



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Hamburg University of Applied Sciences

***In vitro*-Tests von HTS-Komponenten  
als Inhibitoren des PLP-Synthese-Komplexes  
von *Plasmodium falciparum***

Masterarbeit

zur Erlangung des Grades Master of Science

der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

durchgeführt am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

vorgelegt von

Madlen Hotze

geb. am 31.01.1988 in Zeitz

Matr. Nr.: 2058498



BERNHARD NOCHT INSTITUTE  
FOR TROPICAL MEDICINE

Hamburg 2013

Masterarbeit eingereicht im Rahmen der Masterprüfung  
im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology  
am Department Biotechnologie  
der Fakultät für Life Sciences  
der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä  
Zweitgutachter: Dr. Ingrid B. Müller  
Abgegeben am 14.03.2013

## Danksagung

Die vorliegende Masterarbeit wurde in der Zeit von September 2012 bis März 2013 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg im Bereich der Biochemischen Parasitologie in der Laborgruppe von Frau Dr. Ingrid B. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ingrid B. Müller, für die Aufnahme in Ihre Laborgruppe, das interessante Thema, ihre engagierte Betreuung, die Übernahme der Gutachtertätigkeit, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts und für die zahlreichen interessanten Anregungen und Diskussionsrunden.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä, für die Betreuung und Korrektur meiner Arbeit.

Der gesamten Laborgruppe, insbesondere Bärbel Bergmann und Sabine Butzloff, danke ich für die hilfreichen Ratschläge, die qualifizierte technische Unterstützung im Labor und die netten Gespräche und Kaffeepausen.

Ich danke an dieser Stelle auch meinen Freunden und meiner Familie für die andere Art von Unterstützung, die den notwendigen Ausgleich zum Arbeitsalltag schaffte.

Und zu guter letzt bedanke ich mich bei allen anderen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und so auf die eine oder andere Weise am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## Zusammenfassung

Malaria ist heute die am weitesten verbreitete und schwerwiegendste Tropenkrankheit der Welt. Da Plasmodien, die Erreger der Malaria immer häufiger Resistenzen gegen die gängigen chemotherapeutischen Behandlungsstrategien entwickeln, ist es nötig neue spezifische Angriffsziele für die Bekämpfung des Parasiten zu identifizieren. Eines dieser potentiellen Angriffsziele stellt die *de novo* Vitamin B<sub>6</sub>-Synthese des Parasiten mit Hilfe der beiden Enzyme Pdx1 und Pdx2 dar.

In dieser Arbeit wurden 27 Substanzen, die in einem Hochdurchsatztestverfahren mit über 250000 Substanzen als potentielle Inhibitoren der PLP-Synthase identifiziert wurden, erneut synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit auf Pdx1, Pdx2 und die PLP-Synthase hin evaluiert. Dabei wurde deutlich, dass es bei der erneuten Synthese einiger Substanzen bei einem Hersteller zu Problemen kam und diese keine inhibitorische Aktivität zeigten, während die gleichen Substanzen eines anderen Herstellers inhibierend wirkten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 17 Substanzen, die im Enzymassay eine signifikante Inhibierung zeigten, ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum von *Plasmodium falciparum* hatten. Diese Komponenten inhibierten das Wachstum von *Plasmodium falciparum* deutlich mit IC<sub>50</sub>-Werten im Bereich von 0,4 µM bis 59 µM. Die inhibitorische Aktivität richtet sich hauptsächlich gegen Pdx2, da im Enzymassay deutlich stärkere Effekte auf Pdx2 als auf Pdx1 oder die PLP-Synthase beobachtet wurden. Um einen Eindruck davon zu erhalten, ob die getesteten Substanzen zytotoxisch sind, wurden Wachstumsversuche mit HepG2-Zellen durchgeführt. Diese zeigten, dass 4 der 17 aktiven Substanzen auch in hohen Konzentrationen keinen messbaren Effekt auf das Wachstum der HepG2-Zellen hatten.

Zusätzlich wurde Auranofin, ein Wirkstoff gegen rheumatoide Arthritis und ein bekannter Inhibitor der thiolabhängigen Redoxenzyme Thioredoxin-Gluthathion-Reduktase (TGR) und Thioredoxin-Reduktase (TrxR) von Parasiten, auf seine Wirksamkeit gegen die Enzyme Pdx1 und Pdx2 hin untersucht, da diese, wie die Enzyme TrxR und TGR, an der Entgiftung von Sauerstoff-Radikalen beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass Auranofin die Pdx2-Aktivität im Enzymassay mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 6,5 µM hemmt. Weiterhin wurde im Test mit *Plasmodium falciparum* gezeigt, dass eine Pdx1- und Pdx2-überexprimierende Zelllinie über einen längeren Zeitraum resistenter gegen Auranofin ist, als die Kontrollzelllinie.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Zusammenfassung.....	II
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Malaria - Geschichte und Verbreitung.....	1
1.2. Der Erreger der Malaria.....	2
1.2.1. Systematische Einordnung .....	3
1.2.2. Lebenszyklus.....	4
1.3. Formen der Malaria .....	6
1.4. Therapie und Bekämpfungsmöglichkeiten.....	7
1.5. Vitamin B <sub>6</sub> .....	9
1.5.1. Allgemein .....	9
1.5.2. <i>De novo</i> Vitamin B <sub>6</sub> -Biosynthese.....	11
1.5.3. PLP-Synthase von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	13
1.5.4. Die Rolle von Pdx1 und Pdx2 bei der plasmodialen Reaktion auf oxidativen Stress.....	15
1.6. Zielsetzung der Arbeit .....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Materialien .....	18
2.1.1. Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.2. Laborausstattung.....	19
2.1.3. Chemikalien .....	20
2.1.4. Verwendete Inhibitoren.....	22
2.1.5. Zelllinien.....	22
2.1.6. Puffer, Medien, Lösungen .....	23
2.1.6.1. Zellkulturmedien .....	23
2.1.6.2. Proteinaufreinigung.....	23
2.1.6.3. Bradford-Assay.....	24
2.1.6.4. SDS-Gelelektrophorese.....	24

2.1.6.5.	Bestimmung der Enzymaktivität.....	24
2.1.6.6.	HepG2-Kulturführung.....	25
2.1.6.7.	Kulturführung Plasmodien .....	25
2.1.6.8.	H <sup>3</sup> -Hypoxanthin-Einbautests .....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Proteinaufreinigung über einen Strep-Tag.....	26
2.2.2	Protein-Quantifizierung nach Bradford (1976).....	27
2.2.3	SDS-Gelelektrophorese.....	28
2.2.4	Bestimmung der Enzymaktivität.....	29
2.2.4.1	Glutaminase-Aktivitätsassay nach Dong <i>et al.</i> (2004) .....	29
2.2.4.2	Pdx1-Aktivitätsassay nach Müller <i>et al.</i> (2008).....	31
2.2.4.3	PLP-Synthase-Aktivitätsassay nach Müller <i>et al.</i> (2008) .....	33
2.2.4.4	Statistische Beurteilung der Signifikanz und Erstellen von Dosis- Wirkungskurven .....	34
2.2.5	Kulturführung von HepG2-Zellen.....	35
2.2.6	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	36
2.2.7	Einfrieren von HepG2-Zellen .....	36
2.2.8	Auftauen von HepG2-Zellen.....	37
2.2.9	Bestimmen der Zytotoxizität mit HepG2-Zellen.....	37
2.2.10	Kulturführung von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	39
2.2.11	Bestimmung der Parasitämie einer Plasmodien-Kultur .....	39
2.2.12	Einfrieren von Plasmodien .....	39
2.2.13	Auftauen von Plasmodien.....	40
2.2.14	Synchronisieren einer Plasmodien-Kultur .....	40
2.2.15	Bestimmung des IC <sub>50</sub> der HTS-Komponenten über den Einbau von radioaktiv-markiertem Hypoxanthin .....	41
2.2.16	Erstellen einer Wachstumskurve .....	42
3.	Ergebnisse .....	43
3.1.	Bestimmung der inhibitorischen Wirkung der HTS-Komponenten auf die Enzymaktivität von <i>PfPdx1</i> und <i>PfPdx2</i> .....	43
3.1.1.	Inhibierung der Glutaminase-Aktivität ( <i>PfPdx2</i> -Aktivität).....	43
3.1.2.	Inhibierung des Hilfsenzym, der Glutamat-Dehydrogenase.....	46
3.1.3.	Erstellen von Dosis-Wirkungskurven für die identifizierten spezifischen <i>PfPdx2</i> -Inhibitoren.....	47

3.1.4.	Inhibierung der <i>PfPdx1</i> -Aktivität.....	49
3.1.5.	Erstellen von Dosis-Wirkungskurven für die identifizierten <i>PfPdx1</i> - Inhibitoren .....	51
3.1.6.	Inhibierung der PLP-Synthase ( <i>PfPdx1</i> und <i>PfPdx2</i> -Aktivität) .....	53
3.2.	Die inhibitorische Wirkung der HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	56
3.3.	Effekt der HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum des <i>PfPdx1</i> - und <i>PfPdx2</i> -überexprimierenden Plasmodienstamm.....	59
3.4.	Zytotoxizität der HTS-Komponenten und Auranofin auf HepG2-Zellen	62
4.	Diskussion .....	65
4.1.	Die Komponenten der Firma Oxeltis zeigen keine inhibitorische Aktivität.....	67
4.2.	Inhibitorische Aktivität der Komponenten der Firmen Evotec und Molport .....	69
4.3.	Die inhibitorische Wirkung von Auranofin .....	72
4.4.	Selektivität der Komponenten gegen die plasmodiale <i>de novo</i> Vitamin B <sub>6</sub> -Synthese .....	74
4.5.	Ausblick .....	76
	Referenzen.....	X
	Anlagen .....	XIX
A.	Übersichtstabelle der Restaktivitäten und IC <sub>50</sub> -Werte .....	XIX
B.	Dosis-Wirkungskurven und IC <sub>50</sub> -Werte der Zytotoxizität der HTS- Komponenten auf HepG2-Zellen .....	XXI
C.	Absorptionsspektren aus den drei Enzymaktivitätsassays .....	XXII
	Eidesstattliche Erklärung .....	XXIX

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die geographische Verbreitung der Malaria (©WHO 2012). .....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus humanpathogener Plasmodien [Cooke & Hill, 2001]. .....	4
Abbildung 3: Blutstadien von <i>Plasmodium falciparum</i> . .....	5
Abbildung 4: Übersicht über die drei Derivate des 5-Hydroxymethyl-3-Pyridinols und deren korrespondierende Phosphatester. ....	10
Abbildung 5: Der DOXP- abhängige Vitamin B <sub>6</sub> -Syntheseweg, der z. B. bei <i>E. coli</i> zu finden ist [Raschle <i>et al.</i> , 2005]. .....	11
Abbildung 6: Übersicht über die PLP-Synthese im DOXP-unabhängigen Weg bei <i>Plasmodium falciparum</i> [Müller <i>et al.</i> , 2008]. .....	12
Abbildung 7: Röntgenkristallstruktur des plasmodialen PLP-Synthase [Dissertation Guédez Rodríguez, 2011]. .....	14
Abbildung 8: Regressionsgerade zur Protein-Quantifizierung mittels Bradford-Assay. ....	27
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Pdx2-Aktivitätsassays nach Dong <i>et al.</i> (2004). .....	30
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Pdx1-Aktivitätsassays mit Ammoniumchlorid nach Müller <i>et al.</i> (2008). .....	31
Abbildung 11: Regressionsgerade zur Quantifizierung der synthetisierten PLP-Menge. ....	32
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Tests für die vollständige PLP-Synthesereaktion nach Müller <i>et al.</i> (2008). .....	34
Abbildung 13: Spaltung des Tetrazolium-Salzes (WST-1) zu Formazan. ....	37
Abbildung 14: Exemplarisches Absorptionsspektrum der ungehemmten PfPdx2-Reaktion im Bereich von 250 bis 450 nm. ....	43
Abbildung 15: PfPdx2-Aktivität im Glutaminase-Aktivitätsassay unter Einfluss der getesteten Komponenten 1 bis 27, E1 bis E10 und Auranofin. ....	44
Abbildung 16: Exemplarisches Absorptionsspektrum der durch die HTS-Komponente 24 beeinflussten Pdx2-Aktivität. ....	45
Abbildung 17: Inhibierung der GDH in Anwesenheit der HTS-Komponenten. ....	46



Abbildung 18: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven von Auranofin und einiger HTS-Komponenten auf die <i>PfPdx2</i> -Aktivität. ....	48
Abbildung 19: Exemplarisches Absorptionsspektrum der ungehemmten <i>PfPdx1</i> -Reaktion im Bereich von 300 bis 500 nm. ....	49
Abbildung 20: <i>PfPdx1</i> -Aktivität im <i>PfPdx1</i> -Aktivitätsassay unter Einfluss der getesteten Komponenten 1 bis 27, E1 bis E10 und Auranofin.....	50
Abbildung 21: Exemplarisches Absorptionsspektrum der von Komponente 24 beeinflussten <i>Pdx1</i> -Aktivität. ....	51
Abbildung 22: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven einiger HTS-Komponenten auf die <i>Pdx1</i> -Aktivität.....	52
Abbildung 23: Exemplarisches Absorptionsspektrum der ungehemmten PLP-Synthase-Reaktion im Bereich von 300 bis 500 nm. ....	53
Abbildung 24: Aktivität der PLP-Synthase unter Einfluss der getesteten Komponenten 1 bis 27, E1 bis E10 und Auranofin.....	54
Abbildung 25: Absorptionsspektren der PLP-Synthase-Reaktion unter dem Einfluss von Komponente 18 (A) und Komponente 24 (B).....	55
Abbildung 26: <sup>3</sup> H-Hypoxanthineinbautest mit den HTS-Komponenten, sowie mit Auranofin auf den Plasmodienstamm 3D7.....	57
Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven aus dem <sup>3</sup> H-Hypoxanthineinbautest mit den HTS-Komponenten 14-M und 19, sowie mit Auranofin auf die Plasmodienstämme 3D7- <i>PfPdx1</i> -Strep/ <i>PfPdx2</i> -Myc-BSD-WR und 3D7-pARL-BSD-WR.....	60
Abbildung 28: Exemplarischer Verlauf des Wachstums von 3D7- <i>PfPdx1</i> -Strep/ <i>PfPdx2</i> -Myc-BSD-WR im Vergleich zum Wachstum von 3D7-pARL-BSD-WR unter Einfluss von 0,2 $\mu$ M Auranofin über einen Zeitraum von 120 Stunden.....	61
Abbildung 29: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven der inhibitorisch aktiven HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von HepG2-Zellen. ....	63
Abbildung 30: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven der inhibitorisch aktiven HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von HepG2-Zellen.....	XXI

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristik der Infektion mit verschiedenen humanpathogenen Plasmodien-arten [Antinori, 2012].	6
Tabelle 2: Zusammensetzung des verwendeten Trenn- und Sammelgels.	28
Tabelle 3: Aktivität des <i>PfPdx2</i> -Moleküls in Anwesenheit der HTS-Komponenten.	45
Tabelle 4: Einfluss der HTS-Komponenten auf die Glutamat-Dehydrogenase.	47
Tabelle 5: $IC_{50}$ -Werte von Auranofin und den HTS-Komponenten 14-M, 15, 19 und 20 auf die Aktivität von <i>PfPdx2</i> .	48
Tabelle 6: Aktivität des <i>PfPdx1</i> -Moleküls in Anwesenheit der HTS-Komponenten.	50
Tabelle 7: $IC_{50}$ -Werte der HTS-Komponenten 14-M, 15 und 19 auf die Aktivität von <i>PfPdx1</i> .	52
Tabelle 8: Restaktivität der PLP-Synthase in Anwesenheit der HTS-Komponenten.	55
Tabelle 9: Mittlere inhibitorische Konzentrationen ausgewählter HTS-Komponenten auf das Wachstum und die Proliferation des Plasmodienstamms 3D7.	58
Tabelle 10: Mittlere inhibitorische Konzentrationen der Komponenten 14-M, 19 und von Auranofin auf das Wachstum und die Proliferation der beiden Plasmodienzelllinien <i>PfPdx1</i> -Strep/ <i>PfPdx2</i> -Myc-BSD-WR und pARL-BSD-WR.	60
Tabelle 11: Mittlere inhibitorische Konzentrationen der HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von HepG2-Zellen.	64
Tabelle 12: Übersicht über die Mittelwerte der Restaktivitäten und $IC_{50}$ -Werte aus den verschiedenen Assays.	XIX

## Abkürzungsverzeichnis

4PEHz	4-Phospho-D-Erythronhydrazid
ANCOVA	Kovarianzanalyse ( <i>analysis of covariance</i> )
APAD	3-Acetylpyridinadenindinukleotid
APS	Ammoniumpersulfat
Au	Auranofin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BSD	Blasticidin S Deaminase
Ci	Curie
cpm	<i>Counts per minute</i>
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOXP	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
E4P	D-Erythrose-4-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Eh</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EHZ	D-Erythronhydrazid
FBS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GapA	Erythrose-4-Phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GQ	Großquadrat
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)Benzoessäure
HBr	Bromwasserstoff
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HTS	Hochdurchsatzscreening ( <i>high throughput screen</i> )
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
KCl	Kaliumchlorid

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
m	Geradenanstieg
n	Anzahl der Wiederholungen
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Natriumphosphat
$\text{NaCl}$	Natriumchlorid
$\text{NAD(P)H}$	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Ammoniumchlorid
p	Signifikanzwert
Pase	Phosphatase
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
Pdx1	Pyridoxal-5-Phosphat-Synthase
Pdx2	Glutaminase
PdxA	Pyridoxin-5-Phosphat-Synthase
PdxB	Dehydrogenase
PdxF	Transaminase
PdxH	Pyridoxinphosphat-Oxidase
PdxJ	Pyridoxin-5-Phosphat-Synthase
PdxK	Pyridoxalkinase
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxal-5-Phosphat
PM	Pyridoxamin
PMP	Pyridoxamin-5-Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PN	Pyridoxin
PNP	Pyridoxin-5-Phosphat
$R^2$	Bestimmtheitsmaß
R5P	Ribose-5-Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	Zellkulturmedium

SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
<i>Sj</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>Sm</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
Tase	Transaminase
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TGR	Thioredoxin-Gluthathion-Reduktase
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
U	Unit
v. Chr	vor Christus
Vol. %	Volumenprozent
WHO	<i>World Health Organization</i>
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat ( <i>Water soluble tetrazolium salt</i> )

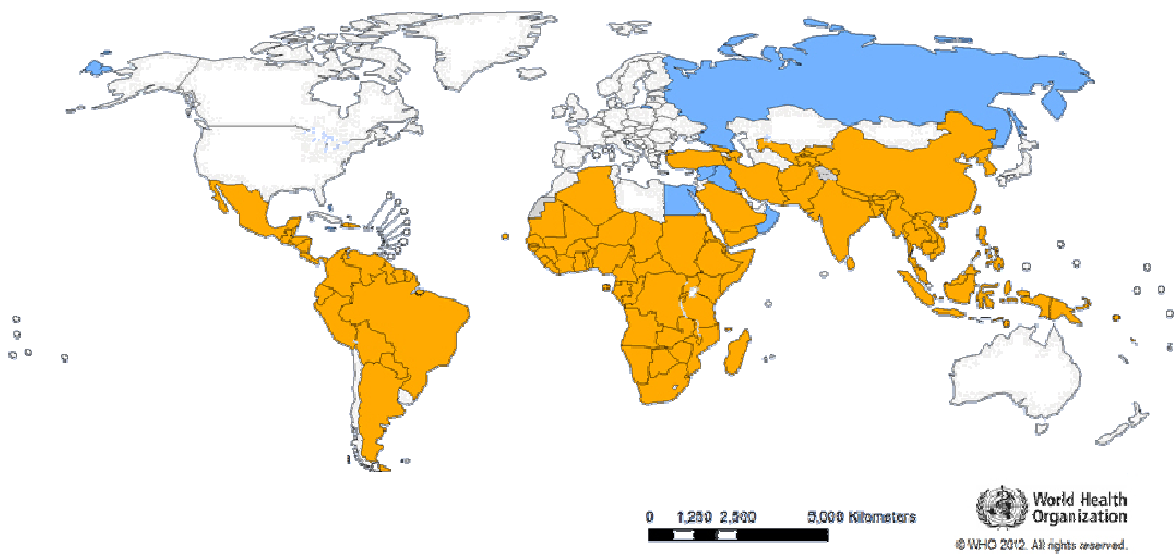
# 1. Einleitung

## 1.1. Malaria - Geschichte und Verbreitung

Malaria, auch Sumpffieber genannt, ist eine häufig auftretende und schwerwiegende Tropenkrankheit, die durch eine Infektion mit Protozoen, die durch Moskitos übertragen werden, verursacht wird. Die *World Health Organization* (WHO) schätzt die Zahl der Malariaerkrankungen im Jahr 2010 auf weltweit etwa 216 Millionen und die Zahl der Todesfälle durch Malaria im selben Jahr auf etwa 655000. Davon traten 91 % der Todesfälle in Afrika auf und 86 % der Todesfälle waren Kinder unter 5 Jahren. Insgesamt sind 106 Länder betroffen, darunter Nigeria, die Demokratische Republik Kongo, Burkina Faso, Mosambik, die Elfenbeinküste und Mali. Etwa 60 % der Todesfälle 2010 traten allein in diesen sechs Ländern auf [World Malaria Report, 2011].

Malaria war bereits in den frühen Hochkulturen bekannt und wurde in zahlreichen Schriften erwähnt. Die ältesten Beschreibungen finden sich im Nei Ching (Schrift der chinesischen Medizin um 2700 v. Chr.), auf mesopotamischen Tafeln (um 2000 v. Chr.) oder auch in den Aufzeichnungen Hippokrates (um 400 v. Chr.) [Bruce-Chwatt, 1981; Cox, 2010]. Der Name Malaria leitet sich aus dem altitalienischen *mal'aria* ab und bedeutet schlechte Luft. Der Grund dafür liegt in der lange Zeit verbreiteten Annahme, dass die Krankheit über die Luft übertragen wird. Selbst nachdem der französische Mediziner Charles Louis Alphonse Laveran (1845 - 1922) 1880 den Malariaerreger in Erythrozyten entdeckte [Bruce-Chwatt, 1981], blieb der Übertragungsmechanismus noch lange Zeit unklar. Erst 1897 wies der britische Mediziner Ronald Ross (1857 - 1932) den Zusammenhang zwischen Moskitos und Malariainfektionen nach [Manson, 1898; Manson, 1900]. 1897 entdeckten die amerikanischen Mediziner William George MacCullum (1874 - 1944) und Eugene Opie (1873 - 1971) die sexuelle Multiplikation der Parasiten [Cox, 2010] und 1947 wurden schließlich die Leberstadien der Parasiten entdeckt [Shortt und Garnham, 1948]. Schlussendlich konnte im Jahr 2002 das gesamte Genom von *Plasmodium falciparum* entschlüsselt werden [Gardner *et al.*, 2002].

Die geographische Verbreitung der Malaria entlang tropischer und subtropischer Gebiete entspricht der geographischen Verbreitung der Anopheles-Mücken. In diesen Gebieten ermöglichen die Umgebungsbedingungen eine gute Multiplikation des Vektors, der Anopheles-Mücke, und damit ein erhöhtes Infektionsrisiko. In der Vergangenheit war Malaria auch in weiten Teilen Nordamerikas, Europas und in Teilen Nordasiens endemisch. Doch durch die Trockenlegung von Sumpfgebieten konnte die Ausbreitung in diesen Gebieten gestoppt werden [Westheide & Rieger, 1996].



**Abbildung 1: Übersicht über die geographische Verbreitung der Malaria (©WHO 2012).**

Malaria ist vor allem in Afrika, Mittel- und Südamerika, Indien und Südostasien verbreitet. Europa, Australien und Nordamerika gelten als „Malaria-frei.“

(●) Länder/Gebiete die von Malaria betroffen sind; (●) Länder/Gebiete die ein wieder auftreten der Malaria verhindern; (○) Länder/Gebiete die nicht von Malaria betroffen sind

### 1.2. Der Erreger der Malaria

Einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* infizieren eine Vielzahl von Wirbeltieren und sind verantwortlich für die verheerenden Auswirkungen der Malaria beim Menschen. Die Gattung umfasst über 100 verschiedene Arten, die neben Säugetieren auch Vögel und Reptilien infizieren [Alano, 2007].

Fünf Arten der Gattung *Plasmodium* sind humanpathogen. Dabei handelt es sich um *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi* [Greenwood und Targett, 2011]. Diese unterscheiden sich in ihrer Verbreitung, ihren Krankheitsverläufen und ihrer Virulenz.

### 1.2.1. Systematische Einordnung

Phylogenetisch werden Plasmodien folgendermaßen klassifiziert [Lucius und Loos-Frank, 2008]:

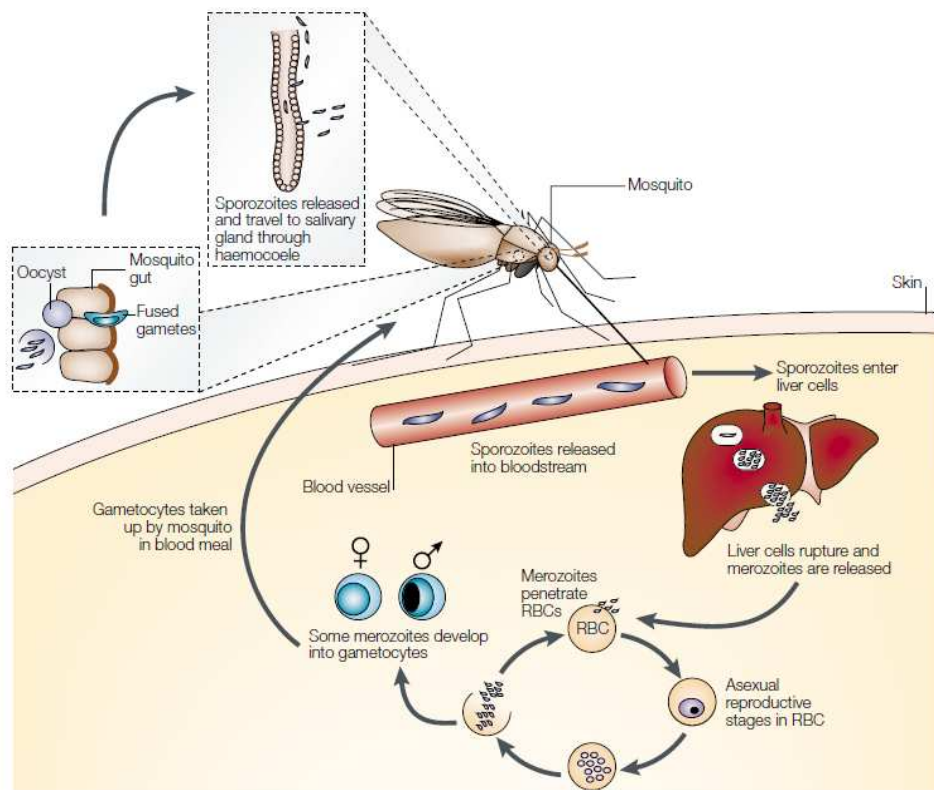
<b>Domäne</b>	Eukaryoten
<b>Gruppe</b>	Alveolata
<b>Stamm</b>	Apikomplexa
<b>Ordnung</b>	Haemosporida
<b>Familie</b>	<i>Plasmodiidae</i>
<b>Gattung</b>	<i>Plasmodium</i>

Plasmodien sind parasitische Protozoen (Einzeller). Der Begriff Protozoen beschreibt eine Gruppe eukaryotischer Lebewesen mit heterotropher oder autotropher Lebensweise. Weiterhin werden Plasmodien zur Gruppe der Alveolata gezählt. Bei den Alveolata liegen die Alveolen (flache Vakuolen) meist direkt unterhalb der Plasmamembran. Plasmodien gehören zusammen mit anderen humanpathogenen obligaten Endoparasiten wie *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmose) und *Cryptosporidium parvum* (Kryptosporidiose) zu den Apikomplexa [Belli *et al.*, 2005]. Der Stamm der Apikomplexa zeichnet sich durch den Apikalkomplex aus, in welchem sekretorische Organellen (Mikronemen und Rhopterien) liegen, die Proteine für die Invasion der Wirtszelle beinhalten. Ein weiteres typisches Organell der Apikomplexa ist der Apikoplast, ein Chloroplasten-ähnliches Organell.



