
- Ø Yao M., Ohsawa A., Kikukawa I., Tanaka I. & Kimura M., **2003**, Crystal Structure of Hyperthermophilic Archeal Initiation Factor 5A: A Homologue of Eukaryotic Initiation Factor 5A (eIF-5A)  
*Journal of Biochemistry*, 133: 75 – 81

#### Weitere Informationsquellen:

*Anopheles* Bild (Seite 3):

[http://www.RÄTSELHAFTtier-rätselnr\\_53.htm](http://www.RÄTSELHAFTtier-rätselnr_53.htm)

*Mensch* Bild (Seite 3):

<http://www.apotheke-ettringen.de/medinfo>

## 8. Anhang

### 8.1 Inhibitorexperimente mit Artemisinin; Einfluss auf die Entwicklungsstadien

Stamm, Entwicklungsstadium und Inhibitor	Parasitämie in %			
	24h	48h	72h	96h
R - Stamm 100µM Artemisinin Schizonten	0,1475	0,0625	0,0625	0
R - Stamm 100µM Artemisinin Trophozoiten	1,855	1,6875	0,375	0,5175
R - Stamm Kontrolle Schizonten	2,288	0,05	13,87	1,46675
R - Stamm Kontrolle Trophozoiten	1,86207	16,3675	1,5175	9,457
Dd2 - Stamm 100µM Artemisinin Schizonten	0	0	0,0625	0,1875
Dd2 - Stamm 200µM Artemisinin Trophozoiten	5,75	5,4075	3,125	2
Dd2 - Stamm Kontrolle Schizonten	3,67	1,7	5,51425	1,178
Dd2 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	8,2	17,8	8,0775	9,499375
NF54 - Stamm 100µM Artemisinin Schizonten	0,54	0,157	0	0
NF54 - Stamm 100µM Artemisinin Trophozoiten	0,5	0,1875	0	0
NF54 - Stamm Kontrolle Schizonten	2,62	2,959	8,65357	7,489
NF54 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	2,8325	8,31675	1,367	7,3538

## 8.2 Inhibitorexperimente mit Agmatin; Einfluss auf die Entwicklungsstadien

Stamm, Entwicklungsstadium und Inhibitor	Parasitämie in %			
	24h	48h	72h	96h
R - Stamm 200µM Agmatin Schizonten	2,8	2,5	1,44	1,16
R - Stamm 200µM Agmatin Trophozoiten	1,38	0,31	0,5	0,39
R - Stamm Kontrolle Schizonten	3,81	5,44	5,61	8,6
R - Stamm Kontrolle Trophozoiten	1,63	2,81	0,98	6,7
Dd2 - Stamm 200µM Agmatin Schizonten	0,25	4,625	3	0,9375
Dd2 - Stamm 200µM Agmatin Trophozoiten	2,4185	0,5543	2,602	0,31457
Dd2 - Stamm Kontrolle Schizonten	0,7625	9,3775	3,716	4,3035
Dd2 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	13,8125	4,0435	3,45	9,9837
NF54 - Stamm 10µM Agmatin Schizonten	1,625	3,3125	0,825	1,375
NF54 - Stamm 10µM Agmatin Trophozoiten	1,5625	0,5625	2,375	0,4375
NF54 - Stamm Kontrolle Schizonten	2,25	4,7925	0,6385	4,125
NF54 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	3,86675	0,578	5,99	3,69175