## 1.2.2. Lebenszyklus

Der Lebenszyklus verläuft bei allen bekannten humanpathogenen Plasmodien ähnlich. Plasmodien zeigen einen haplo-homophasischen Generationswechsel, mit geschlechtlicher Fortpflanzung (Gamogonie) und ungeschlechtlicher Fortpflanzung (Sporogonie und Schizogonie), sowie einem obligaten Wirtswechsel zwischen dem Mensch als Zwischenwirt und der Anopheles-Mücke als Endwirt (siehe Abbildung 2) [Mehlhorn & Piekarski, 2002].

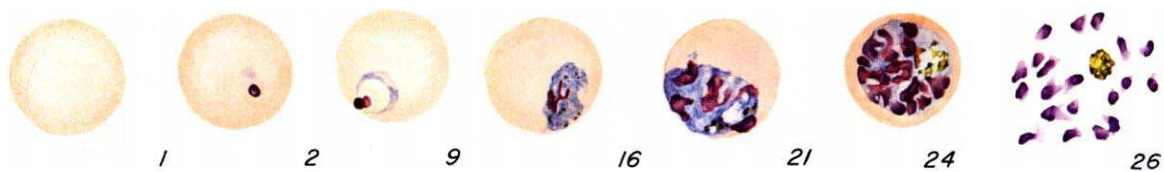


**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus humanpathogener Plasmodien [Cooke & Hill, 2001].**

Durch den Stich einer infizierten Anopheles-Mücke gelangen Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Mücke in den menschlichen Blutkreislauf und in die Leber. In den Hepatozyten entwickeln sich Merozoiten, diese gelangen in den Blutkreislauf, wo sie Erythrozyten befallen und neue Merozoiten entstehen. Einige Merozoiten entwickeln sich zu männlichen und weiblichen Gametocyten. Sie zirkulieren im Blut und werden bei einem erneuten Stich einer Anopheles-Mücke von dieser aufgenommen. Im Darm der Mücke entsteht eine Zygote, die sich in die Darmwand einnistet, dort kommt es zur Sporogonie. Die neu entstandenen Sporozoiten gelangen in die Speicheldrüsen der Mücke und können von dort auf einen neuen Zwischenwirt übertragen werden.

Durch den Stich einer infizierten Anopheles-Mücke gelangen Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Mücke in den menschlichen Blutkreislauf. Die Sporozoiten wandern zur Leber und befallen dort Hepatozyten, in denen die erste asexuelle Multiplikation, die sogenannte exoerythrozytäre Schizogonie, stattfindet. Pro Hepatozyt entstehen bis zu 30000 Merozoiten, die durch die Ruptur der Zelle in die Blutbahn freigesetzt werden [Good & Doolan, 1999], wo sie Erythrozyten befallen.

In den Erythrozyten findet die zweite Phase der asexuellen Vermehrung, die sogenannte erythrozytäre Schizogonie statt. Bei dieser entwickelt sich der Parasit innerhalb von 48 Stunden vom Ringstadium, dem jungen und alten Trophozoiten bis zum Schizonten (siehe Abbildung 3). Nach ca. 48 Stunden bricht die Blutzelle auf und es werden durchschnittlich 16 Merozoiten pro Zelle freigesetzt, die wiederum Erythrozyten befallen [Good & Doolan, 1999; Cox, 2010]. Aus einer der Schizogoniegenerationen entwickeln sich schließlich männliche und weibliche Gametozyten, die im peripheren Blut zirkulieren. Durch einen weiteren Stich der Anopheles-Mücke können diese aufgenommen werden, wodurch der Parasit in seinen Endwirt gelangt. Im Darm der Mücke entwickeln sich dann jeweils Mikro- und Makrogameten, durch deren Verschmelzung die Ookinete (Zygote) entsteht. Nach der Einnistung zwischen Epithel- und Basalmembran des Darms der Mücke findet die Sporogonie statt. Durch diese werden Sporozoiten produziert. Die Sporozoiten gelangen in die Speicheldrüsen der Mücke und können erneut auf den Menschen übertragen werden [Westheide & Rieger, 1996; Good & Doolan, 1999; Mehlhorn & Piekarski, 2002; Alano, 2007].



**Abbildung 3:** Blutstadien von *Plasmodium falciparum*.

1 = nicht infizierter Erythrozyt; 2, 16 = Trophozoiten; 9 = Trophozoit im Ringstadium; 21, 24 = Schizonten; 26 = ruptierter Schizont (Ausschnitt aus: Coatney G. R., Collins W. E., Warren M., Contacos P.G. (1971) The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda)

### 1.3. Formen der Malaria

Der klassische Verlauf einer Malariaerkrankung besteht aus dem periodischen Wechsel von Fieberanfällen und verschiedenen Begleiterscheinungen und Phasen ohne das Auftreten von Krankheitssymptomen. Zu Beginn der Erkrankung treten häufig nur Symptome wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Übelkeit, Muskelschmerzen, leichter Durchfall und leichte Erhöhung der Körpertemperatur auf. Malaria kann zu Multiorganversagen, Bewusstseinsstörungen, Krämpfen und in schweren Fällen bis zum Tod führen.

**Tabelle 1: Charakteristik der Infektion mit verschiedenen humanpathogenen Plasmodienarten [Antinori, 2012].**

Plasmodien	Malariaform	Inkubationszeit	Erythrozytärer Zyklus/ Fieberschübe	Parasitämie
<i>P. falciparum</i>	Malaria tropica	5-7 Tage	unregelmäßig	bis 20 %
<i>P. ovale</i>	Malaria tertiana	6-8 Tage	48 Stunden	~ 2 %
<i>P. vivax</i>	Malaria tertiana	9 Tage	48 Stunden	~ 2 %
<i>P. malariae</i>	Malaria quartana	14-16 Tage	72 Stunden	< 1 %
<i>P. knowlesi</i>	n. a.	8-9 Tage	~ 24 Stunden	bis 20 %

Typisch für Malaria sind periodisch auftretenden Fieberschübe, die durch die Freisetzung von Merozoiten während der erythrozytären Schizogonie bedingt sind (siehe Abbildung 2). Die klinischen Symptome, hohes Fieber, Anämie und Organversagen, treten erst nach der exoerythrozytären Schizogonie in der Leber auf. Die Inkubationszeit beträgt, in Abhängigkeit der Parasitenart, zwischen 8 und 15 Tagen. Neben den verschiedenen Inkubationszeiten zeigen die einzelnen Plasmodienarten auch eine unterschiedliche Dauer des erythrozytären Zyklus (siehe Tabelle 1). Malaria tropica zeigt unregelmäßige Fieberschübe, wohingegen bei Malaria tertiana und Malaria quartana nach 48 bzw. 72 Stunden charakteristische Fieberschübe beobachtet werden können. Die Ursache liegt dabei in der nahezu synchronen Ruptur der infizierten Erythrozyten. Dabei werden sogenannte „Malaria-Toxine“ und Antigene freigesetzt, die die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in pathologischen Mengen hervorrufen [Clark *et al.*, 2004].

Weiterhin unterscheiden sich die Parasitämien sehr stark, was auf die verschiedenen Präferenzen der Parasiten für bestimmte Erythrozyten zurückzuführen ist. *Plasmodium vivax* und *ovale* befallen ausschließlich Retikulozyten (junge Erythrozyten), *Plasmodium malariae* dagegen nur ausgereifte Erythrozyten [Antinori, 2012; Collins, 2007; Collins, 2005]. *Plasmodium falciparum* und *knowlesi* zeigen keine solche Präferenz und können daher höhere Parasitämien auslösen.

Bei der Infektion mit *Plasmodium falciparum* verändert der Erreger die Zytoadhärenz der Wirtszelle, wodurch es zur Aggregation infizierter Erythrozyten untereinander und an Gefäßwände kommt. Dies führt zu Störungen der Durchblutung und schließlich zu Gewebeschäden [Kaul *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 2001]. Durch die Ruptur der Erythrozyten kann es ebenfalls zu Symptomen einer Anämie, wie z. B. Kurzatmigkeit, kommen [Miller *et al.*, 2002].

### 1.4. Therapie und Bekämpfungsmöglichkeiten

Da es bisher noch nicht möglich war, einen Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln, beruht die Malariatherapie ausschließlich auf chemotherapeutischer Behandlung der Patienten. Seit vielen Jahren wird Chloroquin eingesetzt [Fidock, 2004]. Chloroquin hemmt die Kristallisation von Häm zu Hämozoin, welches beim Abbau von Hämoglobin durch Plasmodien entsteht. Häm wirkt toxisch auf den Parasiten und dessen Akkumulation führt zum Absterben des Parasiten [Ursos & Roepe, 2002]. Durch jahrelange und häufig fehlerhafte Anwendung haben sich Chloroquin-resistente Parasiten verbreitet [Mehta & Das, 2006].

Ein weiteres klassisches Mittel zur Behandlung von Malaria ist Artemisin [Enserink, 2005]. Die genaue Wirkungsweise ist umstritten. Da Artemisin jedoch aus den Blättern und Blüten des Einjährigen Beifuss (*Artemisia annua*) extrahiert werden muss und nur in Kombination mit anderen Wirkstoffen eine langfristige Heilung ermöglicht, ist es sehr teuer und wird in den meisten Malariaregionen nur selten eingesetzt [Fidock, 2004]. Weitere gängige Antimalariamittel sind Antifolate, z. B. Pyrimethamin. Diese wirken als Folat-Analoga hemmend auf die Nukleinsäuresynthese [Ferone, 1969].

Zur Prävention einer möglichen Ansteckung werden derzeit hauptsächlich Maßnahmen zur Vektorkontrolle durchgeführt. So werden z. B. Insektizide oder Moskitonetze gegen die Anopheles-Mücke eingesetzt.

Die Sequenzierung der Genome einiger humanpathogenen Plasmodien [Gardner *et al.*, 2002; Carlton, 2008; Pain, 2008] sowie die Neu- und Weiterentwicklung von Methoden zur genetischen Manipulation bieten die Möglichkeit der genaueren biochemischen Analyse von plasmodialen Stoffwechselprozessen. Auf diese Weise können spezifische Angriffspunkte für Wirkstoffe (*drug targets*) identifiziert und die Wirkmechanismen bekannter Medikamente untersucht werden [Fidock, 2004].

Das Genom von *Plasmodium falciparum* enthält Gene die für Enzyme kodieren, die für die Synthese von Vitaminvorstufen wie Chorismat [Roberts *et al.*, 1998; McConkey *et al.*, 2004], sowie für die Synthese von Vitamin B1 [Wrenger *et al.*, 2005], Vitamin B<sub>6</sub> [Cassera *et al.*, 2004; Gengenbacher *et al.*, 2006; Wrenger *et al.*, 2005] und Vitamin B9 [Hyde, 2005] benötigt werden. Da Menschen und Tiere Vitamine nicht selbst synthetisieren können, sondern sie mit der Nahrung aufnehmen müssen, besitzen sie die dafür benötigten Enzyme nicht. Aus diesem Grund ist die *de novo* Synthese ein idealer Angriffspunkt für die Suche neuer Antimalaria-Wirkstoffe [Müller & Hyde, 2010].

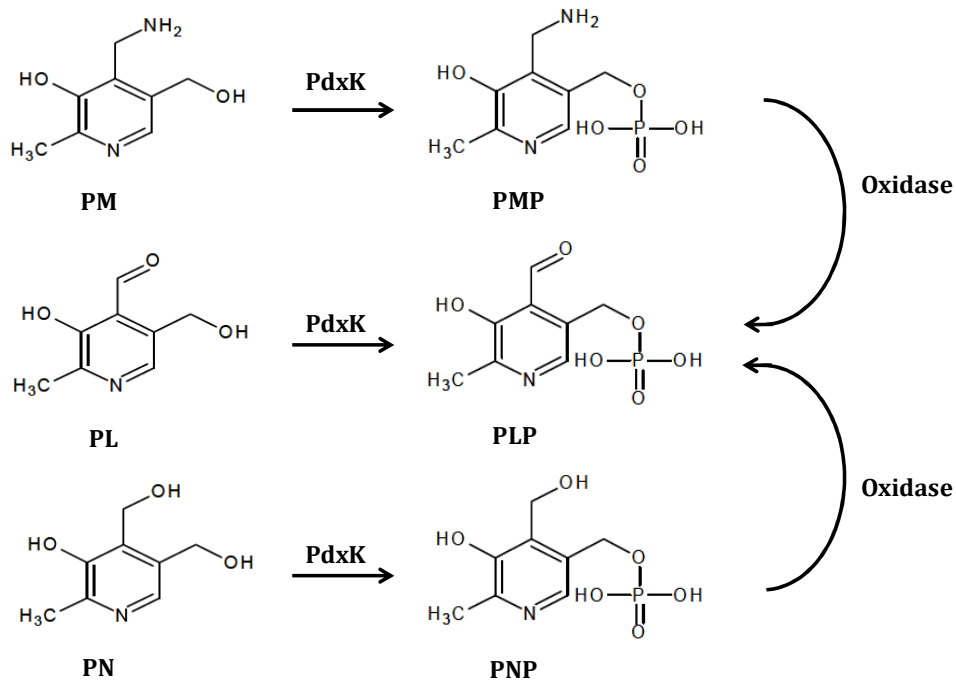
### 1.5. Vitamin B<sub>6</sub>

#### 1.5.1. Allgemein

Unter dem Begriff Vitamin B<sub>6</sub> werden die drei Vitamere Pyridoxamin (PM), Pyridoxal (PL) und Pyridoxin (PN), sowie deren Phosphatester Pyridoxamin-5-Phosphat (PMP), Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) und Pyridoxin-5-Phosphat (PNP) zusammengefasst. Die drei genannten Vitamere unterscheiden sich lediglich durch verschiedene Substituenten an der 4'-Position des Moleküls (siehe Abbildung 4) und können ineinander umgewandelt werden. Pyridoxamin-5-Phosphat und Pyridoxal-5-Phosphat sind die biologisch aktiven Formen. PLP ist für seine katalytische Vielseitigkeit bekannt [Eliot & Kirsch, 2004]. Es wirkt als Cofaktor, der an verschiedenen biochemischen Reaktionen, einschließlich der Aminosäure-Biosynthese, dem Kohlenhydratstoffwechsel und der Modifikation vieler Amin-haltiger Verbindungen beteiligt ist [Mozzarelli & Bettati, 2006].

Es existieren mindestens 140 verschiedene PLP-abhängige Enzyme und etwa 1,5 % der Gene eines typischen Prokaryoten codieren für Enzyme, die PLP-abhängig sind [Percudani & Peracchi, 2003].

Aufgrund seiner zahlreichen Funktionen ist Vitamin B<sub>6</sub> für alle Organismen essentiell. Viele Mikroorganismen und Pflanzen sind zur *de novo* Biosynthese fähig. Menschen, Tiere und einige hochspezialisierte obligate Pathogene dagegen nehmen Vitamin B<sub>6</sub> mit der Nahrung auf [Wetzel *et al.*, 2004]. Alle Organismen sind dazu in der Lage die verschiedenen Vitamere sehr effizient ineinander und in ihre phosphorylierten Derivate zu konvertieren [Lam & Winkler, 1992]. Bei Menschen und Tieren werden die drei Vitamere PM, PN und PL, nach der Aufnahme mit der Nahrung, im Dünndarm resorbiert und in die Leber transportiert. Dort werden sie durch die Pyridoxalkinase (PdxK) phosphoryliert. PMP und PNP werden anschließend durch die Pyridoxinphosphat-Oxidase zu PLP umgewandelt (siehe Abbildung 4). Dieser Vorgang ist auch unter der Bezeichnung *salvage pathway* bekannt.



**Abbildung 4: Übersicht über die drei Derivate des 5-Hydroxymethyl-3-Pyridinols und deren korrespondierende Phosphatester.**

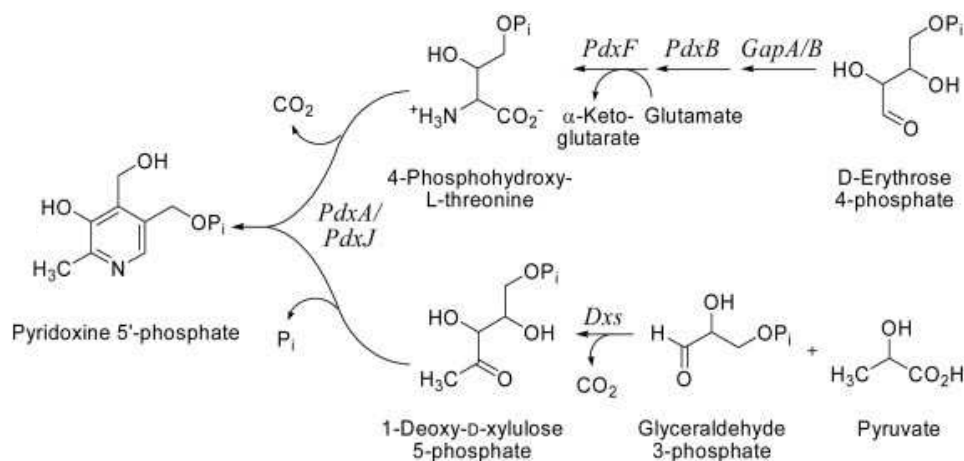
Die drei Vitamere Pyridoxamin (PM), Pyridoxal (PL) und Pyridoxin (PN) werden durch Pyridoxalkinasen (PdxK) phosphoryliert. Es entstehen die drei Phosphatester Pyridoxamin-5-Phosphat (PMP), Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) und Pyridoxin-5-Phosphat (PNP). PMP und PNP werden durch eine Oxidase in PLP überführt.

*Plasmodium falciparum* ist in der Lage Vitamin B<sub>6</sub> *de novo* zu synthetisieren. Neben den Enzymen für die *de novo* Synthese besitzt *Plasmodium falciparum* eine PdxK, die die nicht phosphorylierten Vitamere PL, PM und PN phosphorylieren kann [Wrenger *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2009]. Ob *Plasmodium falciparum* die Vitamere aufnimmt und phosphoryliert und seinen PLP-Bedarf auf diese Weise decken kann, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. In den Erythrocyten von Säugetieren ist eine große Menge an Vitamin B<sub>6</sub> vorhanden [Fonda & Harker, 1982], dieses ist jedoch fest an Serumalbumin und Hämoglobin gebunden [Friedrich, 1988]. Weiterhin konnte in Genomanalysen kein spezifischer Transporter für die Aufnahme der Vitamere in den Parasiten identifiziert werden [Gengenbacher *et al.*, 2006]. Aus diesen Gründen ist es möglich, dass die Vitamere im Erythrocyten für die PdxK nicht zur Verfügung stehen und die *de novo* Synthese des Vitamin B<sub>6</sub> für das Überleben des Parasiten essentiell ist.

1.5.2. *De novo* Vitamin B<sub>6</sub>-Biosynthese

Neben dem *salvage pathway* sind derzeit zwei unabhängige Reaktionswege für die *de novo* Biosynthese von PLP bekannt [Wetzel *et al.*, 2004]. Dabei handelt es sich um den DOXP-(1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat)-abhängigen und den DOXP-unabhängigen Weg.

Der DOXP-abhängige Weg, oder auch *E. coli-like pathway*, wurde umfangreich für *E. coli* beschrieben [Dempsey, 1971]. Dieser Syntheseweg ist nur bei Proteobakterien zu finden. Als Ausgangsstoffe dienen D-Erythrose-4-Phosphat, Glutamat, Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) (siehe Abbildung 5). Aus diesen Substraten werden in mehreren aufeinander folgenden Schritten durch die Enzyme Erythrose-4-Phosphat-Dehydrogenase (GapA), eine weitere Dehydrogenase (PdxB), eine Transaminase (PdxF) und DOXP die Intermediate 4-Phosphohydroxy-L-Threonin und Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat synthetisiert. Die Pyridoxin-5-Phosphat-Synthasen PdxA und PdxJ bilden aus diesen Intermediaten Pyridoxin-5-phosphat [Yang *et al.*, 1998; Wetzel *et al.*, 2004; Fitzpatrick, *et al.*, 2007].



**Abbildung 5:** Der DOXP- abhängige Vitamin B<sub>6</sub>-Syntheseweg, der z. B. bei *E. coli* zu finden ist [Raschle *et al.*, 2005].

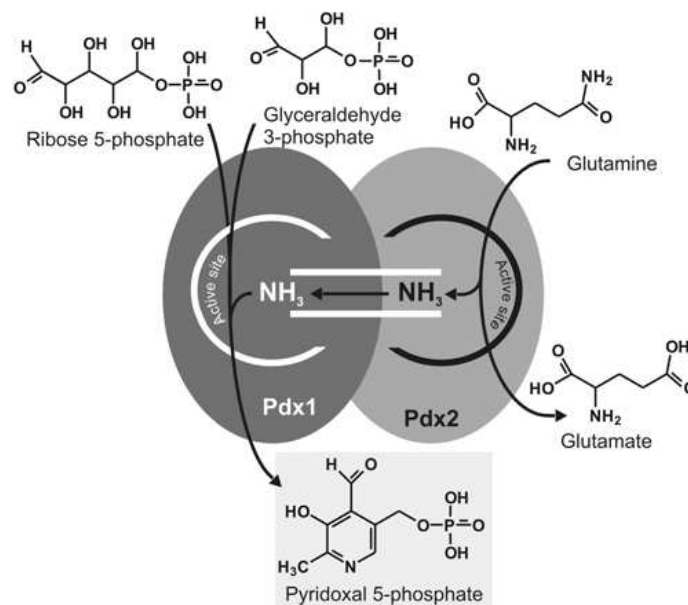
In mehreren Einzelschritten wird Pyridoxin-5-phosphat aus D-Erythrose-4-Phosphat, Glutamat, Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat synthetisiert und anschließend in die aktive Form, PLP, umgewandelt.



Der DOXP-unabhängige Weg, oder auch Ribose-5-Phosphat (R5P)-*dependent pathway*, wurde zuerst für *Cercospora nicotianae* identifiziert [Ehrenshaft *et al.*, 1999]. Dieser Syntheseweg kommt bei zahlreichen Pflanzen, Pilzen, bei den meisten Eubakterien und bei Plasmodien vor [Osmani *et al.*, 1999; Ehrenshaft and Daub, 2001; Raschle *et al.*, 2005; Wrenger *et al.*, 2005].

Als Substrate für die PLP-Synthese dienen hier Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Ribose-5-Phosphat und Glutamin [Burns *et al.*, 2005]. Am DOXP-unabhängigen Syntheseweg sind lediglich 2 Enzyme, Pdx1 und Pdx2, beteiligt (siehe Abbildung 6).

Pdx2 fungiert als Glutaminase der Klasse I mit der charakteristischen katalytischen Aminosäurefolge Glu-His-Cys. Es hydrolysiert Glutamin zu Glutamat. Anschließend wird die Amidgruppe durch einen Substrattunnel zur Pdx1-Untereinheit transportiert [Strohmeier *et al.*, 2006; Hanes *et al.*, 2008b; Müller *et al.*, 2008]. Pdx1 synthetisiert aus G3P, R5P und Ammonium Pyridoxal-5-Phosphat [Ehrenshaft *et al.*, 1999].



**Abbildung 6: Übersicht über die PLP-Synthese im DOXP-unabhängigen Weg bei *Plasmodium falciparum* [Müller *et al.*, 2008].**

Die Enzyme *Pf*Pdx1 und *Pf*Pdx2 lagern sich zu einem Komplex (PLP-Synthase) zusammen. Pdx2 spaltet Glutamin zu Glutamat und Ammonium, dieses gelangt über einen Substrattunnel zum *Pf*Pdx1-Molekül. Dieses synthetisiert aus den Substraten R5P, G3P und Ammonium Vitamin B<sub>6</sub>.

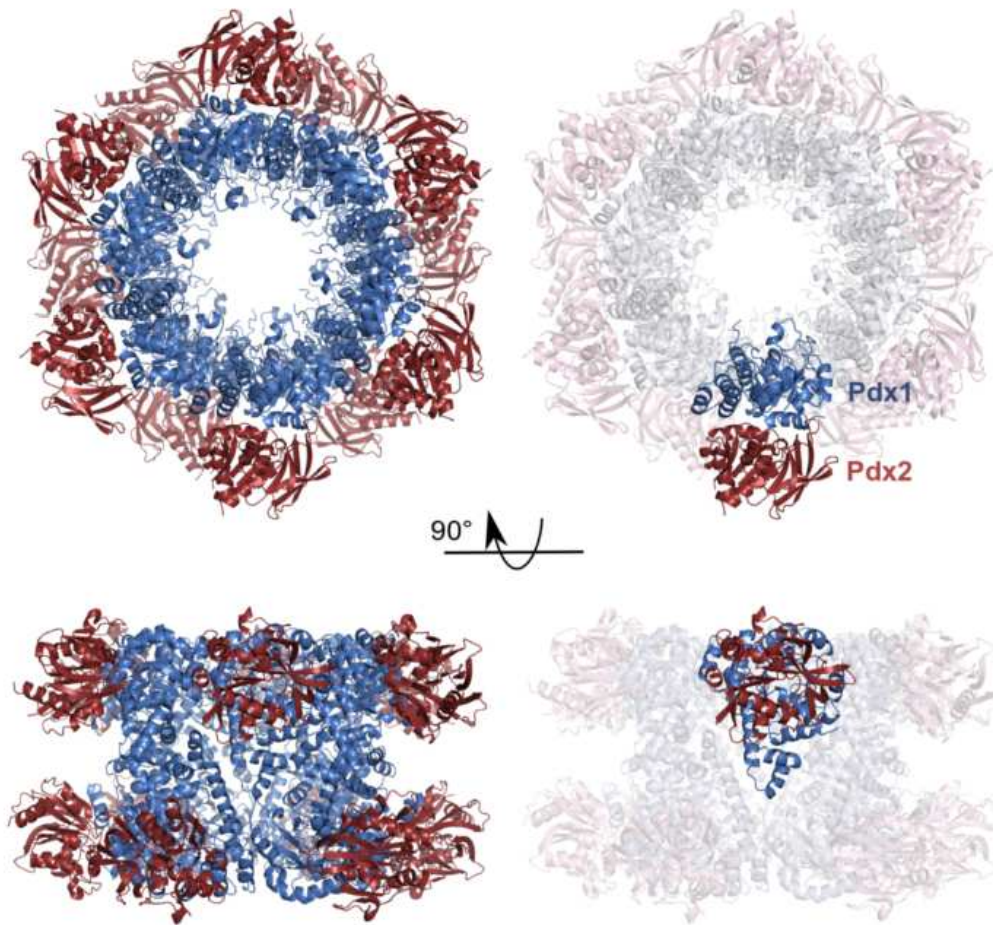
Während Pdx1 auch ohne Pdx2 aktiv ist, wenn Ammonium vorhanden ist, zeigt Pdx2 ohne die Bindung an mindestens ein Pdx1-Molekül keine Aktivität [Gengenbacher *et al.*, 2006; Derrer *et al.*, 2010]. Die Bindung von Pdx2 an Pdx1 ist transient [Flicker *et al.*, 2007], das bedeutet, dass sich Pdx2 nach erfolgter Glutaminasereaktion wieder vom Pdx1-Molekül ablöst und inaktiv vorliegt.

### 1.5.3. PLP-Synthase von *Plasmodium falciparum*

Die beiden an der PLP-Synthese beteiligten Enzyme, Pdx1 und Pdx2, bilden zusammen die PLP-Synthase. Die PLP-Synthase besteht aus 12 Pdx1- und 12 Pdx2-Untereinheiten. Das Zusammenlagern von Pdx1- und Pdx2-Molekülen und somit die Formierung der PLP-Synthase folgt einem festen Kurs [Müller *et al.*, 2008]. Jeweils 6 Pdx1-Moleküle bilden einen hexameren Ring. Die beiden Ringe lagern sich „kronenartig“ zusammen und an jede Pdx1-Untereinheit bindet eine Pdx2-Untereinheit [Müller *et al.*, 2008]. Die Pdx2-Moleküle liegen als Monomere vor und sind untereinander nicht verbunden, wohingegen die Pdx1-Moleküle miteinander verknüpft sind und so die vorliegende dodekamere Struktur aus bilden [Müller *et al.*, 2008]. Müller *et al.* (2008) konnten zeigen, dass die Aminosäuren R85, H88 und E91 an der Ausbildung des Komplexes beteiligt sind und Mutationen an diesen Stellen zu Aktivitätsverlust des Komplexes und zum Verlust der Bindungsaffinität der Pdx1-Moleküle untereinander führen.

Strohmeier *et al.* (2006) konnten die an der Bindung von Pdx1 und Pdx2 beteiligten Aminosäuren bei anhand der Kristallstruktur der PLP-Synthase von *Bacillus subtilis* identifizieren. Die Aminosäuren R8 und T6 der Pdx1-Untereinheit interagieren über ihre polaren Seitenketten mit dem E117 der Pdx2-Untereinheit. Weiterhin bildet K18 (Pdx1) eine Salzbrücke mit E15 (Pdx2) [Strohmeier *et al.*, 2006].

Die *Pf*Pdx2-Struktur konnte 2012 von Guédez *et al.* analysiert werden, die Struktur des *Pf*Pdx1 liegt bisher noch nicht vor. In Abbildung 7 ist die 3D-Struktur der plasmodialen PLP-Synthase dargestellt, dabei sind die *Pf*Pdx2-Untereinheiten in rot und die *Pb*Pdx1-Untereinheiten in blau dargestellt.



**Abbildung 7: Röntgenkristallstruktur des plasmodialen PLP-Synthase [Dissertation Guédez Rodríguez, 2011].**

Es wurden die Pdx1-Struktur von *Plasmodium berghei* (blau) und die Pdx2-Struktur von *Plasmodium falciparum* (rot) komplexiert (PDB-ID: 4ADS). Dabei bilden 12 Pdx1-Moleküle eine dodekamere Struktur. An jede Pdx1-Untereinheit bindet anschließend ein Pdx2-Molekül. Es sind die Ansicht von „oben“ (oben links) und die Seitenansicht (unten links) dargestellt, sowie rechts jeweils ein Pdx1/Pdx2-Heterodimer.

Es ist bekannt, dass Acivicin [Gengenbacher *et al.*, 2006] die Glutaminaseaktivität des Pdx2 inhibiert. Weiterhin konnten Reeksting *et al.* (2012) kürzlich drei Substanzen identifizieren, die die Aktivität des *PfPdx1* inhibieren. Dabei handelt es sich um D-Erythrose-4-Phosphat (E4P), D-Erythronhydrazid (EHZ) und 4-Phospho-D-Erythronhydrazid (4PEHZ). Der azyklische Phosphozucker E4P ist ein Analog des R5P und inhibiert *PfPdx1* sehr spezifisch mit einem  $IC_{50}$  von 3,7 mM auf das aufgereinigte *PfPdx1*-Molekül. Es besetzt vermutlich die R5P-Bindungsstelle im *PfPdx1*-Molekül, verhindert die Bindung des R5P und hemmt somit die PLP-Produktion.

Ein anderer möglicher Wirkmechanismus betrifft die Bindung von G3P und führt zur Unterdrückung des Ringschlusses am Ende der PLP-Bildung. 4PEHz und EHz sind Hydrazid-Analoga des E4P. Sie inhibieren *PfPdx1* ebenfalls, indem sie die R5P-Bindungsstelle besetzen. Dabei ist das nicht phosphorylierte EHz ca. 12-mal schwächer, als das phosphorylierte 4PEHz, das einen  $IC_{50}$  von 43  $\mu\text{M}$  auf das aufgereinigte *PfPdx1* und einen  $IC_{50}$ -Wert von 10,4  $\mu\text{M}$  auf *Plasmodium falciparum* zeigt.

### 1.5.4. Die Rolle von Pdx1 und Pdx2 bei der plasmodialen Reaktion auf oxidativen Stress

Neben der generell bekannten Rolle des PLP als Cofaktor, konnte eine weitere Bedeutung als Antioxidant für *Plasmodium falciparum* identifiziert werden [Knöckel *et al.*, 2012]. Durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welcher während des Verdaus von Hämoglobin oder durch die Immunabwehr des Wirtsorganismus entstehen [Sherman, 1977; Ehrenshaft *et al.*, 1999; Freinbichler *et al.*, 2011], wird auf den Parasiten oxidativer Stress ausgeübt [Knöckel *et al.*, 2012]. ROS sind Peroxide und freie Radikale, wie z. B. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxylradikale ( $\bullet\text{OH}$ ) und Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) oder Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Oxidativer Stress führt u. a. zu Beschädigungen der DNA, zur Oxidation von Fettsäuren in Lipiden und Aminosäuren in Proteinen, sowie zur Inaktivierung von Enzymen durch die Oxidation ihrer Cofaktoren.

Zur Abwehr von oxidativem Stress, stehen verschiedene Enzyme, wie die Enzyme Thioredoxin-Gluthathion-Reduktase (TGR) und Thioredoxin-Reduktase (TrxR) [Krnajski *et al.*, 2002] und die Superoxid-Dismutase (SOD) zur Verfügung. Weiterhin schützen Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E und Vitamin B<sub>6</sub> vor oxidativen Stress [Ehrenshaft *et al.*, 1999; Stocker *et al.*, 2003]. Knöckel *et al.* (2012) konnten zeigen, dass die Expression von *PfPdx1* und *PfPdx2* als Reaktion auf oxidativem Stress hochreguliert wird, weiterhin führt die Zusammenlagerung von *PfPdx1* und *PfPdx2* zur PLP-Synthese zu einer erhöhten Toleranz des Parasiten gegen Singulett-Sauerstoff [Knöckel *et al.*, 2012].

Auranofin, eine organische Goldverbindung, die seit über 25 Jahren zur Behandlung rheumatoider Arthritis eingesetzt wird, ist ein bekannter Inhibitor der parasitären thiolabhängigen Redoxenzyme, TrxR und TGR [Sannella *et al.*, 2008].

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die zeigten, dass Auranofin eine starke antiparasitäre Wirkung, auf u. a. *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania infantum* und *Entamoeba histolytica* hat [Kuntz *et al.*, 2007; Sannella *et al.*, 2008; Angelucci *et al.*, 2009; Ilari *et al.*, 2011; Debnath *et al.*, 2012]. Sannella *et al.* (2008) vermuteten, dass die antiparasitäre Wirkung von Auranofin bei *Plasmodium falciparum* auf der Existenz zweier unabhängiger inhibitorischer Wirkmechanismen beruht. Bisher konnte jedoch neben der Inhibierung der Enzyme TrxR und TGR kein weiteres molekulares Zielmolekül entdeckt werden.

### 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Malaria ist die am weitesten verbreitete Tropenkrankheit, von der über 100 Länder weltweit und damit ca. 40 % der Weltbevölkerung betroffen sind [World Malaria Report 2011]. Bisher wurde die Erkrankung größtenteils chemotherapeutisch, z. B. durch den Einsatz von Chloroquin, Artemisin und Antifolaten behandelt [Ferone, 1969; Fidock, 2004; Enserink, 2005]. Jedoch entwickeln sich in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen gegen die bekannten Wirkstoffe [Mehta & Das, 2006; Ekland *et al.*, 2007; Müller & Hyde, 2010]. Aus diesem Grund ist es notwendig, sowohl neue Wirkstoffe, als auch neue Angriffspunkte in Plasmodien zu identifizieren.

Ein solcher Angriffspunkt für neue Antimalariawirkstoffe stellt die Vitamin B<sub>6</sub>-Synthese dar [Wrenger *et al.*, 2005; Müller & Hyde, 2010]. Während *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, in der Lage ist Vitamin B<sub>6</sub> *de novo* zu synthetisieren [Wrenger *et al.*, 2005], ist der Mensch auf die Aufnahme von Vitamin B<sub>6</sub> mit der Nahrung angewiesen. Da der Mensch die für die *de novo* Synthese benötigten Enzyme Pdx1 und Pdx2 nicht besitzt, ist es nicht zu erwarten, dass eine Inhibierung dieser Parasiten-spezifischen Enzyme den menschlichen Metabolismus beeinträchtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 27 Substanzen getestet, die in einem Hochdurchsatz-Verfahren (HTS) eine inhibitorische Wirkung auf PfPdx2 gezeigt hatten. In drei verschiedenen *in vitro* Assays sollte untersucht werden, ob die neu synthetisierten Substanzen die Aktivität von PfPdx1 oder PfPdx2, oder die Komplexbildung der beiden Enzyme beeinträchtigen. Zudem sollte in einem Zytotoxizitätsassay die Wirksamkeit der Substanzen auf die humane Hepatom-Zelllinie HepG2 analysiert und die spezifische Wachstumshemmung auf Plasmodien bestätigt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Biozym Scientific GmbH	Pipettenspitzen 1000 µl Safe Seal-Tips Premium, 20-200 µl
Brand	UV-Küvette micro
EG&G Wallac	Filtermat A Filterkassette Probenbeutel
Eppendorf	Safe-Lock Tubes 0,5 ml , 1,5 ml, 2,0 ml
Greiner bio-one	Zellkulturflaschen
Invitrogen	Gelgießkassette für SDS-PAGE
Kimtech Science Brand	PFE Puder-freie Latex-Handschuhe Puder-freie Nitril-Handschuhe
LLG Labware	halbmikro Küvette, PS
Nunc	Kryo-Röhrchen Petrischalen Ø 60 mm oder 92 mm TC 96-Well-Mikrotiterplatte
PEQLAP	peqGold Safe Guard Filter Tips, 0,1-10 µl peqGold Safe Guard Filter Tips, 50-1250 µl
Perkin Elmer	Probenbeutel für Micro Beta
Sarstedt	Falconröhrchen 50 ml, 15 ml Gewegekulturflaschen für adhärente Zellen (75 cm <sup>2</sup> ) Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl Serologische Pipette, 10 ml, 25 ml, 5 ml
TPP	Zellkulturflaschen 150 ml

### 2.1.2. Laborausstattung

Angelontoni Industrie	-80 °C Platinum 370 Tiefkühltruhe
BeckmanCoulter	Avanti J-26 XP Zentrifuge
Bio-TEK	Uvikon 933, Double Beam Photometer
Brand	Transferringpipette 8/-12 electronic 10-200 µl Multi-pipette
Branson	Sonifier 250
Carl Zeiss	Axioskop 20 Mikroskop
Clean Air Technik B. V.	Clean Air Sterilwerkbank
Denver Instrument	Scaltec SBA Waage
Dynex Magellan Biosciences	MRX <sup>e</sup> Mikrotiterplatten-Absorptions-Lesegerät
Eppendorf	Zentrifuge 5415D und 5424 Pipetten Thermomixer 5436
GFL	3033 Inkubator 1092 Wasserbad mit Schüttler
Gilson	pipetman P10N, P100N Pipette pipetman P1000, P200, P10 Pipette
Hanna instruments	pH 211 Microprocessor pH-Meter
Heidolph	MR Hei-Standard Heizplatte, mit Magnetrührer Unimax 1010 Plattformschüttler
Heraeus Instruments/ Heraeus Sepatech	Hera Safe Sterilwerkbank Megafuge 1.0R Minifuge RF
Hettich Zentrifugen	Mikro 200
Hitachi	MR-6450 Mikrowelle
IBS Integra Bioscience	Pipetboyacu Pipettierhilfe
Inotech	IH 110 Cell Harvester
Janke & Kunkel IKA	Vibrofix VF1 Electronic Vortex
Labortechnik	
Leitz	DIAVERT Inverses Mikroskop
Liebherr	Premium Kühlschranks,



	-20 °C Comfort Tiefkühlschrank
memmert electronic	ICP 600 Inkubator , U10 Heizschrank
Millipore	Reinstwassersystem
NUAIRE	-80 °C Tiefkühlschrank
Sartorius	Extend Waage
Scotsman	AF100 Eismaschine
Stuart	heat-stir CB162 Heizplatte, mit Magnetrührer
Systemec	V10 Autoklav
The Baker Company	Steril GARD III Advance Sterilwerkbank
Wallac	Filterpapiere für <sup>3</sup> H-Hypoxanthin-Einbautest

### 2.1.3. Chemikalien

AppliChem	Dimethylsulfoxid (DMSO) L-Glutamin (für die Zellkultur) Natriumpyruvat (für die Zellkultur) Penicillin-Streptomycin (100x) (für die Zellkultur) RPMI 1640-Hepes Medium
Biomol	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA),
FLUKA	Lysozym
Gibco	Albumax 2,5 % Trypsin (10x)
Hartmann Analytik	[8- <sup>3</sup> H]Hypoxanthin
Institut für Bioanalytik (IBA)	D-Desthiobiotin-Lösung (10x Puffer E) Strep-Tactin® Sepharose® 50% suspension
Merck	37% Salzsäure (HCl) Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) Ammoniumpersulfat (APS) N`,N`,N`,N`-Tetramethyldiamin (TEMED) Coomassie Brilliant Blue G-250 Kaliumchlorid (KCl)

	Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
	Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )
	Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung
PAA	DMEM mit Glucose, ohne L-Glutamin
	Fetales Kälberserum (FBS)
	MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
Roche	Zell-Proliferations-Reagenz WST-1
Roth	40% Acrylamid-Lösung
	Ethanol 70%, 100 %
	Tris
	Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
	Glycin
	Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )
	Albumin Fraktion V (BSA)
	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)
	Dimethylsulfoxid 99,99% (DMSO)
SERVA	Coomassie Brilliant Blue R-250
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Sigma-Aldrich	2-(4-Hydroxyphenylazo)Benzoessäure (HABA)
	3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (APAD)
	Blasticidin S Deaminase (BSD)
	Chloroquin
	DL-Glycerinaldehyd-3-Phosphat
	D-Ribose 5-phosphat
	L-Glutamatdehydrogenase
	L-Glutamat
	L-Glutamin
	Bromwasserstoff (HBr)
	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	Sorbitol
Wallac	Betaplate Scint Szintillationslösung

### 2.1.4. Verwendete Inhibitoren

In Kooperation mit der Firma European ScreeningPort (Hamburg) wurden im Hochdurchsatzverfahren (*high throughput screen*, HTS) mehr als 250000 Substanzen als mögliche Inhibitoren der Vitamin B<sub>6</sub>-Synthese von *Plasmodium falciparum* getestet. Bei dem durchgeführten HT-Assay handelte es sich um ein auf Fluoreszenz basierendes Pdx2-Aktivitätsassay unter Verwendung von Meerrettichperoxidase (HRP), Glutamatoxidase und Amplex-Red.

Die im HTS-Verfahren identifizierten inhibitorischen Komponenten wurden von verschiedenen Firmen für weitere Tests erneut synthetisiert. Die hier verwendete Reihenfolge der Nummerierung entspricht der Reihenfolge der im Testverfahren nachgewiesenen Potenz der Inhibierung. Wobei Nummer 1 im Hochdurchsatztestverfahren die stärkste Inhibierung der PLP-Synthase zeigte. Bei den Komponenten der Firma Evotec handelt es sich um die Originalsubstanzen aus dem Hochdurchsatztest. Diese haben eine identische Struktur zu den Komponenten 1 bis 10 der Firma Oxeltis. Ebenso sind die Komponenten 14-M und 14-O strukturidentisch. Die Komponenten 1 bis 10 und 14 dienen daher als Qualitätskontrollen.

Die Strukturen der verwendeten Substanzen sind patentrechtlich geschützt. Aus diesem Grund kann in dieser Arbeit nicht näher auf die Strukturen eingegangen werden.

Evotec	Komponenten E1-E10
Molport	Komponenten 14-M - 16, 18 - 20, 22, 23, 27
Oxeltis	Komponenten 1-14-O, 17, 21, 24 - 26
Sigma-Aldrich	Auranofin

### 2.1.5. Zelllinien

ATCC	HepG2
Wellcome Trust, Dundee	3D7
BNI	3D7-PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR 3D7-pARL-BSD-WR

### 2.1.6. Puffer, Medien, Lösungen

#### 2.1.6.1. Zellkulturmedien

##### Medium für HepG2-Zellen

Modifiziertes DMEM-Medium (500 ml)	500 ml DMEM ohne L-Glutamin ( <i>high glucose</i> ) 1% (v/v) MEM NEAA (100x) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x) 10 % (v/v) Fetales Kälberserum (FBS) 100 mM Natriumpyruvat 200 mM L-Glutamin (für die Zellkultur)
------------------------------------	---

##### Medium für *Plasmodium falciparum*

RPMI-Medium (500 ml)	1,59 % (w/v) RPMI + Hapes (A1538 9010) 0,5 % (w/v) Albumax 1 % (w/v) NaHPO <sub>4</sub> 2 % (w/v) D-Glucose 27,2 mg/l Hypoxanthin 20 mg/l Gentamycin (pH 7,4)
----------------------	--

#### 2.1.6.2. Proteinaufreinigung

PMSF	0,1 M PMSF in Isopropanol
Puffer W	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8
Puffer E	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8
Puffer R	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM HABA, pH 8 (mit HCl)

### 2.1.6.3. Bradford-Assay

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

### 2.1.6.4. SDS-Gelelektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) in dH <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig in dH <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	1 g Coomassie Brillant Blue R-250, 100 ml Essigsäure, 450 ml 100 % (v/v) Methanol, ad 1 l dH <sub>2</sub> O
Elektrophoresepuffer	0,1 % SDS (w/v), 192 mM Glycin. 25 mM Tris
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl in 100 ml dH <sub>2</sub> O, pH 6,7
SDS-Probenpuffer (4x)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) DTT, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl in 100 ml dH <sub>2</sub> O, pH 8,9

### 2.1.6.5. Bestimmung der Enzymaktivität

Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid (APAD)	50 mM in dH <sub>2</sub> O
Ammoniumchlorid	100 mM in dH <sub>2</sub> O
Glutamin	100 mM in dH <sub>2</sub> O
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	50 mM in 1 M dH <sub>2</sub> O
HTS-Komponenten	Jeweils 4 mM in DMSO
Puffer W	100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0
Reaktionspuffer 1	50 mM Tris/HCl, pH 8
Reaktionspuffer 2	50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8
Ribose-5-Phosphat	50 mM in dH <sub>2</sub> O

### 2.1.6.6. HepG2-Kulturführung

Trypsin-EDTA-Lösung	0,25 % Trypsin, 0,53 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O
Einfriermedium	90 % FBS, 10 % DMSO

### 2.1.6.7. Kulturführung Plasmodien

Giemsa-Färbelösung	10x Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung 1:10 in dH <sub>2</sub> O
HT-PBS	16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 126 mM NaCl, pH 7,2
Sorbitol	5 %, bzw. 27 % (w/v) in HT-PBS
Glycerin	30 % (w/v) Glycerin in HT-PBS
Blasticidin S	1 mg/ml in 50 % Ethanol
WR99210	Stammlösung (20 mM): WR99210 in 1 ml DMSO Arbeitslösung (5 µM): Stammlösung 1:4000 in RPMI 1640-Medium

### 2.1.6.8. H<sup>3</sup>-Hypoxanthin-Einbautests

[8- <sup>3</sup> H]Hypoxanthin	Stocklösung: 1 mCi/ml in dH <sub>2</sub> O Arbeitslösung: 1 µCi/ml in dH <sub>2</sub> O
Chloroquin	Stocklösung: 20 µM in DMSO

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Proteinaufreinigung über einen Strep-Tag

Die zur Verfügung gestellten plasmodialen Enzyme Pdx1 und Pdx2 wurden rekombinant in *E. coli* BLR DE3 exprimiert. Die Kulturen wurden abzentrifugiert und die Pellets wurden für die spätere Aufreinigung mittels Strep-Tag in 20 ml Puffer W resuspendiert und eingefroren.

Das bei -20 °C gelagerte Bakterienpellet wurde im Wasserbad aufgetaut, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und für 10 Minuten, rollend, bei Raumtemperatur inkubiert. Lysozym hydrolysiert die  $\beta(1-4)$ -glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäureresten im Peptidoglykan der bakteriellen Zellwand. Anschließend wurde Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 0,1 M) im Verhältnis 1:1000 zugegeben, um zu verhindern, dass die vorliegenden Proteine durch Proteasen abgebaut werden. Um die Zellen aufzuschließen, wurden sie für 10 Minuten bei 40 kHz mit Ultraschall behandelt. Um der starken Wärmeentwicklung entgegenzuwirken, geschah dies auf Eis. Danach wurde das Zelllysate für 50 Minuten bei 50000 x g zentrifugiert. Die im Überstand vorliegenden Proteine wurden anschließend in ein Falconröhrchen überführt.

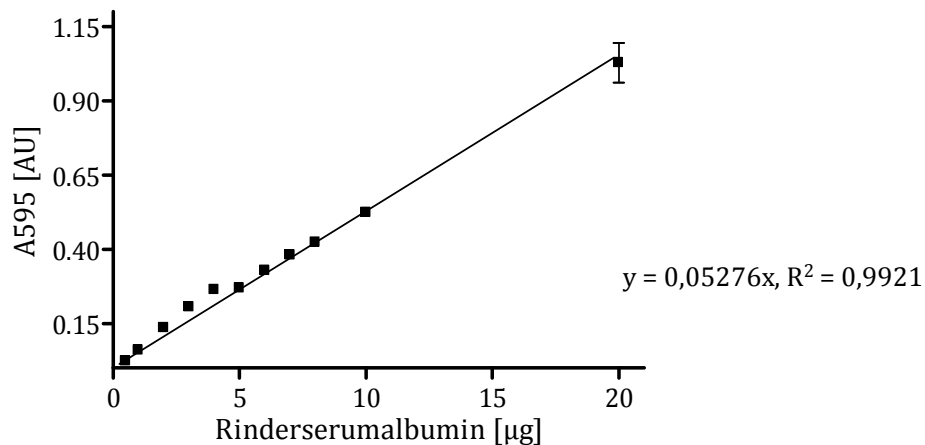
Die aufzureinigenden Proteine *PfPdx1* und *PfPdx2* wurden zuvor mit einem Strep-Tag markiert [Müller *et al.*, 2008]. Die Strep-Tag-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe einer Step-Tactin-Sepharose-Matrix (IBA). 2 - 3 ml dieser Matrix wurden in eine Leersäule gegeben und mit Puffer W äquilibriert. Anschließend wurde der Zentrifugationsüberstand 3-mal auf die Säule aufgetragen. Die mit einem Strep-Tag markierten Proteine werden an der Matrix immobilisiert und durch einen Waschschrift mit 3 Säulenvolumen (CV) Puffer W wurden zelleigene Proteine ohne Strep-Tag von der Säule gewaschen. Die Elution der über den Strep-Tag an das Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgte mit 2 ml Puffer E, die mehrmals über die Säule gegeben wurden. Dieser enthält Desthiobiotin, welches mit den Strep-markierten Proteinen um die Bindungsstellen der Strep-Tactin-Matrix konkurriert, wodurch die Proteine von der Matrix verdrängt werden und im Eluat gelöst vorliegen. Der Fluss über die Säule ist durch Gravitation bedingt.

Zum Schluss wurde das Säulenmaterial mit 1 CV HABA-Puffer regeneriert, wodurch Desthiobiotin verdrängt wird und mit 3 CV Puffer W gewaschen. Für die Proteinquantifizierung wurde ein Bradford-Assay durchgeführt.

### 2.2.2 Protein-Quantifizierung nach Bradford (1976)

Für die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Proteins wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Der Nachweis beruht auf der Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm [Bradford, 1976].

Im Assay wurden 5 µl Eluat mit 95 µl Puffer E und 1000 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Absorption wurde photometrisch bei 595 nm gegen einen Leerwert aus 100 µl Puffer E und 1000 µl Bradford-Reagenz bestimmt. Die Gesamtproteinmenge konnte dann anhand der Steigung einer Regressionsgeraden (siehe Abbildung 8) berechnet werden.



**Abbildung 8: Regressionsgerade zur Protein-Quantifizierung mittels Bradford-Assay.**

Für die Erstellung der Geraden wurden Proteinmengen im Bereich zwischen 1 und 10 µg Rinderserumalbumin (BSA) wie oben beschrieben mit Puffer und Bradford-Reagenz versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Geradengleichung lautet  $y = 0,05276x$  und  $R^2$  beträgt 0,9921.



### 2.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Da die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) lediglich die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge ermöglicht, wurde der Erfolg der Proteinaufreinigung zusätzlich mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Diese Methode beruht auf der Trennung verschiedener Moleküle anhand ihrer Massen in einem elektrischen Feld [Laemmli, 1970].

Es wurde mit einem 10 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel gearbeitet (siehe Tabelle 2). Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug 5 - 20 µg. Die Proteinlösung wurde mit 0,25 Vol. % SDS-Ladepuffer versetzt, 10 Minuten bei 99 °C, anschließend 5 Minuten auf Eis inkubiert und abschließend für 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des verwendeten Trenn- und Sammelgels**

	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
Trenngelpuffer/Sammelgelpuffer	1500 µl	1000 µl
Destilliertes Wasser	3000 µl	2490 µl
40 % Acrylamid	1500 µl	500 µl
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	60 µl	40 µl
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	25 µl	20 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 µl	10 µl

Die vorbereiteten Proteinproben wurden auf das SDS-Gel aufgetragen und der Gellauf erfolgte bei einer Stromstärke von 35 mA/Gel.

Die Färbung des Gels erfolgte anschließend unter leichtem Schwenken in Coomassie-Färbelösung für mindestens 30 Minuten. Danach wurde das Gel in Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteinbanden ausreichend sichtbar wurden.