### 8.3 Inhibitorexperimente mit Triclosan; Einfluss auf die Entwicklungsstadien

Stamm, Entwicklungsstadium und Inhibitor	Parasitämie in %			
	24h	48h	72h	96h
R - Stamm 2µM Triclosan Schizonten	0,75	0,367	1,084	1,67
R - Stamm 2µM Triclosan Trophozoiten	2,67	0,867	0,0834	0,834
R - Stamm Kontrolle Schizonten	1,294	0,82225	3,483	3,67
R - Stamm Kontrolle Trophozoiten	5,66775	3,00375	4,21	13,75
Dd2 - Stamm 2µM Triclosan Schizonten	3,61	2,35	7,205	1,3925
Dd2 - Stamm 2µM Triclosan Trophozoiten	2,62675	14,8375	8,4675	14,74
Dd2 - Stamm Kontrolle Schizonten	0,7625	9,3775	3,7175	4,3025
Dd2 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	13,8125	4,0435	3,445	9,98175
NF54 - Stamm 2µM Triclosan Schizonten	3,3975	2,0625	0,625	0
NF54 - Stamm 2µM Triclosan Trophozoiten	1,5	5,0625	3,6875	0,6875
NF54 - Stamm Kontrolle Schizonten	2,62	2,959	8,65357	7,485
NF54 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	2,8325	8,31675	13,67	7,3538

#### 8.4 Inhibitorexperimente mit Chloroquin; Einfluss auf die Entwicklungsstadien

Stamm, Entwicklungsstadium und Inhibitor	Parasitämie in %			
	24h	48h	72h	96h
R - Stamm 10 <sup>-8</sup> mM Chloroquin Schizonten	1,5475	0,7175	0,535	0,375
R - Stamm 10 <sup>-8</sup> mM Chloroquin Trophozoiten	5,4375	5,67	5,72	3,88
R - Stamm Kontrolle Schizonten	1,294	0,82225	3,483	3,67
R - Stamm Kontrolle Trophozoiten	5,66775	3,00375	4,21	13,75
Dd2 - Stamm 10 <sup>-8</sup> mM Chloroquin Schizonten	0,42625	5,6475	1,145	0
Dd2 - Stamm 10 <sup>-8</sup> mM Chloroquin Trophozoiten	10,1375	8,75	8,6025	3,77
Dd2 - Stamm Kontrolle Schizonten	0,7625	9,3775	3,7175	4,3025
Dd2 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	13,8125	4,0435	3,445	9,98175
NF54 - Stamm 10 <sup>-8</sup> mM Chloroquin Schizonten	1,125	0,5	0,125	0,125
NF54 - Stamm 10 <sup>-8</sup> mM Chloroquin Trophozoiten	1	0,5625	0,1875	0
NF54 - Stamm Kontrolle Schizonten	1,5	2,2346428	11,64	3,06
NF54 - Stamm Kontrolle Trophozoiten	3,5427	4,4512	4,55	5,01975

### 8.5 Inhibitorexperimente mit 100 $\mu$ M Artemisinin

Stunden (h)	Dd2 - Stamm Kontrolle	Dd2 - Stamm Artemisinin	NF 54 Stamm Kontrolle	NF54 - Stamm Artemisinin	R - Stamm Kontrolle	R - Stamm Artemisinin
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
24	4,11	2,26	2,95	0,44	2,3	0,84
48	8,01	1,95	3,17	0,19	8,07	0,67
72	7,5	1,17	3,7	0	8,66	0,17
96	9,92	0,85	5,62	0	6,05	0,23

### 8.6 Inhibitorexperimente mit Agmatin

Stunden (h)	Dd2 - Stamm Kontrolle	Dd2 - Stamm 200 $\mu$ M Agmatin	NF 54 Stamm Kontrolle	NF54 - Stamm 10 $\mu$ M Agmatin	R - Stamm Kontrolle	R - Stamm 200 $\mu$ M Agmatin
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
24	6,34	4,45	2,3	1,7	2,7	1,98
48	7,43	2,22	3	1	4,5	1,13
72	5,28	3,71	3,9	0,2	4,2	0,78
96	9,29	0,93	5	0,1	6,93	0,7

### 8.7 Inhibitorexperimente mit 2 $\mu$ M Triclosan

Stunden (h)	Dd2 - Stamm Kontrolle	Dd2 - Stamm Triclosan	NF 54 Stamm Kontrolle	NF54 - Stamm Triclosan	R - Stamm Kontrolle	R - Stamm Triclosan
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
24	4,11	3,36	2,95	2,08	3,96	1,26
48	8,01	7,43	3,17	2,63	4,72	0,56
72	7,5	8,44	3,7	1,61	4,73	0,46
96	9,92	14,24	5,62	0,25	9,17	0,76