### 2.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität

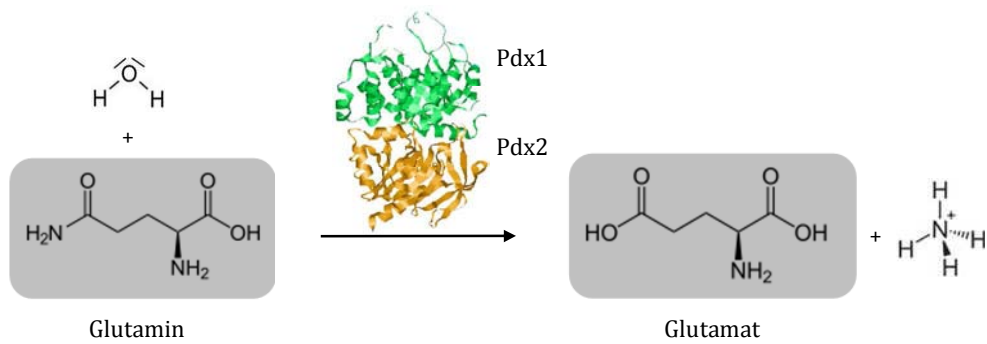
#### 2.2.4.1 Glutaminase-Aktivitätsassay nach Dong *et al.* (2004)

Der Nachweis der Glutaminase-Aktivität beruht auf zwei nacheinander ablaufenden Reaktionen (Abbildung 9). Die erste Reaktion ist der Umsatz von Glutamin zu Glutamat durch das Enzym Pdx2. Da Pdx2 in Abwesenheit von Pdx1 keine Aktivität zeigt, wurden für diesen Versuch beide Enzyme 1:1 eingesetzt. Diese Reaktion wird nach einer gewissen Zeit durch das Denaturieren des Enzyms gestoppt. Anschließend werden ein zweites Enzym, Glutamat-Dehydrogenase (GDH), und Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid (APAD) als Cosubstrat hinzugefügt. Glutamat wird zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgesetzt, APAD wird zu APADH reduziert, welches photometrisch bei 363 nm detektiert werden kann.

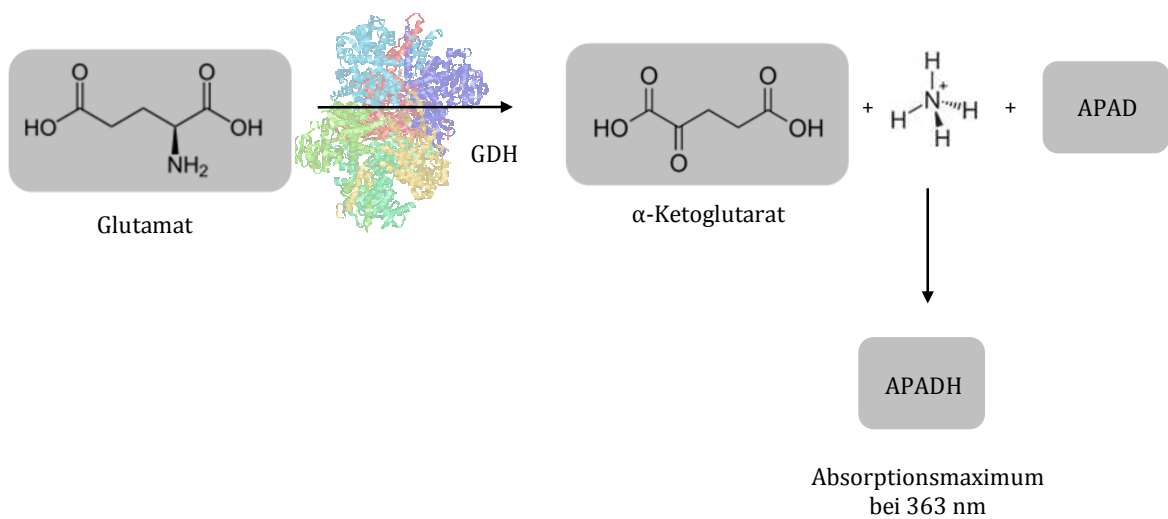
Die Bestimmung der Pdx2-Aktivität erfolgte jeweils im Doppelansatz. Es wurden 80  $\mu$ M der HTS-Komponente, 10 mM Glutamin und je 15  $\mu$ g ( $\triangleq$  50  $\mu$ g/ml) Pdx1 und Pdx2 eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit Reaktionspuffer 1 auf ein Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l aufgefüllt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Glutaminase-Reaktion zu stoppen wurden Pdx1 und Pdx2 für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für etwa 3 Minuten auf Eis gekühlt. Es wurden 0,5 mM APAD und 4,6 U GDH zugegeben und mit Reaktionspuffer 2 auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden erneut für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert und bei 16000 x g für 3 Minuten zentrifugiert.

Um die Pdx2-Aktivität zu messen, wurden zum Schluss Absorptionsspektren mit Hilfe eines Photometers aufgenommen. Dies geschah in einem Bereich von 250 bis 450 nm. Es wurden die Reaktionsansätze und jeweils eine Negativkontrolle vermessen, die kein Enzym, jedoch die HTS-Komponente enthielt, um eine eventuell auftretende Eigenabsorption der Komponenten bei der Messung berücksichtigen zu können. Es wurde ebenfalls immer ein Reaktionsansatz ohne HTS-Komponente vermessen, der als Positivkontrolle diente. Das Absorptionsmaximum von APADH ist bei vorliegender Pdx2-Aktivität als Hochpunkt bei 363 nm zu detektieren. Der nicht inhibierte Umsatz von Glutamin zu Glutamat der Positivkontrolle wurde für die nachfolgende Auswertung als 100 % Aktivität des Pdx2-Moleküls definiert.

Reaktion 1:



Reaktion 2:



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Pdx2-Aktivitätsassays nach Dong *et al.* (2004).**

Der Assay setzt sich aus zwei grundlegenden Schritten zusammen. Zum einen aus dem Umsatz von Glutamin zu Glutamat durch Pdx2 und zum anderen aus der Reduzierung von APAD zu APADH. Da Pdx2 ohne Pdx1 nicht aktiv ist, wurden im Assay beide Enzyme im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Die spezifische Aktivität von Pdx2 (Formel 3) lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Formel 1) und des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  für APADH von 8900 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> berechnen.

$$A_{636 \text{ nm}} = \text{Glutamat [M]} \cdot \epsilon [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}] \quad \text{Formel 1}$$

$$\text{Glutamat [nmol/ml]} = \frac{A_{363 \text{ nm}}}{8900 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}]} \cdot 10^6 \quad \text{Formel 2}$$

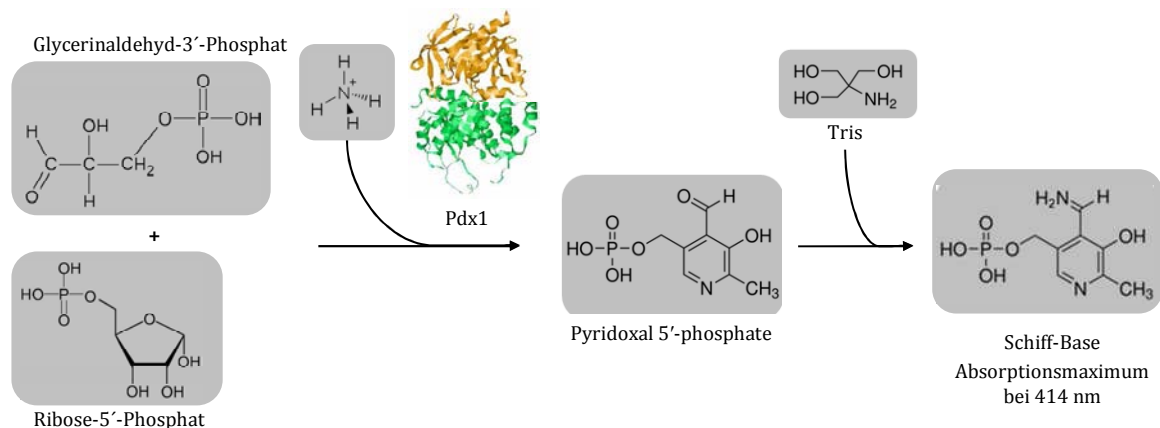
$$\text{Spezif. Aktivität [nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{\text{Glutamat [nmol/ml]} \cdot V [\text{ml}]}{t [\text{min}] \cdot c_{\text{Pdx2}} [\text{mg}]} \quad \text{Formel 3}$$

Für die Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden die oben beschriebenen Reaktionsansätze mit aufsteigenden Konzentrationen der entsprechenden HTS-Komponenten versetzt. Die Maximalkonzentrationen lagen bei 1280 µM, 640 µM und 160 µM.

Um sicherzustellen, dass die GDH nicht durch die HTS-Komponenten beeinflusst wird, wurden Reaktionsansätze mit 1 nM Glutamat, 0,5 mM APAD und 4,6 U GDH für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 363 nm im Photometer vermessen.

#### 2.2.4.2 Pdx1-Aktivitätsassay nach Müller *et al.* (2008)

Um die Aktivität des Pdx1 zu untersuchen, werden in diesem Test die notwendigen Substrate für die PLP-Synthese, Glycerinaldehyd-3'-Phosphat (G3P) und Ribose-5'-Phosphat, jedoch kein Glutamin verwendet. Da für die PLP-Synthese eine Stickstoffquelle benötigt wird, wird Glutamin durch Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) ersetzt. Pdx1 synthetisiert PLP und dieses bildet anschließend mit dem im Reaktionspuffer enthaltenen Tris eine Schiff-Base und somit eine Chromophore aus, die bei 414 nm photometrisch bestimmt werden kann.



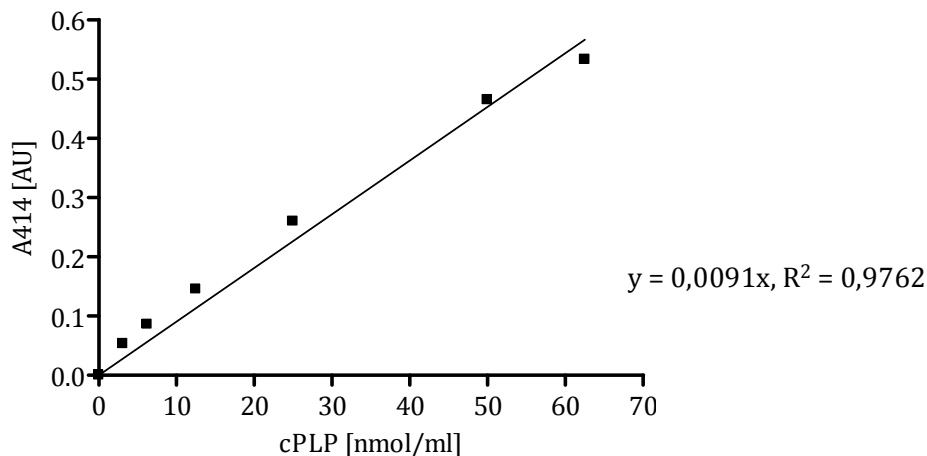
**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Pdx1-Aktivitätsassays mit Ammoniumchlorid nach Müller *et al.* (2008).**

Es wird die Aktivität des Pdx1 untersucht. Dieses synthetisiert aus G3P, R5P und NH<sub>4</sub>Cl PLP. Im nachfolgenden Reaktionsschritt reagiert das gebildete PLP mit dem im Reaktionspuffer befindlichen Tris und bildet eine Schiff-Base aus.

Wie schon die Bestimmung der Pdx2-Aktivität erfolgte auch die Bestimmung der Pdx1-Aktivität immer im Doppelansatz. 200  $\mu\text{g}$  ( $\triangleq$  800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Pdx1 wurden mit 80  $\mu\text{M}$  HTS-Komponente, 0,5 mM R5P, 0,5 mM G3P, 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 100 mM Puffer W versetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 250  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, 2 Stunden bei 37  $^\circ\text{C}$  inkubiert und für 3 Minuten bei 16000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurden Absorptionsspektren im Bereich von 250 bis 500 nm aufgenommen. Dabei wurden wie zuvor eine Negativkontrolle ohne Enzym, jedoch mit der HTS-Komponente und der Reaktionsansatz vermessen.

Auch hier wurde auf diese Weise versucht eine eventuell auftretende Eigenabsorption zu berücksichtigen. Es wurde weiterhin zum Vergleich eine Positivkontrolle ohne HTS-Komponente vermessen. Im Absorptionsspektrum zeigt sich bei ungehemmter Pdx1-Aktivität ein Hochpunkt bei 414 nm, was dem Absorptionsmaximum des gebildeten Chromophors entspricht und ein kleineres Maximum bei 320 nm, der einer PLP-Vorstufe entspricht.

Die Quantifizierung des gebildeten PLP erfolgte anhand der in Abbildung 11 gezeigten Eichgeraden und der sich daraus ergebenden Formel 4. Die spezifische Aktivität des Pdx1 konnte anschließend mit Formel 5 berechnet werden. Die Menge an gebildetem PLP in der Positivkontrolle wurde in der späteren Auswertung als 100 % Aktivität des Pdx1-Moleküls festgelegt.



**Abbildung 11: Regressionsgerade zur Quantifizierung der synthetisierten PLP-Menge.**

Für die Erstellung der Regressionsgeraden wurde PLP im Bereich zwischen 0 und 60 nmol mit 100 mM Puffer W versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 414 nm bestimmt. Die sich ergebende Geradengleichung lautet  $y = 0,0091x$  und  $R^2$  beträgt 0,9762.

$$\text{PLP [nmol/ml]} = \frac{A_{414 \text{ nm}}}{0,0091} \quad \text{Formel 4}$$

$$\text{Spezif. Aktivität [nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{\text{PLP [nmol/ml]} \cdot V [\text{ml}]}{t [\text{min}] \cdot c_{\text{Pdx1}} [\text{mg}]} \quad \text{Formel 5}$$

Für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurden die oben beschriebenen Reaktionsansätze mit aufsteigenden Konzentrationen der entsprechenden HTS-Komponenten versetzt. Die Maximalkonzentrationen lagen bei 1280  $\mu\text{M}$  und 640  $\mu\text{M}$ .

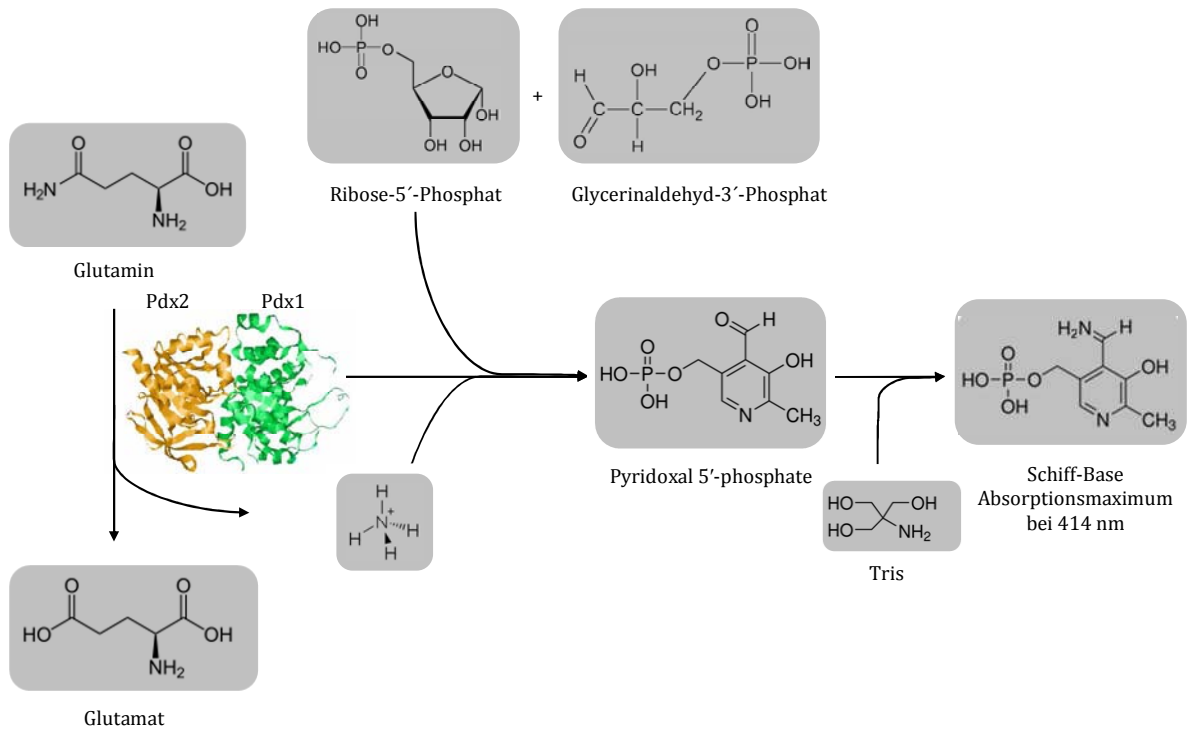
#### 2.2.4.3 PLP-Synthase-Aktivitätsassay nach Müller *et al.* (2008)

Um die Aktivität der gesamten PLP-Synthase zu bestimmen, wurden Pdx1 und Pdx2 sowie alle an der Synthese beteiligten Substrate (R5P, G3P, Glutamin) zum Reaktionsansatz gegeben. Die Detektion erfolgt wie auch schon im Pdx1-Aktivitätsassay im Photometer bei 414 nm.

Es wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  ( $\triangleq$  400  $\mu\text{g/ml}$ ) Pdx1 und Pdx2 (1:1), 80  $\mu\text{M}$  HTS-Komponente, 10 mM Glutamin, 0,5 mM R5P, 0,5 mM G3P und 100 mM Puffer W gemischt und der Reaktionsansatz wurde mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 250  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37  $^\circ\text{C}$  wurde der Reaktionsansatz für 3 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Absorption bei 414 nm im Photometer bestimmt. Dies geschah wie zuvor beschrieben, durch das Aufzeichnen von Absorptionsspektren in einem Bereich von 250 bis 500 nm.

Es wurde jeweils mit Doppelansätzen gearbeitet. Es wurde neben dem Reaktionsansatz eine Negativkontrolle ohne Enzym, jedoch mit der HTS-Komponente vermessen. Um eine Inhibierung feststellen zu können, wurde weiterhin eine Positivkontrolle ohne HTS-Komponente vermessen.

Auch in diesem Fall erfolgte die Bestimmung der Menge an gebildeten PLP anhand der in Abbildung 11 gezeigten Eichgeraden und der sich daraus ergebenden Formel 4. Die spezifische Aktivität der PLP-Synthase wurde anschließend mit Formel 5 berechnet. Die Menge an gebildeten PLP in der Positivkontrolle wurde als 100 % Aktivität der PLP-Synthase festgelegt.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des Tests für die vollständige PLP-Synthese-Reaktion nach Müller *et al.* (2008).**

Pdx2 spaltet Glutamin zu Glutamat und Ammonium. Das Ammonium dient neben GAP und R5P als Substrat für die PLP-Synthese-Reaktion durch Pdx1. Über die Reaktion von gebildetem PLP mit dem im Reaktionspuffer enthaltenem Tris zu einer Schiff-Base, kann die Menge an gebildetem PLP mit Hilfe einer Eichgeraden quantifiziert werden.

#### 2.2.4.4 Statistische Beurteilung der Signifikanz und Erstellen von Dosis-Wirkungskurven

Bei der Aktivitätsbestimmung der Enzyme für die *de novo* Synthese des PLP wurden die Werte für den Substratumsatz der ungehemmten Reaktionsansätze jeweils als 100 % Enzymaktivität definiert. Der Substratumsatz der mit den zu untersuchenden Komponenten versetzten Reaktionsansätze wurde jeweils als Prozentwert bezogen auf den Umsatz der Positivkontrolle angegeben.

Um die statistische Signifikanz der Inhibierung beurteilen zu können, wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4 ein t-Test durchgeführt (*one sample t test*). Dabei wird der Mittelwert einer Datenmenge mit einem theoretisch festgelegten Wert (hier: 100 % Aktivität) verglichen.

Über die Formel 6 berechnet die Software einen t-Wert. Anhand des t-Wertes und der Menge der Freiheitsgrade wird anschließend der p-Wert ermittelt.

$$t = \frac{\text{Mittelwert der Datenmenge} - 100 \% \text{ Aktivität}}{\text{Standardabweichung}} \quad \text{Formel 6}$$

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde die Aktivität über die logarithmierte Konzentration der untersuchten Komponente aufgetragen. Mit Hilfe einer nicht-linearen Regression in GraphPad Prism 4 (*sigmoidal dose response (variable slope)*) konnte anschließend die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>-Wert) der Substanzen ermittelt werden.

### 2.2.5 Kulturführung von HepG2-Zellen

Um eine eventuelle Zytotoxizität der HTS-Komponenten untersuchen zu können, wurde mit einer humanen Hepatom-Zelllinie (HepG2) gearbeitet. HepG2-Zellen wurden 1975 aus dem Lebertumorgewebe eines 15 jährigen Argentiniers isoliert. Sie wachsen adhärent, epithelartig als einzelne Zellschicht. Die Zellen zeigen über einen längeren Zeitraum eine hohe morphologische Stabilität und ihre Verdopplungszeit liegt zwischen 48 und 60 Stunden [Aden *et al.*, 1979; Knowles *et al.*, 1980; Knowles & Aden, 1983].

Die HepG2-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen für adhärente Zellen (75 cm<sup>2</sup>, Sarstedt) mit modifiziertem DMEM-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 oder 1:20 verdünnt. Bei geringer Zellzahl wurde lediglich ein Medienwechsel durchgeführt.

HepG2-Zellen wachsen als einschichtiger Zellrasen (*cell monolayer*) am Boden der Kulturflasche. Um sie verdünnen oder ernten zu können, müssen sie zunächst vom Boden abgelöst werden. Dafür wurde das gesamte Medium vorsichtig abgenommen, anschließend wurden 2 ml einer vorgewärmten 0,25 % Trypsin-0,53 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-Lösung) zugegeben und die Zellen wurden bei 37 °C für 2 bis maximal 10 Minuten inkubiert. EDTA löst die Zell-Zell-Verbindungen und Trypsin löst Zell-Matrix-Verbindungen.



Unter einem inversen Mikroskop wurde kontrolliert, ob sich alle Zellen vom Boden und voneinander abgelöst haben. Die Reaktion wurde mit 8 ml warmen Medium gestoppt. Zum Schluss wurden 1 ml (1:10-Verdünnung) bzw. 0,5 ml (1:20-Verdünnung) der Zellsuspension mit ca. 20 ml Medium in eine neue Flasche gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Mit dem restlichen Zellmaterial wurden Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Da für diese eine definierte Zellzahl benötigt wurde, mussten die Zellen zunächst gezählt werden. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei maximal 700 x g zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden entsprechend der vorliegenden Zellzahl verdünnt und resuspendiert.

### 2.2.6 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Nachdem die oben beschriebene Trypsinierungsreaktion gestoppt wurde, wurde eine Probe für die Zellzahlbestimmung genommen. Diese erfolgte mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer. Es wurden mindestens 4 Großquadrate (GQ) ausgezählt und die Zellzahl mit der nachfolgenden Formel 7 berechnet.

$$\text{Zellzahl [Zellen/ml]} = \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl der GQ}} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad \text{Formel 7}$$

### 2.2.7 Einfrieren von HepG2-Zellen

Vor dem Einfrieren der Zellen, mussten diese mit einer 0,25 % Trypsin - 0,53 mM EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst werden. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die geernteten Zellen wurden für 5 Minuten bei maximal 700 x g pelletiert. Das überstehende Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden in Einfriermedium resuspendiert und auf eine Zellzahl von ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml verdünnt. Das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) soll die Bildung von Eiskristallen verhindern.

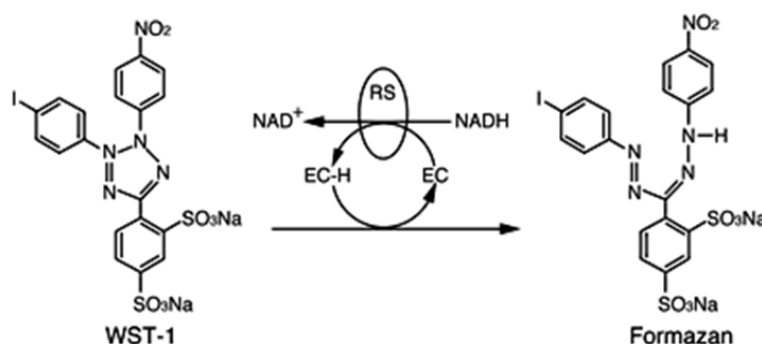
Die Zellen wurden in ein Kryo-Röhrchen überführt und für 24 Stunden bei -80 °C in einer Styroporbox gelagert um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten und somit die Bildung von Eiskristallen zu vermindern. Nach 24 Stunden wurden die Kryo-Röhrchen für die weitere Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 2.2.8 Auftauen von HepG2-Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Danach wurden sie in 20 ml vorgewärmtes modifiziertes DMEM-Medium gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach spätestens 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Medienwechsel. Um die zytotoxische Wirkung des DMSO zu minimieren, müssen das Auftauen und die Zugabe von frischem Medium möglichst schnell erfolgen.

### 2.2.9 Bestimmen der Zytotoxizität mit HepG2-Zellen

Die Bio-reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-1 zu Formazan ist von der glykolytischen Produktion von NAD(P)H in vitalen Zellen abhängig.



**Abbildung 13: Spaltung des Tetrazolium-Salzes (WST-1) zu Formazan.**

RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System;

EC = Elektronenkopplungsreagenz

([http://www.roche-applied-science.com/sis/geneknockdown/index.jsp?id=cell proliferation&fol=functional\\_assays](http://www.roche-applied-science.com/sis/geneknockdown/index.jsp?id=cell%20proliferation&fol=functional_assays), © 1996-2012 Roche Diagnostics, 13.11.2012)

Die Spaltung findet hauptsächlich extrazellulär und an der Zelloberfläche durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System statt [Berridge *et al.*, 1996]. Formazan kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert werden. Da nur metabolisch aktive Zellen NAD(P)H produzieren und damit die Bio-reduktion durchführen können, korreliert die Absorption des Formazans direkt mit der Lebendzellzahl.

Die Bestimmung der Zytotoxizität der HTS-Komponenten auf HepG2-Zellen wurde in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden 50 µl Zellsuspension ( $1 \cdot 10^4$  Zellen), 50 µl Medium und die jeweilige HTS-Komponente in 3-facher Bestimmung im Bereich von 3,125 µM bis 400 µM eingesetzt. Bei den Komponenten E4 und E7 wurde im Konzentrationsbereich von 1,563 µM bis 200 µM und bei den Komponenten E1-E3, E5, E6, E8-E10 im Bereich von 0,781 µM bis 100 µM gearbeitet. Zusätzlich wurden zwei Positivkontrollen mit  $1 \cdot 10^4$  Zellen/50 µl und 50 µl Medium, sowie zwei Negativkontrollen, einmal mit 100 µl Medium und 400 µM HTS-Komponente, bzw. 200 µM und 100 µM und einmal lediglich 100 µl Medium mitgeführt. Dies war nötig, um eine eventuell auftretende Eigenabsorption der getesteten Substanzen berücksichtigen zu können. Die Mikrotiterplatten wurden 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde in jede Vertiefung 10 µl WST-1-Fertiglösung gegeben. Die Platten wurden für 4 Stunden erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend wurde die Absorption mit einem MRX<sup>e</sup>-Lesegerät für Mikrotiterplatten (Dynex Magellan Biosciences) bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt.