### 8.8 Inhibitorexperimente mit 10<sup>-8</sup> mM Chloroquin

Stunden (h)	Dd2 - Stamm Kontrolle	Dd2 - Stamm Chloroquin	NF 54 Stamm Kontrolle	NF54 - Stamm Chloroquin	R - Stamm Kontrolle	R - Stamm Chloroquin
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
24	6,34	7,69	2,93	0,83	3,96	3,28
48	7,43	6,27	3,47	0,43	4,72	3,41
72	5,28	5,93	5,21	0,13	4,73	3,12
96	9,29	1,86	5,23	0,05	9,17	1,89

### 8.9 Inhibitorexperimente mit DCA und nachfolgender Supplementation mit Spermidin (Parasitämie in %)

Stunden (h)	NF54 - Stamm Kontrolle	NF54 - Stamm 200µM DCA	NF54 - Stamm 800µM Spermidin	NF54 - Stamm 1000µM Spermidin	NF54 - Stamm 1200µM Spermidin
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
24	4,1	3,06	4	2,4	1,2
48	6,59	1,63	2,58	1,85	1,8
72	8,64	0,78	3,48	1,73	1
96	8,69	0	3,19	1,6	1,1

Stunden (h)	R-Stamm Kontrolle	R-Stamm 1000µM DCA	R-Stamm 800µM Spermidin	R-Stamm 1000µM Spermidin	R-Stamm 1200µM Spermidin
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
24	4,15	1,05	1,5	3,8	1,8
48	4,8	0,1	0,5	2,6	1,53
72	6,8	0	0,2	1,73	0,8
96	7	0	0	1,65	0,53

## 8.10 Eingesetzte Plasmodien Stämme und Inhibitorkonzentrationen

Plasmodium Stamm	Inhibitor	Konzentration
R	1,7-Diaminoheptane	0,2 - 1,0mM
R	Agmatin	0,2 - 0,8mM
R	DCA	0,2 - 1,0mM
R	Spermidine + 200µMDCA	1,0 + 1,2mM
R	Triclosan	2µM
R	Artemisinin	100µM
R	Artemisinin	200µM
R	Chloroquine	10 <sup>-6</sup> mM
R	Chloroquine	10 <sup>-8</sup> mM
R	Chloroquine	10 <sup>-10</sup> mM
NF54	1,7-Diaminoheptane	0,2 - 1,0mM
NF54	1,7-Diaminoheptane	1,5µM
NF54	Agmatin	0,2 - 0,4mM
NF54	Agmatin	100µM
NF54	Agmatin	10µM
NF54	DCA	20µM
NF54	DCA	200µM
NF54	Spermidin + 200µMDCA	0,8 - 1,2mM
NF54	Chloroquine	10 <sup>-8</sup> mM
NF54	Chloroquine	10 <sup>-10</sup> mM
NF54	Artemisinin	100µM
NF54	Triclosan	2µM
IMP	Chloroquine	10 <sup>-8</sup> mM
IMP	Chloroquine	10 <sup>-6</sup> mM
IMP	Chloroquine	10 <sup>-8</sup> mM
IMP	Artemisinin	200µM
IMP	Artemisinin	100µM
IMP	Triclosan	2µM
IMP	Agmatin	10µM
IMP	Chloroquine	10 <sup>-8</sup> mM
IMP	Chloroquine	100µM
Dd2	Artemisinin	100µM
Dd2	Artemisinin	200µM
Dd2	Triclosan	2µM
Dd2	Agmatin	200µM
Dd2	Chloroquine	10 <sup>-8</sup> mM
Dd2	DCA	200µM
Dd2	1,7 - Diaminoheptan	200µM

## Danksagungen

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Walter A. Maier und Frau Priv. Doz. Dr. Annette E. Kaiser vom Institut für Medizinische Parasitologie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in ihrem Labor und für die interessante und herausfordernde Themenstellung bedanken.

Bei Herrn Prof. Walter A. Maier vom Institut für Medizinische Parasitologie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bedanke ich mich für die Bereiterklärung der Vertretung des Doktorvaters, ohne die die Arbeit nicht erfolgreich hätte durchgeführt werden können.