Die Absorption der mitgeführten Positivkontrolle wurde jeweils als 100 % Viabilität definiert. Im Zuge der statistischen Auswertung wurden aus den Einzelwerten der Dreifachbestimmung jeweils die Mittelwerte berechnet. Anschließend wurden die Mittelwerte bezogen auf die Positivkontrolle in Prozentwerte umgerechnet. In GraphPad Prism 4 wurden die Prozentwerte für die Viabilität über die Konzentration der getesteten Substanz aufgetragen. Durch das Logarithmieren der Inhibitorkonzentration erhält man eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve und die Software kann einen IC<sub>50</sub>-Wert berechnen.

### 2.2.10 Kulturführung von *Plasmodium falciparum*

Die Kulturführung erfolgte in Petrischalen (Ø 60 mm oder 92 mm, Nunc) oder in Flaschen (150 cm<sup>2</sup>, TPP) mit RPMI 1640-Medium und humanem Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0<sup>+</sup>. Der Hämatokrit betrug etwa 4 %. Die Parasitenkultur wurde alle 2 Tage im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 auf ca. 1 % Parasitämie verdünnt. Bei geringem Wachstum wurde lediglich ein Medienwechsel durchgeführt. Die Parasitenkultur wurde bei 37 °C und unter sauerstoffarmer Atmosphäre (5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % N<sub>2</sub>) inkubiert [Trager und Jensen, 1976; Jensen und Trager, 1977].

### 2.2.11 Bestimmung der Parasitämie einer Plasmodien-Kultur

Um die Parasitämie bestimmen zu können, wurden Blutausstriche auf Objektträgern angefertigt. Diese wurden für 10 - 20 Sekunden mit Methanol fixiert und für 20 - 30 Minuten mit Giemsa-Lösung (10 % in dH<sub>2</sub>O) gefärbt. Nach der Färbung wurden die Ausstriche mit Leitungswasser abgespült, getrocknet und bei 1000-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet.

Für die Bestimmung der Parasitämie wurden mindestens 500 Erythrozyten gezählt und der Anteil der infizierten Erythrozyten mit Formel 8 berechnet.

$$\text{Parasitämie [\%]} = \frac{\text{Anzahl infizierter Erythrozyten} \cdot 100 \text{ \%}}{\text{Gesamtzahl der gezählten Erythrozyten}} \quad \text{Formel 8}$$

### 2.2.12 Einfrieren von Plasmodien

Um die Plasmodien-Kultur einfrieren zu können, sollte diese mindestens 3 % Parasiten im Ringstadium beinhalten. Es wurde zunächst ein Medienwechsel durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1500 rpm (Heraeus Minifuge RF). Der Überstand wurde bis auf ein Pelletvolumen des Kulturmediums abgenommen und in zwei Pelletvolumen 30 % Glycerin (in HT-PBS) resuspendiert. Zum Schluss wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lagerung der Plasmodienstabile erfolgt in flüssigem Stickstoff.

### 2.2.13 Auftauen von Plasmodien

Die ebenfalls in flüssigem Stickstoff gelagerten Plasmodien wurden im Wasserbad unter leichtem Schwenken bei 37 °C aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden sie in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und es wurde das doppelte Volumen an gekühltem 27 %igem Sorbitol (in HT-PBS) tropfenweise und unter leichtem Schütteln zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das doppelte Volumen an gekühltem 5 %igem Sorbitol wie oben beschrieben zugegeben und es erfolgte ein weiterer 5 minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 1200 rpm (Heraeus Minifuge RF) zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Petrischale überführt. In Abhängigkeit von der Größe des Zellpellets wurden 200 - 400 µl frische Erythrozyten zugegeben, und die Kultur wurde bei 37 °C unter sauerstoffarmer Atmosphäre inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgte ein Medienwechsel.

### 2.2.14 Synchronisieren einer Plasmodien-Kultur

Die Plasmodien-Kultur wird bei einer Parasitämie von mindestens 5 %, wenn sie überwiegend Parasiten im Ringstadium aufweist, für 5 Minuten bei 1200 rpm (Heraeus Minifuge RF) und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und es werden 5 Pelletvolumen 5 %iges Sorbitol (in HT-PBS) zugegeben. Während der 5 minütigen Inkubation bei 37 °C diffundiert das Sorbitol in die, mit Schizonten- bzw. Trophozoiten, infizierten Erythrozyten. Durch den entstehenden osmotischen Druck werden diese Zellen lysiert. Da der Parasit im Ringstadium noch keine Kanäle in der Wirtszelle ausgebildet hat, überlebt dieses Stadium den osmotischen Druck [Lambros & Vanderberg, 1979]. Im Anschluss an die Inkubation wird die Plasmodien-Kultur ein weiteres Mal für 5 Minuten bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert und das entstehende Pellet wird in Kulturmedium resuspendiert und gewaschen. Nach erneutem zentrifugieren bei 1200 rpm wird das Pellet in frisches Medium aufgenommen und in eine Petrischale überführt.

### 2.2.15 Bestimmung des IC<sub>50</sub> der HTS-Komponenten über den Einbau von radioaktiv-markiertem Hypoxanthin

*Plasmodium falciparum* ist nicht in der Lage Purine, die es für die Nukleotidsynthese und damit für u. a. Zellteilung und DNA-Replikation benötigt, *de novo* zu synthetisieren. Es ist daher darauf angewiesen Hypoxanthin aus dem Kulturmedium aufzunehmen. Durch die Verwendung von radioaktiv-markiertem Hypoxanthin kann dessen Einbau in die DNA, bzw. RNA des Parasiten quantifiziert werden. Der Einbau des <sup>3</sup>H-Hypoxanthins korreliert dabei direkt mit der metabolischen Aktivität und dem Wachstumsvermögen der Plasmodien. Aus diesem Grund kann man durch die Zugabe einer zu testenden Substanz zur Plasmodien-Kultur über den Einbau des <sup>3</sup>H-Hypoxanthins die inhibitorische Wirkung der Substanz ermitteln [Desjardins *et al.*, 1979].

Der Test wurde in 96-Well Mikrotiterplatten, mit Hypoxanthin-freiem RPMI 1640-Medium, bei 2 % Hämatokrit und 1 % Parasitämie (überwiegend im Ringstadium) durchgeführt. Zu Beginn wurden die Plasmodien in Hypoxanthin-freiem RPMI 1640-Medium gewaschen, um das vorhandene Hypoxanthin zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl Medium, 100 µl Zellsuspension und die zu testende Komponente in einem Konzentrationsbereich von 100 µM bis 0,195 µM eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit 100 µl Medium und 100 µl Zellen mitgeführt. Die Plasmodien wurden 24 Stunden bei 37 °C und unter sauerstoffarmer Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 10 µl <sup>3</sup>H-Hypoxanthin (10 µCi/ml) zugegeben. Die Plasmodien wurden weitere 24 Stunden inkubiert und anschließend bei - 20 °C eingefroren um den Test zu stoppen. Danach wurden die Plasmodien mit Hilfe des Inotech IH110 Cell Harvester über Vakuum auf eine Filtermatte übertragen. Das Filterpapier wurde 20 Minuten bei 80 °C getrocknet, anschließend eingeschweißt und gleichmäßig mit 4 ml Betaplate Scint Szintillationsflüssigkeit versehen.

Die Messung der Menge an radioaktivem Hypoxanthin erfolgte mit Hilfe eines Trilux Liquid Scintillation Counters (Wallac). Jede Konzentration der zu testenden Substanz wurde mindestens drei Mal in dreifachem Ansatz getestet. Als Qualitätskontrolle wurde Chloroquin (100 nM bis 0,391 nM) mitgeführt.

Die Anzahl der *Counts* (cpm) der Positivkontrolle ohne Inhibitor wurde als 100 % Viabilität definiert. Die statistische Auswertung erfolgte analog zur Auswertung der Zytotoxizitätsassays in GraphPad Prism 4 durch die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven und der Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte.

### 2.2.16 Erstellen einer Wachstumskurve

Für die Erstellung einer Wachstumskurve für die Plasmodienstämme 3D7-*PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR* und 3D7-*pARL-BSD-WR* wurden jeweils 5 ml Plasmodien-Kultur (4 % Hämatokrit) in RPMI 1640-Medium in Petrischalen (Nunc, Ø 60 mm) kultiviert. Um den Effekt von Auranofin auf das Wachstum der Parasiten über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, wurden 0,2 µM Auranofin zur Kultur gegeben. Die Kulturen wurden jeden Tag auf 1 % Parasitämie verdünnt und mit frischem Auranofin versetzt.

Die Startparasitämie betrug 1 %. Es wurden, über einen Zeitraum von 5 Tagen, alle 24 Stunden Blutausstriche angefertigt, mit Giemsa-Lösung (10 % in dH<sub>2</sub>O) eingefärbt und unter einem Immersionsmikroskop (Axioskop 20) bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt. Mit Formel 8 unter Berücksichtigung der täglichen Verdünnungsschritte wurde die kumulative Parasitämie berechnet.

Anschließend wurde diese logarithmiert und über die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe von GraphPad Prism 4 wurde anschließend eine lineare Regression durchgeführt.

Die Software kann keine Kovarianzanalyse (ANCOVA) durchführen, allerdings kann sie Regressionsgeraden miteinander vergleichen. Diese Methode ist äquivalent zur Durchführung einer ANCOVA. Dabei werden Anstiege und Achsenabschnitte/Schnittpunkte (*intercepts*) der Geraden miteinander verglichen. Es wird ein p-Wert berechnet, der als Maß dafür dient, ob sich die Geraden signifikant voneinander unterscheiden.

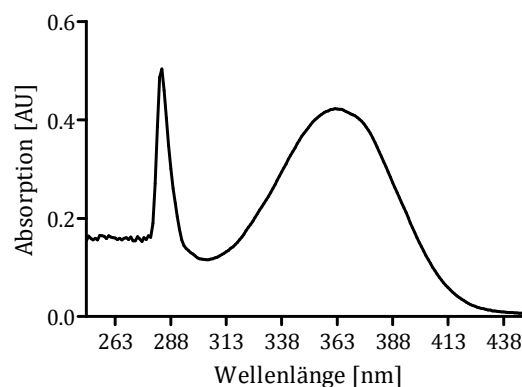
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bestimmung der inhibitorischen Wirkung der HTS-Komponenten auf die Enzymaktivität von *PfPdx1* und *PfPdx2*

Die ausgewählten Komponenten sollten anhand der nachfolgend dargestellten drei Enzymassays untersucht und hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf *PfPdx1*, *PfPdx2* und die PLP-Synthase evaluiert werden.

##### 3.1.1. Inhibierung der Glutaminase-Aktivität (*PfPdx2*-Aktivität)

Um die inhibitorische Wirkung der Komponenten auf das *PfPdx2*-Molekül zu untersuchen, wurde ein Glutaminase-Aktivitätsassay nach Dong *et al.* (2004) durchgeführt. Dies beruht auf dem Umsatz von Glutamin zu Glutamat durch *PfPdx2* und dem anschließenden Umsatz des Glutamats zu  $\alpha$ -Ketoglutarat durch das Hilfsenzym Glutamat-Dehydrogenase und der Reduktion von APAD zu APADH. Die spezifische Aktivität des ungehemmten *PfPdx2*-Moleküls betrug  $145,5 \pm 27,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . In Abbildung 14 ist das Absorptionsspektrum der *Pdx2*-Reaktion ohne Inhibitor dargestellt. Es ist ein deutlicher Peak bei 363 nm, dem Absorptionsmaximum des APADH, zu erkennen. Ein zweiter Peak liegt bei 280 nm und entspricht der Absorption der Enzyms GDH.

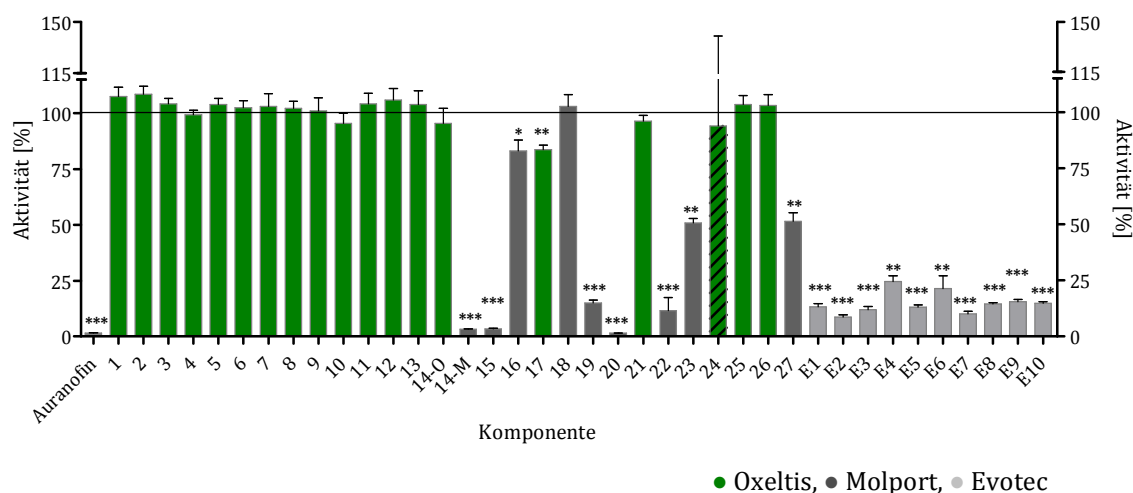


**Abbildung 14: Exemplarisches Absorptionsspektrum der ungehemmten *PfPdx2*-Reaktion im Bereich von 250 bis 450 nm.**

Standard-Glutaminase-Aktivitätsassay mit *Pdx2* und *Pdx1* und ohne inhibierende Substanzen, das Absorptionsmaximum liegt bei 363 nm (n = 3).



In der nachfolgenden Grafik ist die Restaktivität des *PfPdx2* in Abhängigkeit der zugefügten HTS-Komponente (80  $\mu$ M) dargestellt.



**Abbildung 15: *PfPdx2*-Aktivität im Glutaminase-Aktivitätsassay unter Einfluss der getesteten Komponenten 1 bis 27, E1 bis E10 und Aurano-fin.**

Es wurde die Absorption bei 363 nm bestimmt. Anhand dieser wurde die *Pdx2*-Aktivität unter dem Einfluss der jeweiligen Komponenten berechnet. Diese wurde anschließend in einen Prozentwert, bezogen auf die Aktivität der jeweiligen Positivkontrolle, umgerechnet. Alle Versuche wurden mindestens 3-mal durchgeführt ( $n \geq 3$ ). Die statistische Beurteilung der Signifikanz erfolgte mittels t-Test in GraphPad Prism 4 (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

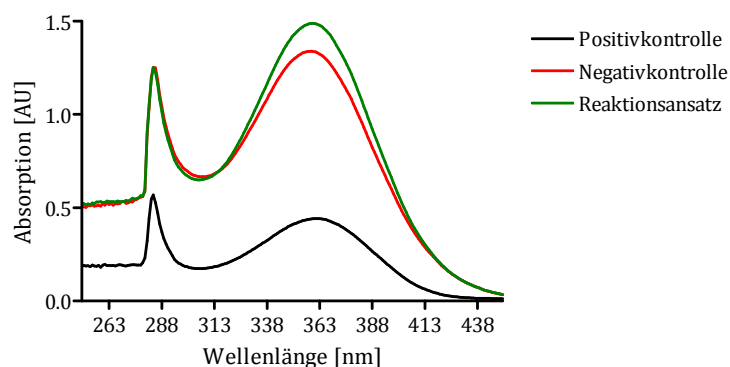
Anhand der in Abbildung 15 dargestellten Aktivitäten des *PfPdx2*-Moleküls in Anwesenheit der jeweiligen getesteten Komponenten konnten die Komponenten identifiziert werden, die die Aktivität um mindestens 50 %, verglichen mit der Positivkontrolle, senken. Dabei handelt es sich um die Komponenten 14-M, 15, 19, 20, 22, E1 - E5, E7 - E10, sowie um Aurano-fin. In Tabelle 3 sind die entsprechenden Restaktivitäten des *PfPdx2* dargestellt. Die Komponenten 1 bis 14-O, sowie 18, 21, 25 und 26 zeigen keine signifikante Hemmung ( $p > 0,05$ ). Die Komponenten 16, 17, 23 und 27 zeigen eine Hemmung der Enzymaktivität, jedoch wurden diese Komponenten in den nachfolgenden Versuchen nicht berücksichtigt, da diese keine Inhibierung um mindestens 50 % bei einer Inhibitor-konzentration von 80  $\mu$ M erreichen.

**Tabelle 3: Aktivität des Pfpdx2-Moleküls in Anwesenheit der HTS-Komponenten.**

Dargestellt sind die Komponenten die die Pfpdx2-Aktivität um mindestens 50 % verglichen mit der Positivkontrolle gesenkt haben.

	Restaktivität [%] (Sigma + Molport)		Restaktivität [%] (Evotec)
<b>Auranofin</b>	1,5 ± 0,3	<b>E1</b>	13,3 ± 2,4
<b>14-M</b>	3,2 ± 0,4	<b>E2</b>	8,7 ± 1,7
<b>15</b>	3,4 ± 0,5	<b>E3</b>	12,0 ± 2,5
<b>19</b>	15,0 ± 2,0	<b>E4</b>	24,6 ± 4,7
<b>20</b>	1,5 ± 0,2	<b>E5</b>	13,3 ± 1,9
<b>22</b>	11,5 ± 1,0	<b>E7</b>	10,2 ± 1,9
		<b>E8</b>	14,6 ± 1,1
		<b>E9</b>	15,5 ± 1,9
		<b>E10</b>	14,9 ± 1,5

Die Komponenten E6 und 24 weisen hohe Standardabweichungen auf, daher sind die Werte von Komponente E6 ( $21,5 \pm 9,8$  %) und Komponente 24 ( $94,3 \pm 79,7$  %) nicht zuverlässig. In Abbildung 16 ist das Absorptionsspektrum der Pdx2-Aktivität unter dem Einfluss von Komponente 24 dargestellt.



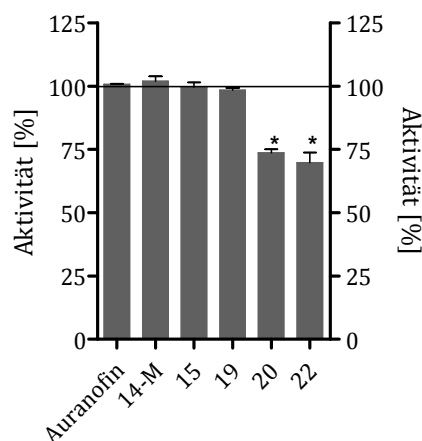
**Abbildung 16: Exemplarisches Absorptionsspektrum der durch die HTS-Komponente 24 beeinflussten Pdx2-Aktivität.**

Absorptionsspektren der Positivkontrolle (ungehemmte Pdx2-Reaktion; schwarz), der Negativkontrolle (Reaktionsansatz mit HTS-Komponente, ohne Pdx2-Enzym; rot) und des Reaktionsansatz (Substrat, Enzym und HTS-Komponente; grün) ( $n = 3$ ).

Komponente 24 zeigte im gesamten Bereich von 250 bis 450 nm eine sehr hohe Eigenabsorption. Die Negativkontrolle, bestehend aus Reaktionspuffer 1 und 2, Substrat und Komponente 24, zeigt eine deutlich höhere Absorption als die Positivkontrolle, bestehend aus Reaktionspuffer 1 und 2, Substrat und Enzym. Weitere Spektren sind im Anhang C (Seite XXII) dargestellt.

### 3.1.2. Inhibierung des Hilfsenzym, der Glutamat-Dehydrogenase

Um ausschließen zu können, dass die inhibierende Wirkung der Komponenten auf der Hemmung des Hilfsenzym GDH beruht, wurden die wirksamen Komponenten der Firma Molport auf die Inhibierung der GDH hin getestet.



**Abbildung 17: Inhibierung der GDH in Anwesenheit der HTS-Komponenten.**

Es wurden Glutamat, die jeweilige HTS-Komponente, APAD und die Glutamat-Dehydrogenase inkubiert. Glutamin und Pdx2 waren an diesem Versuch nicht beteiligt. Anhand der Absorption bei 363 nm wurde Aktivität der GDH berechnet. Der Versuch wurde 3-mal durchgeführt (n = 3) und die statistische Beurteilung der Signifikanz erfolgte in GraphPad Prism 4 mittels t-Test (\* p 0,01 - 0,05).

Es konnte gezeigt werden, dass die Komponenten 20 und 22 die GDH-Aktivität um 25 % bzw. 30 % inhibieren (siehe Abbildung 17 und Tabelle 4). Die restlichen untersuchten Komponenten zeigten keinen Einfluss auf die GDH-Aktivität.

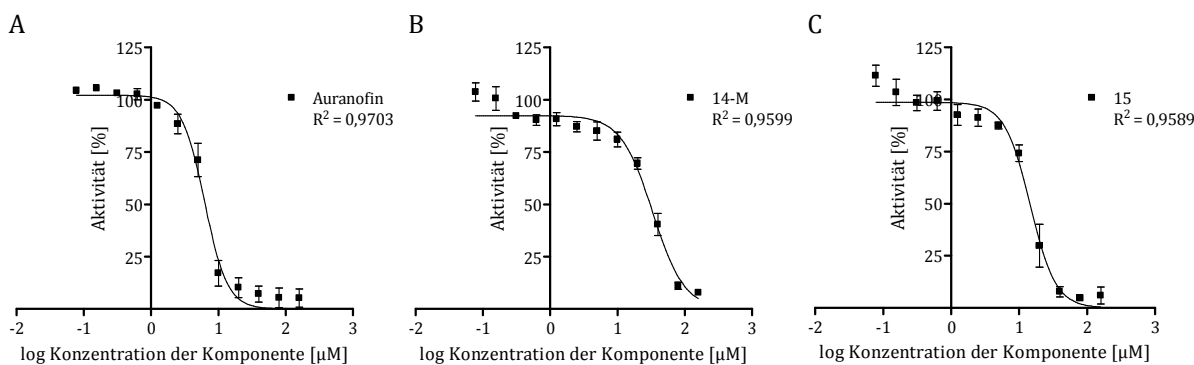
**Tabelle 4: Einfluss der HTS-Komponenten auf die Glutamat-Dehydrogenase.**

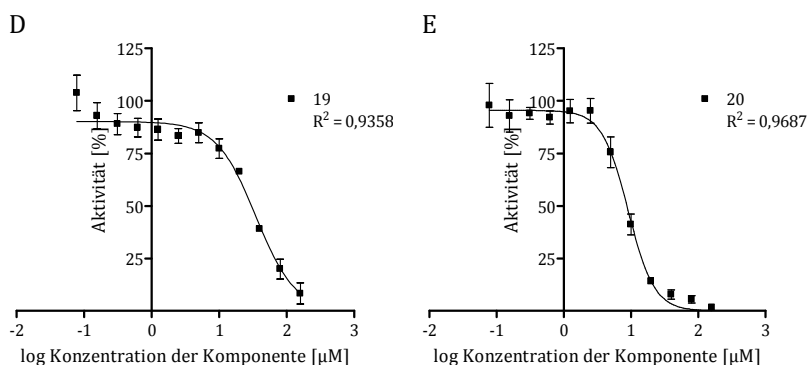
Untersucht wurden lediglich die Komponenten, die die *PfPdx2*-Aktivität gehemmt hatten.

	GDH-Aktivität [%]
<b>Auranofin</b>	100,8 ± 0,3
<b>14-M</b>	95,7 ± 3,3
<b>15</b>	94,2 ± 0,8
<b>19</b>	95,1 ± 6,2
<b>20</b>	73,7 ± 2,0
<b>22</b>	69,8 ± 5,6

### 3.1.3. Erstellen von Dosis-Wirkungskurven für die identifizierten spezifischen *PfPdx2*-Inhibitoren

Nachdem anhand der in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse die Komponenten identifiziert werden konnten, die eine inhibierende Wirkung auf die *PfPdx2*-Aktivität zeigten, wurden für diese Komponenten die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt. Dazu wurden die Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und es wurden wie unter 2.2.4.1 beschrieben Dosis-Wirkungskurven erstellt und analysiert. Die Dosis-Wirkungskurven und die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für alle getesteten Komponenten sind in Abbildung 18 und Tabelle 5 dargestellt. Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte für die Komponenten E1 bis E10 gegen die Aktivität des *PfPdx2*-Moleküls war nicht möglich, da nur eine geringe Menge dieser Komponenten zur Verfügung stand.





**Abbildung 18: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven von Auranofin und einiger HTS-Komponenten auf die *PfPdx2*-Aktivität.**

Dargestellt ist jeweils die Aktivität über die logarithmierte Konzentration ( $n = 3$ ). Die Aktivität wurde wie zuvor beschrieben anhand der Absorptionsswerte bei 363 nm berechnet und in Prozentwerte, bezogen auf die Positivkontrolle, umgerechnet.

A) Auranofin, B) 14-M, C) 15, D) 19, E) 20.

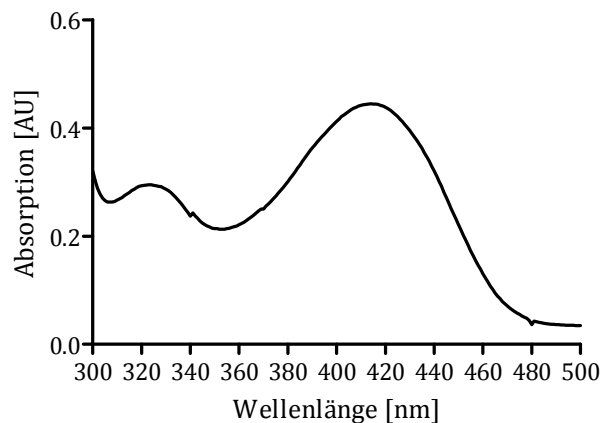
Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 5 dargestellt. Sie liegen zwischen 6,5 und 35  $\mu\text{M}$ . Die Kurven der Komponenten 14-M, 15, 19 und 20, sowie von Auranofin zeigen den typischen Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem Maximalwert um etwa 100 % Aktivität und einem Minimalwert von nahezu 0 % Aktivität.

**Tabelle 5:  $IC_{50}$ -Werte von Auranofin und den HTS-Komponenten 14-M, 15, 19 und 20 auf die Aktivität von *PfPdx2*.**

	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>Auranofin</b>	$6,5 \pm 1,2$
<b>14-M</b>	$32,3 \pm 2,8$
<b>15</b>	$14,7 \pm 1,9$
<b>19</b>	$34,7 \pm 0,7$
<b>20</b>	$9,0 \pm 1,5$

### 3.1.4. Inhibierung der *PfPdx1*-Aktivität

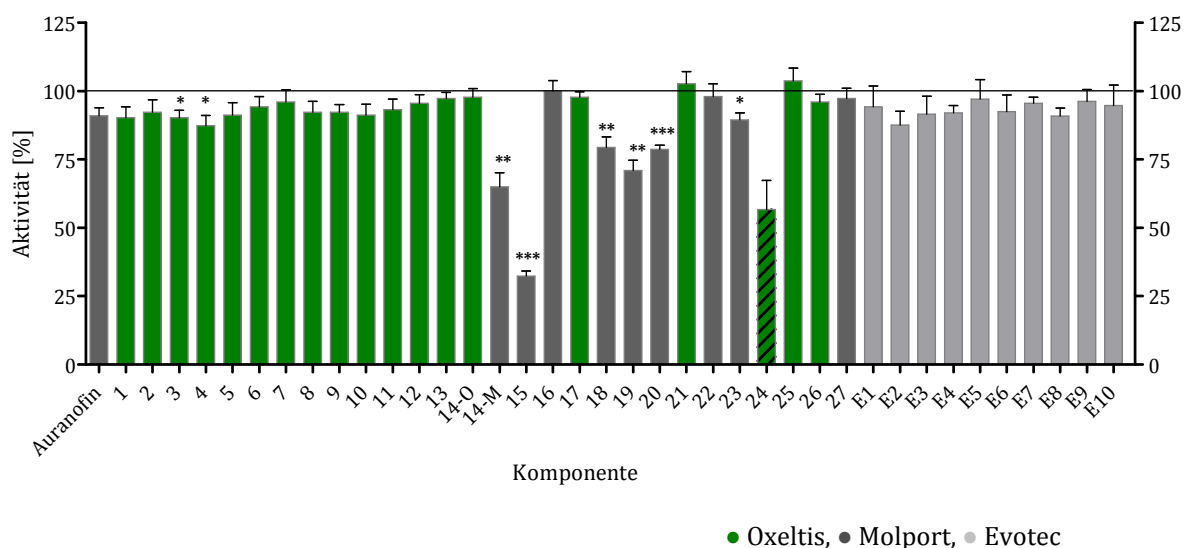
Die Inhibierung der *PfPdx1*-Aktivität durch die HTS-Komponenten wurde mit dem *PfPdx1*-Aktivitätsassay nach Müller *et al.* (2008) untersucht. Anstelle von Glutamin, dienten Ammoniumionen als Stickstoffquelle. Die spezifische Aktivität des ungehemmten *PfPdx1*-Moleküls betrug  $908,3 \pm 147,2 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Ein Absorptionsspektrum der ungehemmten *PfPdx1*-Reaktion ist in Abbildung 19 dargestellt. Es sind das Absorptionsmaximum der Schiff-Base bei 414 nm zu erkennen. Die Schiff-Base entsteht bei der Reaktion des gebildeten PLP mit dem im Reaktionspuffer enthaltenen Tris. Weiterhin ist das Absorptionsmaximum der  $I_{320}$ -Chromophore, eines PLP-Vorläufermoleküls, bei 320 nm zu erkennen.



**Abbildung 19: Exemplarisches Absorptionsspektrum der ungehemmten *PfPdx1*-Reaktion im Bereich von 300 bis 500 nm.**

Standard-Assay mit 200  $\mu\text{g}$  Pdx1 zur Bestimmung der Pdx1-Aktivität in Abwesenheit von Pdx2 und mit Ammoniumionen als Stickstoffquelle, das Absorptionsmaximum liegt bei 414 nm ( $n = 3$ ).

In Abbildung 20 ist die *PfPdx1*-Aktivität, beeinflusst durch die getesteten HTS-Komponenten (80  $\mu\text{M}$ ), dargestellt.



**Abbildung 20: PfPdx1-Aktivität im PfPdx1-Aktivitätsassay unter Einfluss der getesteten Komponenten 1 bis 27, E1 bis E10 und Auranofin.**

Es wurde die Absorption bei 414 nm bestimmt. Anhand dieser wurde die Pdx1-Aktivität unter dem Einfluss der jeweiligen Komponenten berechnet. Diese wurde anschließend in einen Prozentwert, bezogen auf die Aktivität der jeweiligen Positivkontrolle, umgerechnet. Alle Versuche wurden mindestens 3-mal durchgeführt ( $n \geq 3$ ). Die statistische Beurteilung der Signifikanz erfolgte mittels t-Test in GraphPad Prism 4 (\*  $p < 0,01 - 0,05$ , \*\*  $p < 0,001 - 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

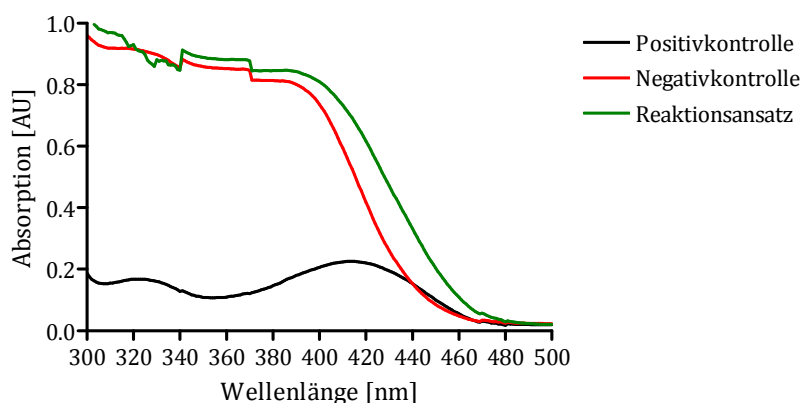
Anhand dieser Grafik konnten die Komponenten identifiziert werden, in deren Gegenwart die Restaktivität des PfPdx1-Moleküls um mindestens 25 %, verglichen mit der Positivkontrolle, gesenkt wurde. Dabei handelt es sich um die Komponenten 14-M, 15 und 19. Die Komponenten 3, 4, 18, 20 und 23 zeigten ebenfalls eine Hemmung, jedoch konnte bei einer InhibitorKonzentration von 80  $\mu\text{M}$  keine Hemmung der Enzymaktivität um mindestens 25 % erreicht werden. Die restlichen Komponenten, sowie Auranofin zeigten keine signifikante Hemmung der Pdx1-Aktivität ( $p > 0,05$ ). In Tabelle 6 sind die jeweiligen Restaktivitäten des PfPdx1 dargestellt.

**Tabelle 6: Aktivität des PfPdx1-Moleküls in Anwesenheit der HTS-Komponenten.**

Dargestellt sind die Komponenten die die PfPdx1-Aktivität um mindestens 25 % verglichen mit der Positivkontrolle hemmen.

	Restaktivität [%]
<b>14-M</b>	65,0 $\pm$ 10,2
<b>15</b>	32,3 $\pm$ 3,2
<b>19</b>	71,0 $\pm$ 7,3

Komponente 24 zeigte im *PfPdx1*-Aktivitätsassay auf Grund hoher Eigenabsorption erneut starke Schwankungen, der Wert für die Restaktivität ( $56,7 \pm 18,5 \%$ ) ist daher unzuverlässig.



**Abbildung 21: Exemplarisches Absorptionsspektrum der von Komponente 24 beeinflussten Pdx1-Aktivität.**

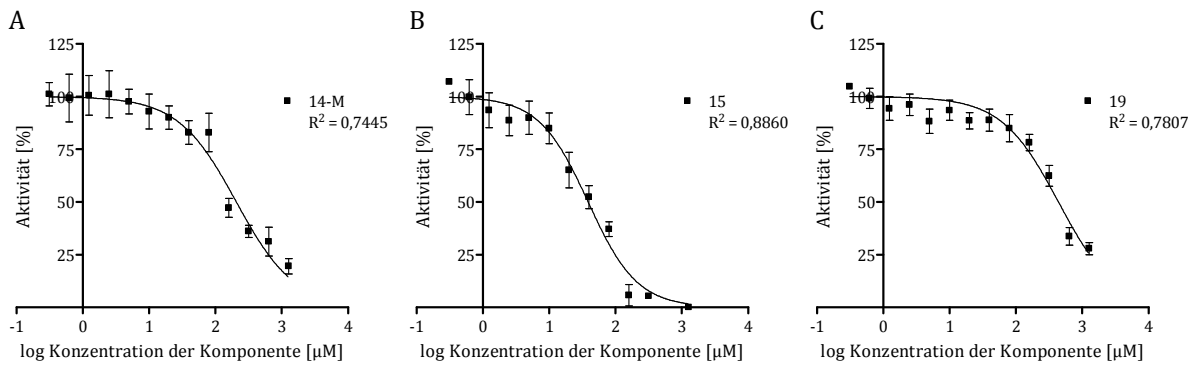
Absorptionsspektren der Positivkontrolle (ungehemmte Pdx2-Reaktion; schwarz), der Negativkontrolle (Reaktionsansatz mit HTS-Komponente, ohne Pdx2-Enzym; rot) und des Reaktionsansatz (Substrat, Enzym und HTS-Komponente; grün) ( $n = 3$ ).

In Abbildung 21 ist das Absorptionsspektrum der Pdx1-Reaktion unter Einfluss von Komponente 24 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass Komponente 24 im gesamten Bereich eine sehr starke Eigenabsorption aufweist. Die Negativkontrolle zeigt eine deutlich höhere Absorption als die Positivkontrolle. Weitere Absorptionsspektren der Pdx1-Aktivität sind im Anhang C (Seite XXII) dargestellt.

### 3.1.5. Erstellen von Dosis-Wirkungskurven für die identifizierten *PfPdx1*-Inhibitoren

Für die aus Abbildung 20 identifizierten Komponenten mit inhibierendem Einfluss auf die *PfPdx1*-Aktivität wurden ebenfalls Dosis-Wirkungskurven erstellt und die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurven sind in Abbildung 22 dargestellt und die berechneten  $IC_{50}$ -Werte für die drei getesteten Komponenten sind in Tabelle 7 aufgeführt.





**Abbildung 22: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven einiger HTS-Komponenten auf die Pdx1-Aktivität.**

Dargestellt ist jeweils die Aktivität über die logarithmierte Konzentration ( $n = 3$ ). Anhand der Absorption bei 414 nm wurde wie oben beschrieben die Aktivität des *PfPdx1* berechnet und anschließend in einen Prozentwert, bezogen auf die Positivkontrolle, umgerechnet.

A) 14-M, B) 15, C) 19.

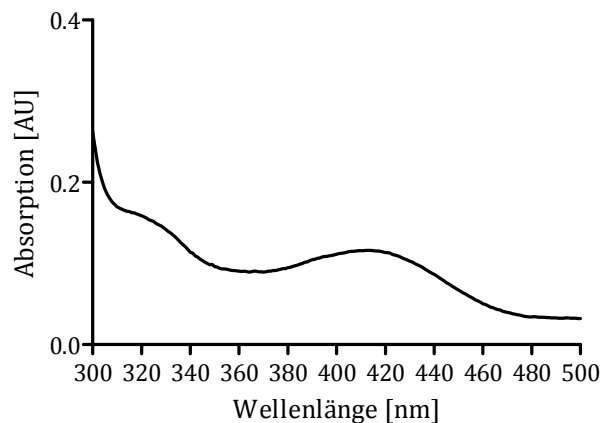
Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte liegen zwischen 41  $\mu\text{M}$  und 455  $\mu\text{M}$ . Die drei untersuchten HTS-Komponenten zeigen jeweils einen sigmoidalen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve, jedoch erreicht lediglich Komponente 15 den Minimalwert von 0 % Aktivität. Dies ist auch anhand der Werte für  $R^2$  bemerkbar. Die Minimalwerte der Komponenten 14-M und 19 liegen bei ca. 20 % bis 25 % Restaktivität.

**Tabelle 7:  $IC_{50}$ -Werte der HTS-Komponenten 14-M, 15 und 19 auf die Aktivität von *PfPdx1*.**

	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>14-M</b>	239,1 $\pm$ 41,6
<b>15</b>	41,4 $\pm$ 8,2
<b>19</b>	454,1 $\pm$ 87,6

### 3.1.6. Inhibierung der PLP-Synthese (*PfPdx1* und *PfPdx2*-Aktivität)

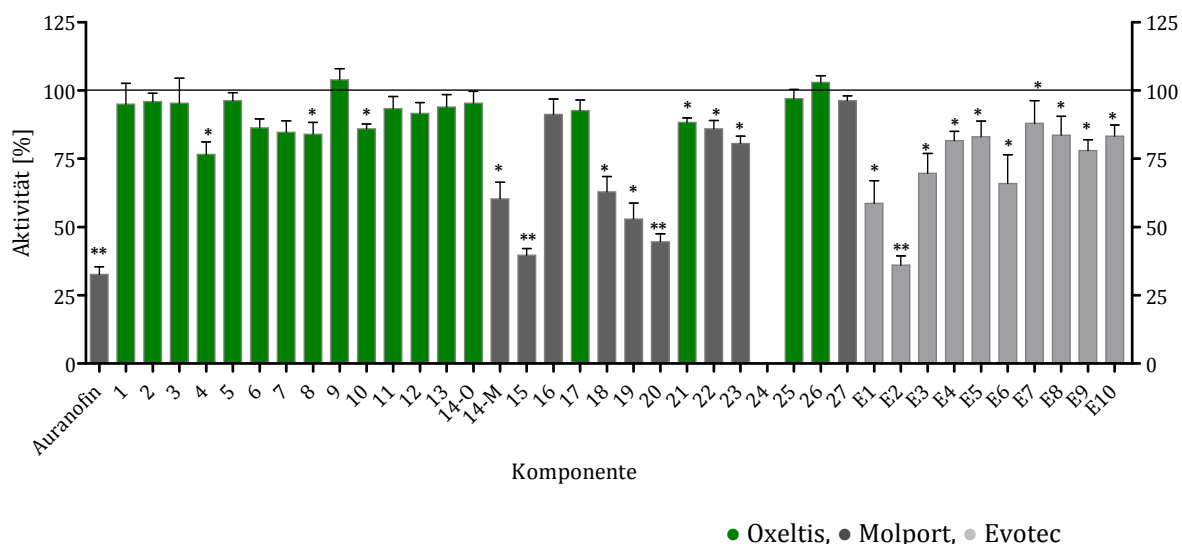
Zum Schluss wurde die Aktivität der PLP-Synthase mithilfe des PLP-Synthase-Aktivitätsassays nach Müller *et al.* (2008) bestimmt. Die spezifische Aktivität des Enzymkomplex betrug  $697,0 \pm 63,8 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Ein Absorptionsspektrum der ungehemmten PLP-Synthase-Reaktion ist in Abbildung 24 dargestellt. Bei 320 nm kann man die  $I_{320}$ -Chromophore und bei 414 nm das Absorptionsmaximum der aus PLP und Tris gebildeten Schiff-Base erkennen.



**Abbildung 23: Exemplarisches Absorptionsspektrum der ungehemmten PLP-Synthase-Reaktion im Bereich von 300 bis 500 nm.**

Standard-Assay mit 100  $\mu\text{g}$  Pdx1 und 100  $\mu\text{g}$  Pdx2 zur Bestimmung der PLP-Synthase-Aktivität ohne inhibierende Substanzen, das Absorptionsmaximum liegt bei 414 nm ( $n = 3$ ).

In der nachfolgenden Grafik ist die Restaktivität des Enzymkomplexes in Abhängigkeit der zugefügten HTS-Komponenten dargestellt.



**Abbildung 24: Aktivität der PLP-Synthese unter Einfluss der getesteten Komponenten 1 bis 27, E1 bis E10 und Auranofin.**

Es wurde die Absorption bei 414 nm bestimmt. Anhand dieser wurde die Aktivität der PLP-Synthese unter dem Einfluss der jeweiligen Komponenten berechnet. Diese wurde anschließend in einen Prozentwert, bezogen auf die Aktivität der jeweiligen Positivkontrolle, umgerechnet. Alle Versuche wurden mindestens 3-mal durchgeführt ( $n \geq 3$ ). Die statistische Beurteilung der Signifikanz erfolgte mittels t-Test in GraphPad Prism 4 (\*  $p < 0,01 - 0,05$ , \*\*  $p < 0,001 - 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

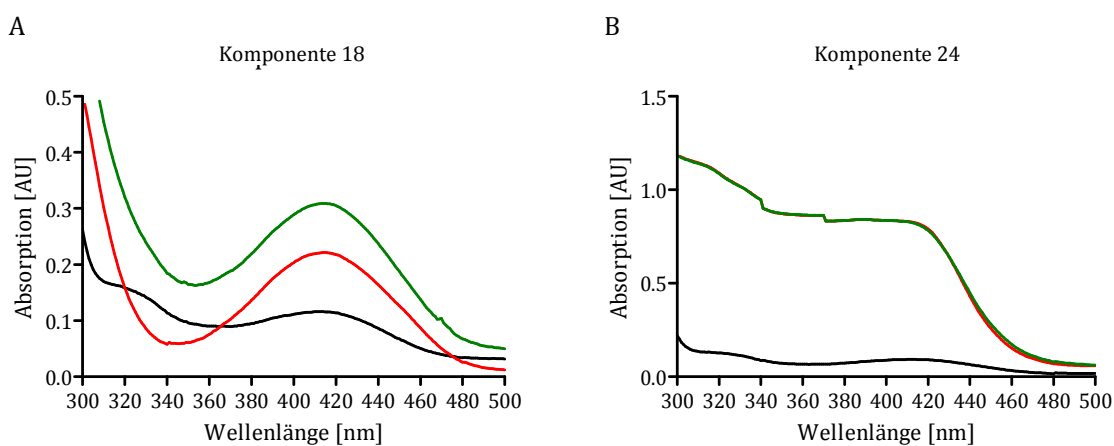
Der Einfluss der getesteten HTS-Komponenten auf die Aktivität der PLP-Synthese ist in Abbildung 24 grafisch dargestellt. Anhand der Grafik wurden die Komponenten identifiziert, die die Aktivität des Komplexes um mindestens 25 % senken. Dabei handelt es sich um die in Tabelle 8 aufgeführten Komponenten 14-M, 15, 18, 19, 20, E1, E2, E3 und E6, sowie Auranofin. Die Komponenten 4, 8, 10, 20, 21, 22, 23, E4, E5 und E7bis E10 zeigten ebenfalls eine Hemmung, jedoch lagen die Restaktivitäten der PLP-Synthese über 75 %. Die restlichen Komponenten zeigen keine signifikante Inhibierung der PLP-Synthese-Aktivität ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 8: Restaktivität der PLP-Synthase in Anwesenheit der HTS-Komponenten.**

Dargestellt sind lediglich die Komponenten die die Aktivität des Komplexes um mindestens 25 % verglichen mit der Positivkontrolle hemmen.

	Restaktivität [%] (Sigma + Molport)		Restaktivität [%] (Evotec)
<b>Auranofin</b>	32,7 ± 4,9	<b>E1</b>	43,3 ± 22,0
<b>14-M</b>	60,3 ± 10,5	<b>E2</b>	36,0 ± 6,1
<b>15</b>	39,8 ± 4,9	<b>E3</b>	69,7 ± 12,7
<b>18</b>	63,0 ± 9,6	<b>E6</b>	46,0 ± 31,5
<b>19</b>	53,0 ± 10,2		
<b>20</b>	44,7 ± 4,9		

Die Komponenten E1 und E6 fielen durch starke Schwankungen der Restaktivität des Gesamtkomplexes auf. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse für E1 und nicht zuverlässig. Bei Komponente 24 war es nicht möglich einen Wert für die Restaktivität zu ermitteln. Komponente 18 zeigte wie in Abbildung 25 zu erkennen eine sehr starke Eigenabsorption. Weitere Absorptionsspektren der PLP-Synthase-Aktivität sind im Anhang C (Seite XXII) dargestellt.



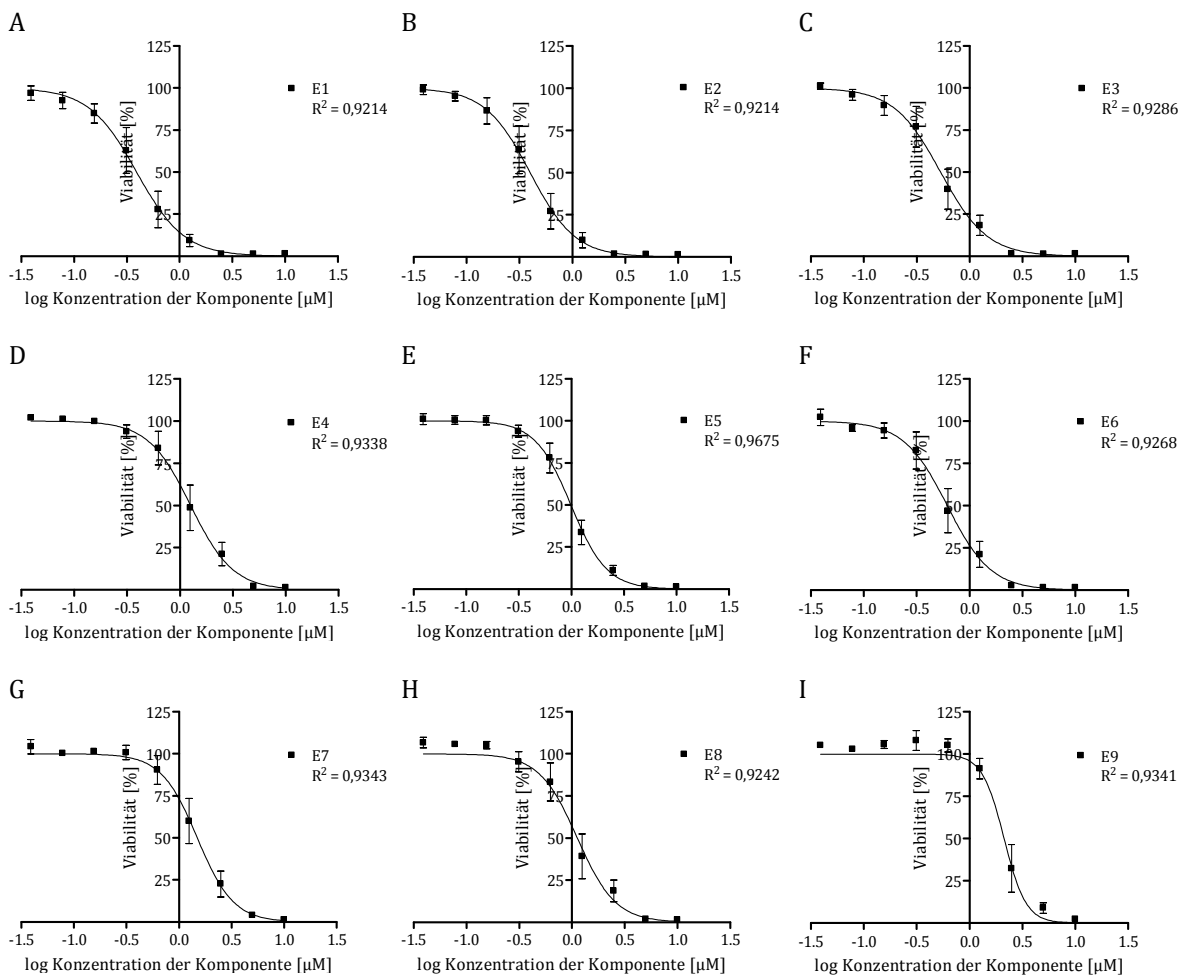
**Abbildung 25: Absorptionsspektren der PLP-Synthase-Reaktion unter dem Einfluss von Komponente 18 (A) und Komponente 24 (B).**

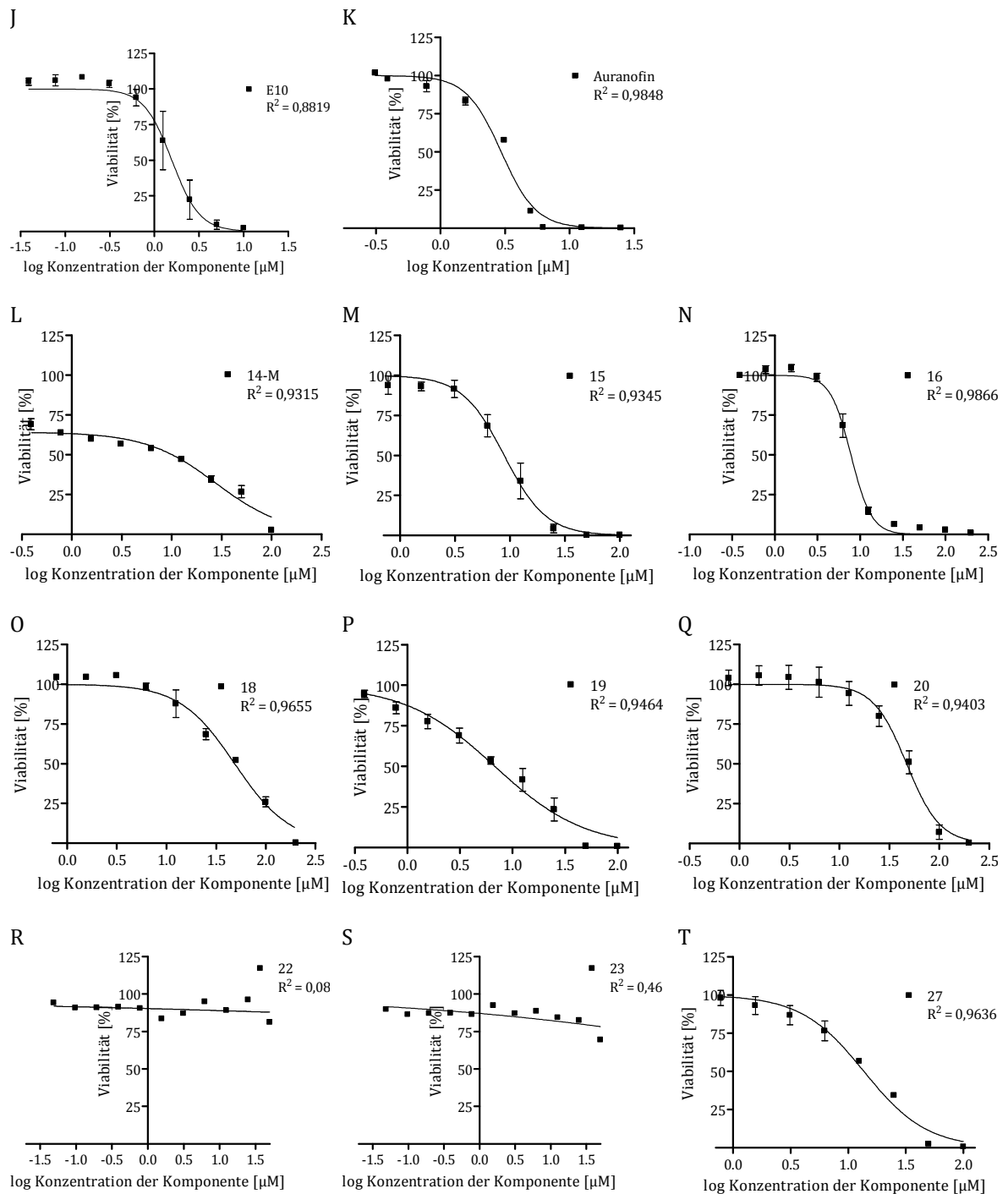
Absorptionsspektren der Positivkontrolle (ungehemmte Pdx2-Reaktion; schwarz), der Negativkontrolle (Reaktionsansatz mit HTS-Komponente, ohne Pdx2-Enzym; rot) und des Reaktionsansatz (Substrat, Enzym und HTS-Komponente; grün) (n = 3).

### 3.2. Die inhibitorische Wirkung der HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von *Plasmodium falciparum*

Nachdem die Komponenten im Enzymassay getestet wurden, sollte die inhibitorische Wirkung der wirksamen Komponenten auf das Wachstum von Plasmodien untersucht werden. Dies geschah über die Quantifizierung des Einbaus von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -Hypoxanthin.

Es wurden zum einen die Komponenten 14-M, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 27 und die Komponenten E1 bis E10, sowie Auranofin auf den Plasmodienstamm 3D7 getestet. Die erstellten Dosis-Wirkungskurven sind in Abbildung 26 und die ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte in Tabelle 9 dargestellt.