Bei Frau Priv. Doz. Dr. Annette E. Kaiser vom Institut für Medizinische Parasitologie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bedanke ich mich für die intensive Betreuung, die vielen Diskussionen und Anregungen, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Professor W. Kolanus von der Abteilung für Zelluläre Biochemie der Universität Bonn möchte ich mich ganz herzlich für die Bereiterklärung als Korreferent und Prüfer zu agieren, bedanken, ohne die diese Arbeit nicht erfolgreich zustande gekommen wäre.

Bei Herrn Dr. B. Lindenthal und Herrn Dr. G. von Unruh von der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn möchte ich mich für die Durchführung der GC/MS Analysen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Kunz von der Abteilung für Epileptologie der Universität Bonn möchte ich mich für die Möglichkeit der Benutzung seines Sonifiers bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. C. Kuhlemeyer vom Pflanzenphysiologischen Institut, Bern, möchte ich mich für die Bereitstellung des Polyklonalen anti Nef-5A - Antikörper gegen Nef-5A aus *Nicotiana glumbaginifolia* (Solanaceae) bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. K. R. Kang, vom Department of Biochemistry, Gyeongsang National University College of Medicine, Süd Korea, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Polyklonalen anti DHS – Antikörpers (Mensch).

Bei Herrn Dr. J.B. Dame von der Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta möchte ich mich für die genomische *Plasmodium vivax* DNA bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Hai van Nong, Institute of Biotechnology, Hanoi, Vietnam möchte ich mich für die Bereitstellung des Wirkstoffs Artemisinin bedanken.

Bei Frau Priv. Doz. Dr. A. Kaiser vom Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn, möchte ich mich für die Bereitstellung des Polyklonalen anti HSS - Antikörper gegen HSS aus *Rhodopseudomonas viridis* bedanken.

Das benötigte Humanserum (A Faktor Rhesus positiv) wurde freundlicherweise vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (Direktor Prof. Dr. P. Hanfland) zur Verfügung gestellt.

Für die freundliche Unterstützung bei Computerfragen möchte ich mich bei Herrn K. Hartel und Herrn P. Cierniak des Instituts für Medizinische Parasitologie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Instituts für Medizinische Parasitologie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Geduld, ohne die diese Arbeit nicht erfolgreich zustande gekommen wäre.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, und dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat. Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe. Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit April 2000 bis Mai 2004 am Institut für Medizinische Parasitologie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Walter Aurelius Maier und der Betreuung von Frau Priv. Doz. Dr. Annette Elisabeth Kaiser durchgeführt.

**Teile, die aus dieser Arbeit veröffentlicht wurden und noch veröffentlicht werden:**

Kaiser A., Gottwald A., Wiersch C., Lindenthal B., Maier W. & Seitz H.M., **2001**, Effect of drugs inhibiting spermidine biosynthesis and metabolism on the *in vitro* development of *P. falciparum*  
*Parasitology Research*, 87: 963 - 972

Kaiser A., Gottwald A., Wiersch C., **2001**, Triclosan gegen Malaria  
*Deutsche Apotheker Zeitung*, 141(25): 76 – 78

Kaiser A., Gottwald A., Wiersch C., Maier W. & Seitz H.M, **2003**, Spermidine metabolism in parasitic protozoa – a comparison to the situation in prokaryotes, viruses and fungi  
*Folia Parasitologica*, 50: 3 – 18

Kaiser A., Gottwald A., Maier W. & Seitz H.M, **2003**, Targeting enzymes involved in spermidine metabolism – a possible new strategy for anti-parasitic treatment  
*Parasitology Research*, 91: 508 - 516

Moritz E., Seidensticker S., Gottwald A., Maier W., Brun R., Hoerauf A. & Kaiser A., **2004**, The efficacy of inhibitors involved in spermidine metabolism in *P. falciparum*, *Anopheles stephensi* and *Trypanosoma evansi*  
*Parasitology Research*, 94(1): 37-48

Hammels I., Gottwald A., Hoerauf A. & Kaiser A., **2004**, Biochemical analysis of eukaryotic initiation factor 5A from *Plasmodium vivax*  
*Handed in for publication*