**Abbildung 26:** <sup>3</sup>H-Hypoxanthineinbautest mit den HTS-Komponenten, sowie mit Auranofin auf den Plasmodienstamm 3D7.

Dargestellt ist jeweils die Viabilität über die logarithmierte Konzentration ( $n = 3$ ). Die gemessenen *Counts* der jeweils mitgeführten Positivkontrolle wurde als 100 % Viabilität definiert und die *Counts* der Reaktionsansätze wurden, bezogen auf die Positivkontrolle, in Prozentwerte für die Viabilität umgerechnet. Anschließend wurde in GraphPad Prism 4 eine nicht-lineare Regression durchgeführt.

A) E1, B) E2, C) E3, D) E4, E) E5, F) E6, G) E7, H) E8, I) E9, J) E10, K) Auranofin L) 14-M, M) 15, N) 16, O) 18, P) 19, Q) 20, R) 22, S) 23, T) 27.

Die Komponenten E1-E10 zeigen auf den Plasmodienstamm 3D7 IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 0,4 und 1,7 µM. Die Kurvenverläufe sind sigmoidal mit einem Plateau bei 0 % Viabilität und 100 % Viabilität. Auranofin und die Komponenten 14-M, 15, 16, 18, 19 und 27 zeigen ebenfalls den typischen Verlauf einer Dosis-Wirkungskurve mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 2,8 µM und 60 µM. Die Komponenten 22 und 23 zeigen keine inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Parasiten (IC<sub>50</sub> > 100 µM). Die erstellten Dosis-Wirkungskurven erreichen keine Viabilitätsminderung von 50 %. Deutlich wird dies auch anhand der Werte für R<sup>2</sup> von 0,08 und 0,46.

**Tabelle 9: Mittlere inhibitorische Konzentrationen ausgewählter HTS-Komponenten auf das Wachstum und die Proliferation des Plasmodienstamms 3D7.**

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden jeweils 48 Stunden nach Zugabe der Komponente ermittelt.

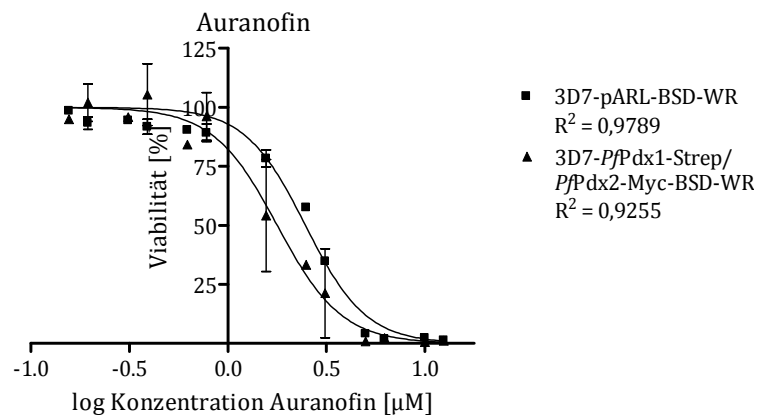
	IC <sub>50</sub> [µM] (Sigma + Molport)		IC <sub>50</sub> [µM] (Evotec)
<b>Auranofin</b>	2,8 ± 0,5	<b>E1</b>	0,4 ± 0,1
<b>14-M</b>	5,7 ± 0,3	<b>E2</b>	0,4 ± 0,1
<b>15</b>	9,2 ± 1,6	<b>E3</b>	0,6 ± 0,1
<b>16</b>	7,8 ± 0,6	<b>E4</b>	1,3 ± 0,3
<b>18</b>	59,1 ± 10,8	<b>E5</b>	1,0 ± 0,1
<b>19</b>	6,8 ± 0,5	<b>E6</b>	0,7 ± 0,1
<b>20</b>	46,7 ± 6,8	<b>E7</b>	1,5 ± 0,3
<b>22</b>	> 100,0 *	<b>E8</b>	1,1 ± 0,2
<b>23</b>	> 100,0 *	<b>E9</b>	1,7 ± 0,3
<b>27</b>	12,6 ± 0,6	<b>E10</b>	0,9 ± 0,2

\* im untersuchten Konzentrationsbereich konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden

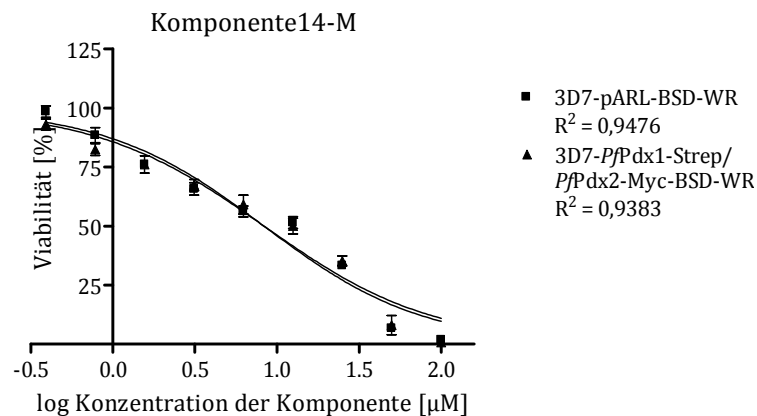
### 3.3. Effekt der HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum des *PfPdx1*- und *PfPdx2*-überexprimierenden Plasmodienstamm

Auranofin und die Komponenten 14-M und 19 wurden auf die Plasmodienzelllinie 3D7-*PfPdx1*-Strep/*PfPdx2*-Myc-BSD-WR [Knöckel *et al.*, 2012] getestet. Dabei sollte durch die Verwendung dieser *PfPdx1*- und *PfPdx2*-überexprimierenden Zelllinie, gezeigt werden, ob die Zellen eine höhere Resistenz gegen den Inhibitor aufweisen, als die ebenfalls getestete Mock-Zelllinie 3D7-pARL-BSD-WR, die keine Überexpression besitzt. Auf diese Weise kann die Spezifität der Komponenten gegen die PLP-Synthese eingeschätzt werden. Die Dosis-Wirkungskurven sind in Abbildung 27 und die  $IC_{50}$ -Werte für beide Zelllinien sind Tabelle 10 gegenüberstellt.

A

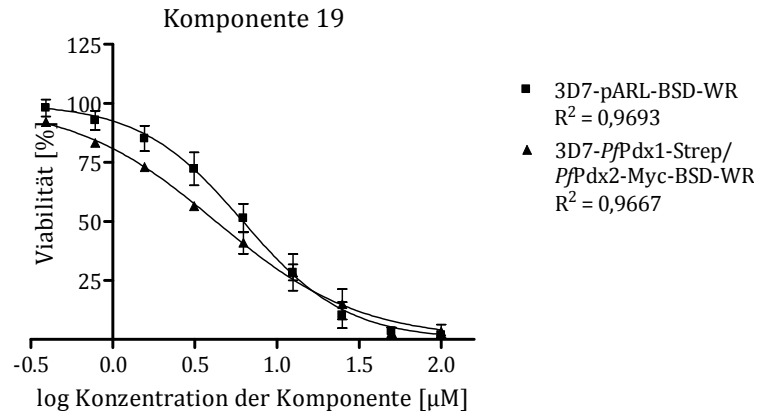


B





C



**Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven aus dem <sup>3</sup>H-Hypoxanthineinbautest mit den HTS-Komponenten 14-M und 19, sowie mit Auranofin auf die Plasmodienstämme 3D7-PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR und 3D7-pARL-BSD-WR.**

Dargestellt ist jeweils die Viabilität über die logarithmierte Konzentration (n = 3). Die gemessenen *Counts* der jeweils mitgeführten Positivkontrolle wurde als 100 % Viabilität definiert und die *Counts* der Reaktionsansätze wurden, bezogen auf die Positivkontrolle, in Prozentwerte für die Viabilität umgerechnet. Anschließend wurde in GraphPad Prism 4 eine nicht-lineare Regression durchgeführt.

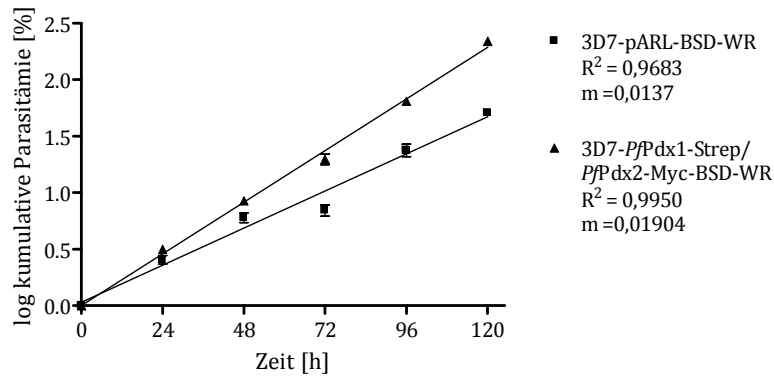
A) Auranofin, B) 14-M, C) 19.

Nach 48-stündiger Inkubation der überexprimierenden Plasmodienzelllinie und der Mock-Zelllinie mit Komponente 14-M wurden IC<sub>50</sub>-Werte um 8 µM ermittelt. Komponente 19 zeigte IC<sub>50</sub>-Werte von 4,5 µM, bzw. 6 µM und die IC<sub>50</sub>-Werte von Auranofin auf das Wachstum von 3D7-PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR und 3D7-pARL-BSD-WR lagen bei 1,9 µM und 2,5 µM.

**Tabelle 10: Mittlere inhibitorische Konzentrationen der Komponenten 14-M, 19 und von Auranofin auf das Wachstum und die Proliferation der beiden Plasmodienzelllinien PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR und pARL-BSD-WR.**

	3D7-pARL-BSD-WR	3D7-PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR
	IC <sub>50</sub> [µM]	IC <sub>50</sub> [µM]
Auranofin	2,5 ± 0,1	1,9 ± 0,3
14-M	8,3 ± 0,4	8,5 ± 0,9
19	6,3 ± 1,1	4,5 ± 0,8

Zusätzlich zum  $^3\text{H}$ -Hypoxanthineinbautest wurden Wachstumskurven der Plasmodienzelllinien 3D7-*PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR* und 3D7-*pARL-BSD-WR* unter Einfluss von  $0,2 \mu\text{M}$  Auranofin erstellt. In Abbildung 28 ist die logarithmierte Parasitämie über einen Zeitraum von 120 Stunden dargestellt.



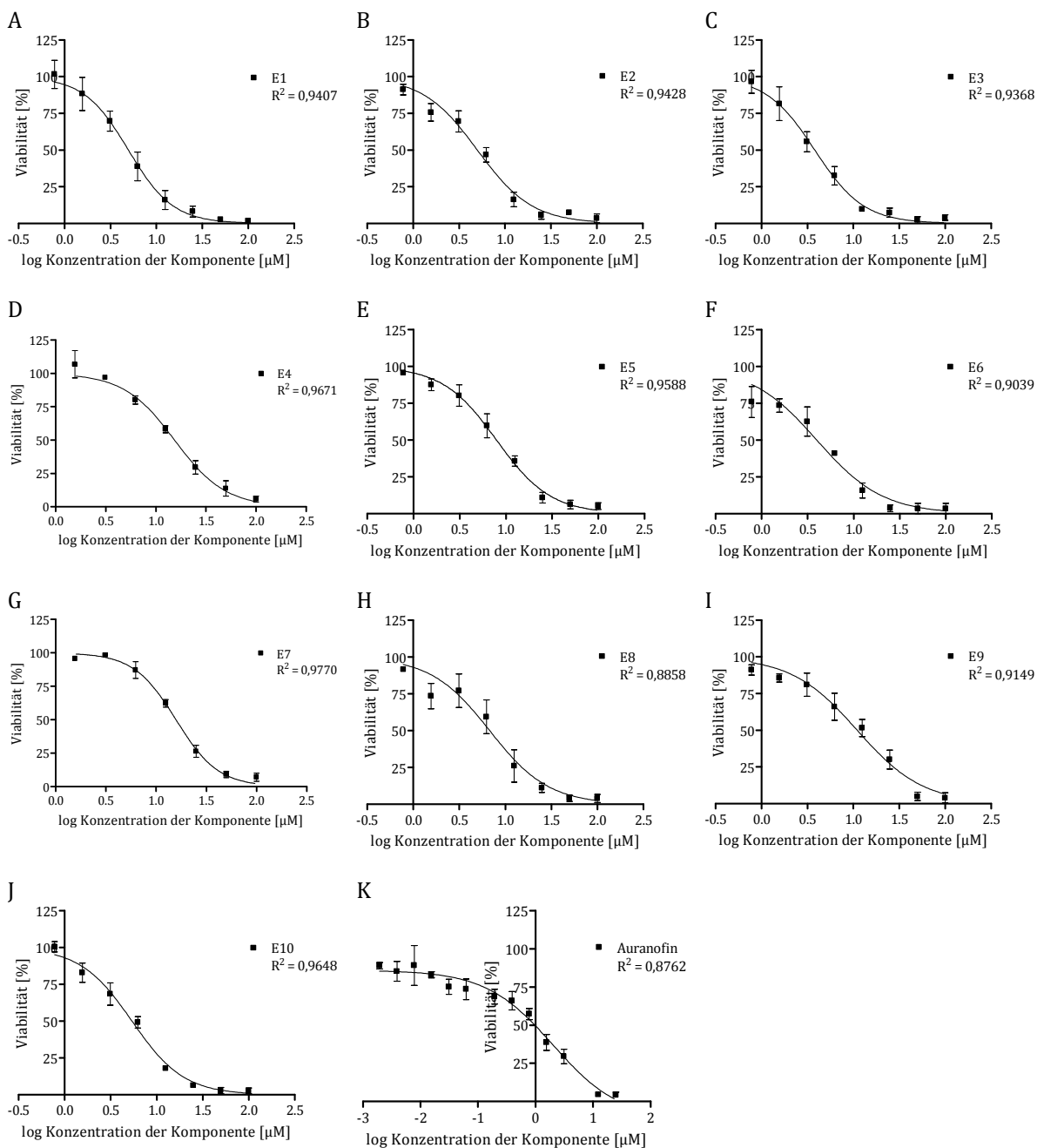
**Abbildung 28: Exemplarischer Verlauf des Wachstums von 3D7-*PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR* im Vergleich zum Wachstum von 3D7-*pARL-BSD-WR* unter Einfluss von  $0,2 \mu\text{M}$  Auranofin über einen Zeitraum von 120 Stunden.**

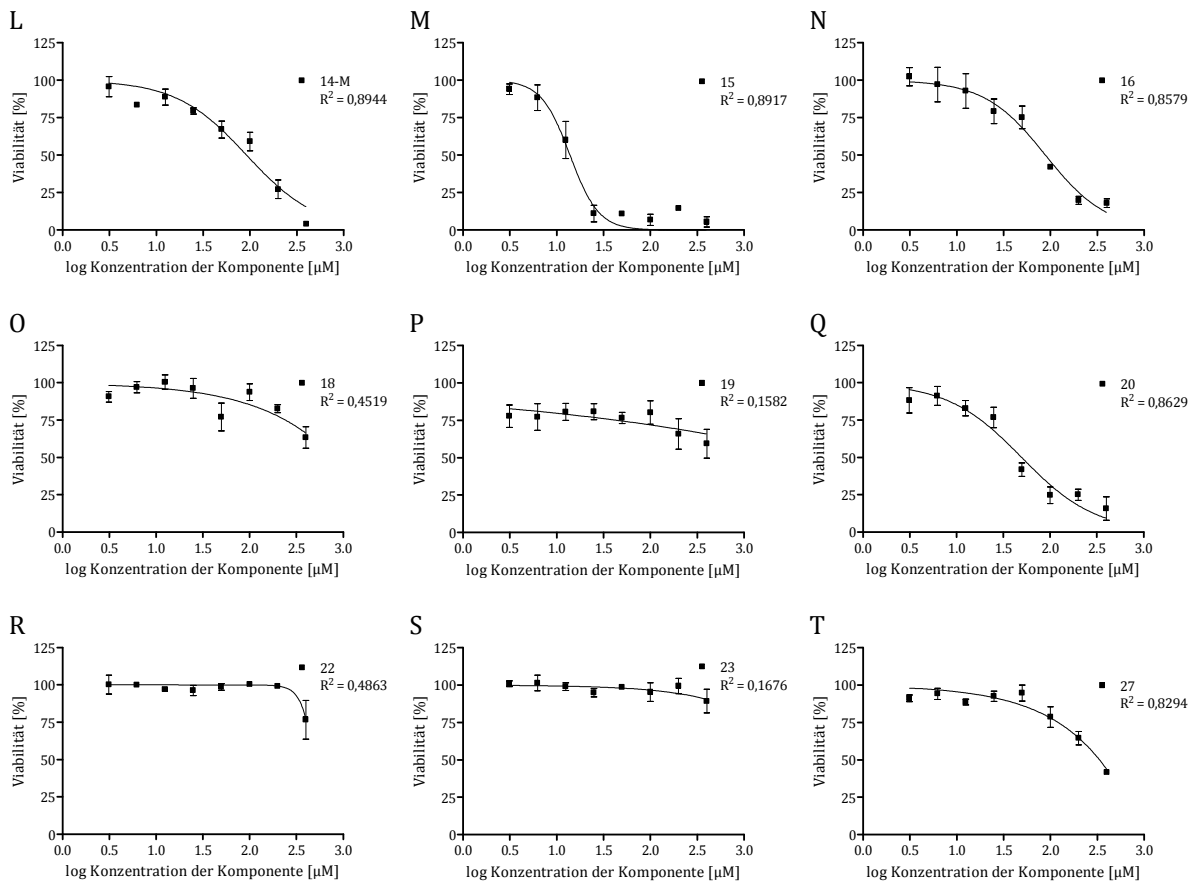
Dargestellt ist die die logarithmierte kumulative Parasitämie über die Zeit für beide Plasmodienstämme, das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und der Geradenanstieg  $m$ . Es wurden gefärbte Blutausstriche angefertigt. Anschließend wurden mindestens 500 Erythrozyten und die mit Plasmodien befallenen Erythrozyten ausgezählt. Die Parasitämie wurde mit Formel 8 berechnet.

Anhand der Geraden in Abbildung 28 wurde untersucht, ob beide Geraden signifikant voneinander abweichen. GraphPad Prism 4 berechnete einen  $p$ -Wert  $< 0,0001$  und gibt an, dass die Anstiege ( $m$ ) der beiden Geraden signifikant voneinander abweichen. Eine Wiederholung dieser Wachstumsstudie konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

### 3.4. Zytotoxizität der HTS-Komponenten und Auranofin auf HepG2-Zellen

Eine eventuelle toxische Wirkung der getesteten Komponenten auf HepG2-Zellen konnte mit Hilfe des WST-1-Assay untersucht werden. Die für die als wirksam identifizierten Substanzen erstellten Dosis-Wirkungskurven sind in den nachfolgenden Diagrammen dargestellt. Die Kurven der restlichen Komponenten sind im Anhang B (Seite XXI) zu finden.





**Abbildung 29: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven der inhibitorisch aktiven HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von HepG2-Zellen.**

Dargestellt ist jeweils die Viabilität über die logarithmierte Konzentration ( $n = 3$ ). Die gemessene Absorption bei 450 nm der jeweils mitgeführten Positivkontrolle wurde als 100 % Viabilität definiert und die Absorption der Reaktionsansätze wurde, bezogen auf die Positivkontrolle, in Prozentwerte für die Viabilität umgerechnet. Anschließend wurde in GraphPad Prism 4 eine nicht-lineare Regression durchgeführt. A) E1, B) E2, C) E3, D) E4, E) E5, F) E6, G) E7, H) E8, I) E9, J) E10, K) Auranofin L) 14-M, M) 15, N) 16, O) 18, P) 19, Q) 20, R) 22, S) 23, T) 27.

Die Komponenten 18, 19, 22, 23 und 27 zeigten über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich lediglich eine geringe Inhibierung. Die Dosis-Wirkungs-Kurven fallen nicht unter 50 % Aktivität und zeigen somit auch nicht den typisch sigmoidalen Verlauf. Im untersuchten Konzentrationsbereich konnten für diese Komponenten keine  $IC_{50}$ -Werte ( $IC_{50} > 300 \mu\text{M}$ ) ermittelt werden. Die Komponenten 14-M, 15, 16, 20 und E1 bis E10 zeigen  $IC_{50}$ -Werte zwischen  $2 \mu\text{M}$  und  $130 \mu\text{M}$ .

Die Kurvenverläufe dieser Substanzen sind typisch sigmoidal mit einem Maximalwert bei 100 % Restaktivität und einem Minimalwert bei 0 % Restaktivität. Einen vergleichbaren Kurvenverlauf zeigte Auranofin, der IC<sub>50</sub>-Wert lag bei 3,5 µM.

**Tabelle 11: Mittlere inhibitorische Konzentrationen der HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von HepG2-Zellen**

	IC <sub>50</sub> [µM] (Sigma + Molport)		IC <sub>50</sub> [µM] (Evotec)
<b>Auranofin</b>	3,5 ± 0,6	<b>E1</b>	4,6 ± 0,7
<b>14-M</b>	92,4 ± 10,6	<b>E2</b>	5,8 ± 0,6
<b>15</b>	13,2 ± 1,9	<b>E3</b>	2,4 ± 0,5
<b>16</b>	123,5 ± 14,6	<b>E4</b>	15,3 ± 1,3
<b>18</b>	> 300,0 *	<b>E5</b>	7,7 ± 1,1
<b>19</b>	> 300,0 *	<b>E6</b>	6,0 ± 1,0
<b>20</b>	41,5 ± 3,1	<b>E7</b>	14,8 ± 0,9
<b>22</b>	> 300,0 *	<b>E8</b>	7,8 ± 1,6
<b>23</b>	> 300,0 *	<b>E9</b>	15,3 ± 0,7
<b>27</b>	> 300,0 *	<b>E10</b>	5,6 ± 0,8

\* im untersuchten Konzentrationsbereich konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden

## 4. Diskussion

Da Plasmodien, die Erreger der Malaria, immer häufiger Resistenzen gegen die gängigen chemotherapeutischen Therapieansätze zeigen [Mehta & Das, 2006; Ekland *et al.*, 2007; Müller & Hyde, 2010], ist es notwendig, sowohl neue Wirkstoffe, als auch neue Angriffspunkte für diese Wirkstoffe zu identifizieren.

Die *de novo* Vitamin B<sub>6</sub>-Synthese von *Plasmodium falciparum* könnte einen möglichen Angriffspunkt für die Malariatherapie darstellen [Wrenger *et al.*, 2005; Müller & Hyde, 2010]. Der Mensch ist auf die Zufuhr von Vitamin B<sub>6</sub> mit der Nahrung angewiesen und besitzt die von Plasmodien für die Synthese benötigten Enzyme Pdx1 und Pdx2 nicht. Aus diesem Grund sind bei spezifischer Inhibierung der plasmodialen Enzyme Pdx1 und Pdx2 keine Nebenwirkungen für den Menschen zu erwarten.

Ob *Plasmodium falciparum* seinen PLP-Bedarf über die Aufnahme von Vitameren aus dem Erythrozyten und deren Umwandlung über die PdxK decken kann, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Jedoch konnten Reeksting *et al.* (2012) durch die spezifische Inhibierung von PfPdx1 durch E4P, EHz und 4PEHz zeigen, dass die *de novo* PLP-Synthese essentiell für das Überleben des Parasiten ist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Knöckel *et al.* (2012). Durch dominant-negative Mutanten des PfPdx1 und PfPdx2 wurde die PLP-Synthese des Parasiten inhibiert, wodurch dieser anfälliger gegenüber oxidativem Stress wurde [Knöckel *et al.*, 2012]. Daraus lässt sich schließen, dass neben der generell bekannten Rolle des PLP als Cofaktor für u. a. die Aminosäure-Biosynthese, den Kohlenhydratstoffwechsel und die Modifikation vieler Amin-haltiger Verbindungen [Mozzarelli & Bettati, 2006], eine weitere Bedeutung des PLP als Antioxidant für *Plasmodium falciparum* identifiziert worden war [Knöckel *et al.*, 2012].

Oxidativer Stress wird unter anderem durch Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) ausgelöst [Knöckel *et al.*, 2012]. Dieser entsteht während des Verdauens von Hämoglobin oder durch die Immunabwehr des Wirtsorganismus entsteht [Sherman, 1977; Ehrenshaft *et al.*, 1999; Freinbichler *et al.*, 2011; Butzloff *et al.*, 2012]. Knöckel *et al.* (2012) zeigten, dass *Plasmodium falciparum* mit der Hochregulierung der Expression von PfPdx1 und PfPdx2 auf oxidativen Stress reagiert und dass die Komplexbildung von PfPdx1 und PfPdx2 zu einer erhöhten Toleranz des Parasiten gegen Singulett-Sauerstoff führt.

Demzufolge würde die Inhibierung von *PfPdx1*, *PfPdx2* oder der PLP-Synthase nicht nur die Bildung von PLP sondern auch die Reaktion des Parasiten auf oxidativen Stress beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 27 Substanzen, die in einem Hochdurchsatz-Testverfahren der Firma European ScreeningPort (Hamburg), mit mehr als 250000 Komponenten, als Inhibitoren des plasmodialen Pdx2-Moleküls identifiziert worden waren, von verschiedenen Herstellern erneut synthetisiert und auf ihre Wirkung und Spezifität hin evaluiert. Die Neusynthese wurde von den Firmen Oxeltis und Evotec durchgeführt, einige weitere Substanzen wurden durch die Firma Molport vertrieben. Zusätzlich wurde mit einem bekannten Wirkstoff gegen rheumatoide Arthritis, Auranofin (Sigma-Aldrich), gearbeitet. Dieser hemmt parasitäre thiolabhängige Redoxenzyme (TrxR und TGR), die bei der Entgiftung von ROS beteiligt sind. Da Pdx1 und Pdx2 ebenfalls an der plasmodialen Reaktion auf oxidativen Stress beteiligt sind, sollte untersucht werden, ob Auranofin diese ebenfalls inhibiert.

In den durchgeführten Enzymassays wurde der Einfluss der Komponenten auf die Aktivität der an der PLP-Synthese beteiligten Enzyme untersucht. Die spezifische Aktivität des ungehemmten *PfPdx2* betrug  $145,5 \pm 27,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  und war ca. 1,8 mal geringer als die von Müller *et al.* (2008) publizierte Pdx2-Aktivität von  $266 \pm 19 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Die spezifische Aktivität des *PfPdx1*-Moleküls betrug  $908,3 \pm 147,2 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  und war damit etwa 1,2 mal höher als der von Müller *et al.* (2008) veröffentlichte Wert von  $746 \pm 76 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Auch der Wert der spezifischen Aktivität der PLP-Synthase von  $697,0 \pm 63,8 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  entsprach dem von Müller *et al.* (2008) publizierten Wert von  $662 \pm 54 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Die geringen Abweichungen in den spezifischen Aktivitäten lassen sich durch mögliche Aktivitätsverluste während der Proteinaufreinigung oder leicht unterschiedliche Expressionsbedingungen erklären.

#### 4.1. Die Komponenten der Firma Oxeltis zeigen keine inhibitorische Aktivität

Bei den Neusynthesen der Firma Oxeltis konnte keine signifikante inhibitorische Aktivität gegen *PfPdx1*, *PfPdx2* oder den Gesamtkomplex nachgewiesen werden. Im Zytotoxizitätsassay mit HepG2-Zellen zeigten lediglich die Komponenten 14-O und 24 einen leichten Einfluss, die  $IC_{50}$ -Werte lagen über 100  $\mu$ M. Da Komponente 24 bereits in den Enzymassays durch eine sehr starke Eigenabsorption auffiel, kann auch im HepG2-Assay ein falsch-positives Ergebnis aufgrund hoher Hintergrundabsorption nicht ausgeschlossen werden. Die Dosis-Wirkungskurve von Komponente 14-O zeigte starke Schwankungen, wodurch der berechnete  $IC_{50}$ -Wert unzuverlässig ist. Der  $IC_{50}$ -Wert wurden mit Hilfe einer nichtlinearen Regression (*sigmoidal dose response*) in GraphPad Prism 4 berechnet. Das Programm erstellt mittels Annäherung an die Einzelwerte eine Dosis-Wirkungskurve. Anhand dieser Kurve wird dann die mittlere Inhibitorkonzentration ( $IC_{50}$ -Wert) berechnet [Motulsky, 2003]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass alle Messwerte der Dosis-Wirkungskurve in die Berechnung einbezogen werden. Deshalb kann es, wenn die Kurve im untersuchten Konzentrationsbereich keinen typischen sigmoidalen Verlauf zeigt, wenn sie nicht unter den 50 %-Wert abfällt, oder wenn die typischen Plateaus bei 100 % und 0 % nicht erreicht werden, zu ungenauen  $IC_{50}$ -Werten kommen [Böhm *et al.*, 1996; Motulsky, 2003]. Auffällig war an dieser Stelle auch der geringe Werte für das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der erstellten Kurve. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  beschreibt die Vertrauenswürdigkeit der Berechnung der ermittelten Daten durch die lineare oder nicht lineare Regression. Eine perfekte Anpassung würde ein  $R^2$  von 1 zeigen [Böhm *et al.*, 1996]. Wenn die Einzelwerte zu stark um die Regressionskurve schwanken, können die berechneten  $IC_{50}$ -Werte ungenau sein.

Komponente 25 zeigte dagegen einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum mit einem  $IC_{50}$ -Wert um 38  $\mu$ M (siehe Anhang A, Seite XIX). Da in den vorherigen Enzymassays keinerlei Einfluss auf *Pdx1*, *Pdx2* oder die PLP-Synthase zu detektieren war, ist die Zytotoxizität vermutlich auf eine unspezifische Inhibierung zurück zuführen. Bei der Verwendung von WST-1 als Nachweis der Zytotoxizität gibt es einige kritisch zu betrachtende Punkte. Der Umsatz von WST-1 zu Formazan wird über mehrere Reaktionswege erreicht [Berridge *et al.*, 1996]. WST-1 wird zum einen durch Succinat in



Gegenwart der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase reduziert. Weiterhin wird es in Gegenwart von intermediären Elektronenakzeptoren schnell und effizient, extrazellulär oder an der Plasmamembran, von NADH und NADPH, in einem Prozess der Hyperoxid ( $O_2^-$ ) beinhaltet, reduziert. Zellextrakte mit Mitochondrien hemmen diese Reduktion [Berridge *et al.*, 1996]. Dies könnte dazu führen, dass die Reduktion von WST-1 durch intakte Zellen gehemmt wird, wenn lysierte Zellen vorliegen. Dadurch könnte eine untersuchte Substanz toxischer wirken, als sie ist. Die restlichen getesteten Komponenten der Firma Oxeltis zeigten keine Inhibierung des Zellwachstums innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches der HTS-Komponenten. Aufgrund mangelnder Aktivität in den Vorversuchen und da von den einzelnen Komponenten nur wenig Material zur Verfügung stand, wurden keine weiteren zellulären Assays mit den Komponenten der Firma Oxeltis durchgeführt.

Mögliche Gründe für die fehlende inhibitorische Aktivität der neu synthetisierten Komponenten der Firma Oxeltis könnten bei einer fehlerhaften Synthese oder Lagerung der Substanzen zu suchen sein. Dies könnte zu einem Aktivitätsverlust führen. Allerdings spricht der Vergleich zwischen Komponente 14-O (Oxeltis) und Komponente 14-M (Molport) gegen die Vermutung der falschen Lagerung. Beide Komponenten sind strukturell identisch und wurden vergleichsweise immer parallel getestet und auf die gleiche Art und Weise gelagert. Sie zeigten jedoch in den Aktivitätsassays und in den Zellaassays große Unterschiede in ihrer inhibitorischen Wirkung. Während 14-O keine Hemmung aufwies, wirkte 14-M sowohl auf die PLP-Synthase als auch auf das Parasitenwachstum. Da die Komponente 14-M mit Bromwasserstoff komplexiert vorliegt, wurde ein möglicher Effekt der Bromionen auf die Enzymaktivität von PfPdx2 untersucht. Die Bromionen hatten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt).

Die Möglichkeit, dass im Hochdurchsatz-Verfahren falsch positive Ergebnisse erzielt worden waren, ist ebenfalls unwahrscheinlich, da die Oxeltis Komponenten strukturell identischen Komponenten der Firma Evotec E1 - E10, in den einzelnen Aktivitäts- und Zytotoxizitätsassays starke Wirkung gezeigt haben. Möglich wäre ebenfalls, dass beide Firmen unterschiedliche Herstellungsverfahren anwenden, die zu unterschiedlichen Stabilitäten oder Racemat-Mischungen der Komponenten geführt haben.

## 4.2. Inhibitorische Aktivität der Komponenten der Firmen Evotec und Molport

Alle Komponenten der Firma Evotec zeigten im Pdx2-Aktivitätsassay eine sehr starke Inhibierung der Enzymaktivität, jedoch hemmte keine dieser Komponenten die Aktivität des *PfPdx1*. Eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität der PLP-Synthase um mindestens 25 % war lediglich für die Komponenten E1 - E3 und E6 detektierbar. Es wäre zu erwarten gewesen, dass durch die Hemmung der Pdx2-Aktivität auch eine deutliche inhibitorische Wirkung auf die PLP-Synthase erfolgt, wenn keine zusätzlichen Ammoniumionen vorhanden sind. Der Grund für die geringe Inhibierung liegt vermutlich in den unterschiedlichen Enzymkonzentrationen, im *PfPdx2*-Aktivitätsassay (jeweils 15 µg) und im PLP-Synthase-Aktivitätsassay (jeweils 100 µg), bei gleicher Inhibitorkonzentration (80 µM).

Diese hohen Enzymkonzentrationen im vollständigen Test waren nötig, um zu verhindern, dass man bei der Durchführung in einen Absorptionsbereich unterhalb der Nachweisgrenze des Photometers gelangt. Es ist möglich, dass die zugegebene Menge an HTS-Komponente (80 µM) nicht ausreichte um eine deutliche Inhibierung des im Überschuss vorliegenden Enzyms nachweisen zu können. Diese Versuchsreihe müsste bei höheren Inhibitorkonzentrationen wiederholt werden, hierfür wäre die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven sinnvoll.

Im <sup>3</sup>H-Hypoxanthineinbautest mit dem Plasmodienstamm 3D7 und den Komponenten E1 - E10 wurde eine starke Wachstumshemmung mit IC<sub>50</sub>-Werten ≤ 1 µM beobachtet. Die IC<sub>50</sub>-Werte im Zytotoxizitätsassay mit HepG2-Zellen sind durchschnittlich 10-mal höher als die Wirkung auf Plasmodien. Über den IC<sub>50</sub>-Wert kann nicht nur eine quantitative Aussage zur Potenz einer inhibierenden Substanz getroffen werden, sondern man kann anhand des Quotienten zweier IC<sub>50</sub>-Werte (hier: IC<sub>50</sub> auf das Wachstum von Plasmodien und HepG2-Zellen) ebenfalls eine erste Einschätzung zur Selektivität der Substanz ableiten. Dabei gilt die Selektivität einer Substanz als klinisch relevant, wenn der Quotient zweier IC<sub>50</sub>-Werte ≥ 30 ist [Graefe *et al.*, 2011]. Andere Arbeitsgruppen definieren eine akzeptable Selektivität einer Substanz zwischen Parasit und Wirtsorganismus mit einem Quotienten der IC<sub>50</sub>-Werte von 100 [Lelièvre *et al.*, 2012]. Demzufolge würden die Komponenten der Firma Evotec eine unspezifi-

sche Inhibierung der plasmodialen Glutaminase Pdx2 und anderer Glutaminasen der HepG2-Zellen zeigen.

Von den Komponenten der Firma Molport zeigte 14-M in allen drei durchgeführten Enzymassays eine signifikante Inhibierung der Enzymaktivität. Die Aktivität von Pdx2 wird durch 80  $\mu\text{M}$  Komponente 14-M nahezu komplett inhibiert, der  $\text{IC}_{50}$ -Wert auf die Pdx2-Aktivität betrug 32  $\mu\text{M}$ . In den zellulären Assays zeigte Komponente 14-M eine 16-mal stärkere Wirkung auf Plasmodien ( $\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$ ) als auf HepG2-Zellen ( $\text{IC}_{50} = 92,4 \mu\text{M}$ ). Anhand der ermittelten Daten lässt sich vermuten, dass Komponente 14-M entweder Pdx2 oder die Komplexbildung zwischen Pdx1 und Pdx2 inhibiert. Über eine Gelfiltration wäre es möglich den oligomeren Status der Enzyme unter Einfluss der HTS-Komponente zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Co-Aufreinigung beider Enzyme unter dem Einfluss der Komponente um zu klären, ob diese einen Komplex formen, oder ob 14-M die Komplexbildung inhibiert. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Komponente 14-M auf die Pdx1-Aktivität lag über 200  $\mu\text{M}$  und damit deutlich höher als anhand der Restaktivität des Pdx1 bei 80  $\mu\text{M}$  Komponente zu erwarten gewesen wäre. Mögliche Ursachen, für die hohen Werte sind zum einen in der statistischen Auswertung zu suchen. Eine weitere Fehlerquelle stellt die Zeitspanne zwischen den einzelnen Versuchen dar. Diese betrug mehrere Wochen und könnte zu einem Aktivitätsverlust der Substanz geführt haben. Anzeichen dafür ließen sich auch im Zytotoxizitätsassay mit HepG2-Zellen erkennen.

Auch Komponente 15 zeigte in allen drei Enzymassays eine deutliche Inhibierung der Enzymaktivitäten. Auf die Aktivität des Pdx1 zeigte sie einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 41  $\mu\text{M}$ . Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Komponente 15 auf das Wachstum von Plasmodien ( $\text{IC}_{50} = 9,2 \mu\text{M}$ ) war vergleichbar mit dem auf HepG2-Zellen ( $\text{IC}_{50} = 13,2 \mu\text{M}$ ), was auf eine geringe Selektivität hindeutet. Im zellulären Assay mit Plasmodien konnte bei höheren Konzentrationen der Komponente eine deutliche Schwarzfärbung der Erythrozyten beobachtet werden, die vermutlich auf eine Oxidation des zweiwertigen Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) im Eisen-Häm-Komplex zu dreiwertigem Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zurückzuführen ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Komponente 15 nicht selektiv wirkt. Auf Grund der starken Wirkung auf Enzymebene wäre sie jedoch als Leitstruktur für weitere Optimierungen geeignet.

Die Komponenten 16 und 18 zeigten in den drei durchgeführten Enzymassays keine deutliche Inhibierung der Enzymaktivitäten. Jedoch zeigten sie einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum von Plasmodien. Komponente 16 hatte einen etwa 16-mal stärkeren Einfluss auf das Plasmodienwachstum ( $IC_{50} = 7,8 \mu\text{M}$ ) als auf das Wachstum von HepG2-Zellen ( $IC_{50} = 123,5 \mu\text{M}$ ). Komponente 18 zeigte im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich keine Inhibierung des HepG2-Zellwachstums. Die mangelnde Aktivität in den Enzymassays könnte eventuell darauf hinweisen, dass die Komponenten nicht *PfPdx1*, *PfPdx2* oder die PLP-Synthase spezifisch inhibieren, jedoch auf ein anderes molekulares Ziel im Parasiten wirken.

Komponente 19 zeigte in den drei Enzymassays eine signifikante Inhibierung der Enzymaktivitäten. Bei  $80 \mu\text{M}$  Komponente betrug die Restaktivität des Pdx2 ( $IC_{50} = 34,7 \mu\text{M}$ ) noch 15 % und der PLP-Synthase 53 %. Ebenso wurde eine starke Wirkung auf das Wachstum von Plasmodien ( $IC_{50} = 6,8 \mu\text{M}$ ) beobachtet. Im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich konnte kein Einfluss auf das Wachstum der HepG2-Zellen beobachtet werden. Komponente 19 könnte ähnlich wie Komponente 14-M, sowohl die Pdx2-Aktivität inhibieren, als auch die Bildung der PLP-Synthase. Anders als die bei Komponente 14-M liegt bei 19 jedoch eine höhere Selektivität der Inhibierung des Plasmodienwachstums vor.

Komponente 20 zeigte im Pdx2- und im PLP-Synthase-Aktivitätsassay eine deutliche Inhibierung der Enzymaktivität. Die Restaktivität des Pdx2 bei  $80 \mu\text{M}$  Komponente 20 betrug lediglich 1,5 %. Jedoch konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Glutamat-Dehydrogenase beobachtet werden. Dies sollte bei der Beurteilung der Pdx2-Aktivität unbedingt berücksichtigt werden. Die  $IC_{50}$ -Werte von Komponente 20 auf das Wachstum von Plasmodien und HepG2-Zellen sind vergleichbar. Aufgrund des Einflusses auf die GDH und den geringen Unterschied im Einfluss auf Plasmodien und HepG2-Zellen muss davon ausgegangen werden, dass diese Komponente wenig spezifisch und selektiv ist und auch andere molekulare Reaktionen beeinflusst.

Die Komponenten 22 und 23 zeigten im Pdx2-Aktivitätsassay eine signifikante Inhibierung der Enzymaktivität. Komponente 22 inhibierte ebenfalls die GDH-Aktivität. Die fehlende Wirkung in den zellulären Assays lässt sich im Hinblick auf die nachgewiesene Inhibierung der Pdx2-Aktivität damit erklären, dass die Komponenten von den Zellen nicht oder nur in geringen Mengen aufgenommen werden und dadurch keinen Einfluss auf das Zellwachstum ausüben können.

Komponente 27 zeigte im Pdx2-Aktivitätsassay eine leichte Inhibierung der Enzymaktivität. Im zellulären Assay mit Plasmodien zeigte Komponente 27 jedoch einen starken Einfluss ( $IC_{50} = 12,6 \mu\text{M}$ ) auf das Wachstum der Parasiten, während im Zytotoxizitätsassay mit HepG2-Zellen kein Einfluss der Komponente auf das Zellwachstum erkennbar war. Bei Komponente 27 handelt es sich vermutlich um einen selektiven Inhibitor des Plasmodienwachstums. Die starke Wirkung auf Plasmodien und die geringe Wirkung im Enzymassay spricht allerdings dafür, dass kein spezifischer PfPdx2-Inhibitor vorliegt, sondern auch andere plasmodiale Stoffwechselfvorgänge betroffen sein könnten.

Die von Reeksting *et al.* (2012) identifizierten Inhibitoren des PfPdx1 zeigten  $IC_{50}$ -Werte von  $10,4 \mu\text{M}$  (4PEHz) und  $138 \mu\text{M}$  (EHZ) auf das Wachstum von Plasmodien. Die hier identifizierten selektiv auf Plasmodien wirkenden Komponenten sind deutlich potenter in ihrer Wirkung als EHz und vergleichbar mit 4PEHz.

### 4.3. Die inhibitorische Wirkung von Auranofin

Zusätzlich zu den Komponenten aus dem HT-Screen wurde Auranofin auf seine inhibitorische Aktivität gegen die PLP-Synthase, sowie gegen das Plasmodienwachstum untersucht.

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass Auranofin in der Lage ist, PfPdx2, eines der beiden Schlüsselenzyme der *de novo* Vitamin B<sub>6</sub>-Synthese von *Plasmodium falciparum*, und auch die Aktivität des Gesamtkomplexes zu inhibieren. Auf die Aktivität des PfPdx1 zeigte es keine Wirkung. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug  $6,5 \mu\text{M}$  im PfPdx2-Aktivitätsassay. Im Vergleich dazu berichteten Song *et al.* (2012) von  $IC_{50}$ -Werten von  $0,5 \text{ nM}$  auf die SjTGR und  $6,9 \text{ nM}$  auf die SjTrxR von *Schistosoma japonicum*. Ähnlich niedrige Werte für die Inhibierung der SmTGR ( $IC_{50} = 7 \text{ nM}$ ) und die SmTrxR ( $IC_{50} = 20 \text{ nM}$ ) von *Schistosoma mansoni* wurden von Kuntz *et al.* (2007) publiziert und Debnath *et al.* (2012) beobachteten einen  $IC_{50}$ -Wert von  $0,4 \mu\text{M}$  auf die EhTrxR von *Entamoeba histolytica*. Die  $IC_{50}$ -Werte auf die Aktivität von TGR und TrxR sind etwa um eine Größenordnung geringer als auf PfPdx2. Es müsste jedoch untersucht werden, ob auch die homologen Enzyme in *Plasmodium falciparum* deutlich potenter durch Auranofin gehemmt werden. Somit ist anzunehmen, dass Pdx2 nicht

das Hauptangriffsziel von Auranofin in *Plasmodium falciparum* darstellt, sondern dass vermutlich auch andere Stoffwechselforgänge betroffen sind.

Im  $^3\text{H}$ -Hypoxanthineinbautest mit dem Plasmodienstamm 3D7 wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2,8 \mu\text{M}$  ermittelt. Die in der Literatur beschriebenen  $\text{IC}_{50}$ -Werte auf das Wachstum verschiedener parasitärer Würmer, wie *Schistosoma japonicum* von  $3,8 \mu\text{M}$  [Song *et al.*, 2012], *Schistosoma mansoni* von  $5 \mu\text{M}$  [Kuntz *et al.*, 2007], sowie von  $2,5 \mu\text{M}$  auf das Wachstum des Hundebandwurms *Echinococcus granulosus* [Bonilla *et al.*, 2008], liegen somit im gleichen Bereich wie die Wirkung auf *Plasmodium falciparum*. Debnath *et al.* (2012) publizierten einen deutlich niedrigeren  $\text{IC}_{50}$  von  $0,5 \mu\text{M}$  auf das Wachstum eines anderen Protozoon *Entamoeba histolytica*. Auch der von Sannella *et al.* (2008) ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Auranofin auf das Wachstum von 3D7 mit  $142 \text{ nM}$  ist etwa 20-mal geringer als der hier ermittelte Wert, was sich auf unterschiedliche Assaybedingungen zurückführen lässt. Sannella *et al.* (2008) führten zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes einen pLDH-Aktivitätsassay durch, dieser Assay zeigt im Vergleich zum  $^3\text{H}$ -Hypoxanthin-Einbautest nur eine geringe Sensitivität [Noedl *et al.*, 2003]. Ebenso fällt anhand der von Sannella *et al.* (2008) publizierten Grafik auf, dass diese keinen typisch sigmoidalen Verlauf zeigt und kein Plateau bei 100 % Viabilität aufweist. Demzufolge ist der hier ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2,8 \mu\text{M}$  zuverlässiger.

Auranofin gilt als Wirkstoff mit einem besonders sicheren toxikologischen Profil und guten pharmakologischen Eigenschaften [Sannella *et al.*, 2008]. Beim therapeutischen Einsatz von Auranofin im Menschen beträgt die stationäre mittlere Goldkonzentration im Blut nach oraler Einnahme etwa  $3,5 \mu\text{M}$  [Debnath *et al.*, 2012]. Diese Menge führt beim Menschen nicht zu unakzeptablen Nebenwirkungen. Der hier ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert auf das Plasmodienwachstum ist etwa vergleichbar mit diesem Wert, wodurch theoretisch keine Toxizität auftreten sollte. Im Zytotoxizitätsassay mit Auranofin auf HepG2-Zellen wurde jedoch ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $3,5 \mu\text{M}$  ermittelt. Der niedrige  $\text{IC}_{50}$ -Wert auf die humane Hepatom-Zelllinie HepG2, ergibt sich daraus, dass Auranofin die TrxR nicht nur bei Parasiten, sondern auch bei Säugetieren, und damit auch bei HepG2-Zellen inhibiert, wodurch die intrazelluläre Redoxbalance gestört und oxidativer Stress ausgelöst wird [Lu *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2006], was zur Zytotoxizität führt. Anhand dieses Versuchs wird deutlich, dass ein grundlegendes Problem bei Zytotoxizitätstests mit Zellkulturen darin besteht, dass sich einzelne Zellen anders verhalten als ein Zellverband oder ein Organismus und dass auf diese Weise ermittelte Daten

keinen direkten Rückschluss auf das toxikologische Profil einer Substanz im menschlichen Körper erlauben.

#### 4.4. Selektivität der Komponenten gegen die plasmodiale *de novo* Vitamin B<sub>6</sub>-Synthese

Die Selektivität eines inhibierenden Wirkstoffs für ein bestimmtes Zielmolekül ist entscheidend für dessen sicheren Einsatz und die Vermeidung unerwünschter Nebeneffekte. Um die Selektivität der Komponenten 14-M und 19, sowie von Auranofin auf die Enzyme Pdx1 und Pdx2 *in vivo* näher zu untersuchen, wurde mit dem transgenen Plasmodienstamm 3D7-PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR gearbeitet. Dieser zeigt eine Überexpression der beiden Enzyme PfPdx1 und PfPdx2 [Knöckel *et al.*, 2012]. Es wurde vermutet, dass der Parasit aufgrund der Expression zusätzlicher Enzymkopien eine erhöhte Resistenz gegenüber den untersuchten Substanzen zeigt. Jedoch zeigten die <sup>3</sup>H-Hypoxanthineinbautests auf den überexprimierenden Plasmodienstamm 3D7-PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR keinen deutlichen Unterschied in der Sensitivität gegen die drei untersuchten Substanzen zum Plasmodienstamm 3D7-pARL-BSD-WR. Daher liegt die Schlussfolgerung nah, dass die Komponenten 14-M und 19 unspezifisch sind und neben der PLP-Synthese auch andere Stoffwechselforgänge beeinflusst werden. Auranofin zeigt auf das Wachstum von 3D7-PfPdx1-Strep/PfPdx2-Myc-BSD-WR einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1,9 µM. Dieser ist geringer, als der IC<sub>50</sub>-Wert auf das Wachstum von 3D7-pARL-BSD-WR von 2,5 µM. Die Ursache dafür ist im Verlauf der Dosis-Wirkungskurve zu suchen. Die Kurve für die überexprimierende Zelllinie zeigt besonders im Bereich von 20 bis 60 % Viabilität starke Schwankungen, wodurch der IC<sub>50</sub>-Wert verfälscht sein könnte. Aus diesem Grund kann auch für Auranofin davon ausgegangen werden, dass im <sup>3</sup>H-Einbautest kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien besteht.

Die mangelnde Spezifität von Auranofin gegen die PLP-Synthese könnte anhand der bereits bekannten Wirkung von Auranofin auf die Thioredoxenzyme TGR und TrxR anderer parasitärer Organismen [Sannella *et al.*, 2008] erklärt werden. Dies müsste jedoch erst für die plasmodialen Enzyme untersucht werden.

Um den Effekt von Auranofin auf den überexprimierenden Parasiten und die Kontrollzelllinie über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, wurden für beide Parasitenstämme Wachstumskurven über einen Zeitraum von 120 Stunden erstellt. Dabei wurde mit 0,2  $\mu\text{M}$  Auranofin, dies entspricht einem Zehntel des hier ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Wertes auf den Plasmodienstamm 3D7, gearbeitet. Es stellte sich heraus, dass das Wachstum des überexprimierenden Plasmodienstamms signifikant ( $p < 0,0001$ ) vom Wachstum der Kontrollzelllinie abweicht. Daraus lässt sich schließen, dass der überexprimierende Plasmodienstamm resistenter gegenüber Auranofin ist und somit die Inhibierung des Plasmodienwachstums nicht allein auf der Inhibierung der Enzyme *PfTrxR* und *PfTGR* beruht, sondern auch auf der Inhibierung von *PfPdx1* und *PfPdx2* zurückzuführen ist.

Spezifität und Selektivität eines potentiellen Wirkstoffes sind entscheidende Faktoren für dessen Anwendung. Als Spezifität wird die Fähigkeit einer inhibierenden Substanz, ein bestimmtes Zielmolekül zu hemmen, definiert, während die Selektivität als die Fähigkeit gilt, ein Zielmolekül innerhalb eines bestimmten Organismus zu hemmen [Mencher & Wang, 2005]. Bei der Entwicklung eines Wirkstoffes muss dieser so spezifisch wirken, dass die Therapie erfolgreich und die Nebenwirkungen vertretbar sind. Bei Enzyminhibitoren ist es daher, um Nebeneffekte auszuschließen, erwünscht, dass diese nur ein Enzym spezifisch hemmen. Anhand der Spezifität und Selektivität eines Wirkstoffes kann jedoch kein abschließender Rückschluss auf die Eignung oder Nichteignung des Wirkstoffes für die Therapie gezogen werden. In manchen Fällen ist gerade die ausgewogene Beeinflussung mehrerer molekularer Ziele entscheidend für einen Therapieerfolg. Eine Einschätzung des therapeutischen Wertes einer Substanz ist nur anhand klinischer und prä-klinischer, sowie späterer Langzeiterfahrung im Therapieeinsatz möglich [Böhm *et al.*, 1996].



## 4.5. Ausblick

In kommenden Versuchen, sollte unbedingt untersucht werden, ob die Wachstumskurven mit den beiden Plasmodienstämmen 3D7-*PfPdx1*-Strep/*PfPdx2*-Mcy-BSD-WR und 3D7-pARL-BSD-WR reproduzierbar sind. Es wäre ebenso sinnvoll, diesen Versuch mit den Komponenten 14-M, 15, 16, 18, 19, 20 und 27 zu wiederholen, da Auranofin zwar keinen unterschiedlichen Effekt im radioaktiven Assay zeigte, aber einen deutlichen Unterschied bei der Wachstumskurve. Besonders die Komponenten 14-M, 16, 18, 19 und 27 scheinen aufgrund ihrer starken Wirkung auf Plasmodien und dem geringeren Einfluss auf das Wachstum der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 viel versprechende Wirkstoff-Kandidaten zu sein. Eine Struktur-Funktionsanalyse für diese Substanzen ist geplant. In einem nächsten Schritt sollen die wirksamen Komponenten am *Swiss Tropical and Public Health Institute* im Mausmodell auf ihre Wirksamkeit *in vivo* untersucht werden. Sollten einige der Komponenten positiv gegen den Malariaparasiten wirken, ohne die Maus zu beeinträchtigen, könnten weiterführende Studien angestrebt werden.

Die hier identifizierten Komponenten dienen als Leitstrukturen. Mittels *in silico* Verfahren könnten die Strukturen pharmakologisch angepasst und optimiert werden, um auf diese Weise wirksamere und selektivere Inhibitoren synthetisieren zu können. Diese müssten dann wiederum sowohl auf ihre Wirkung gegen die plasmodialen Enzyme, als auch gegen Plasmodien getestet werden.

## Referenzen

**Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B.B. (1979).** Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 1979, 282, (5739), p. 615-616.

**Alano, P. (2007).** *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol*, 2007, 66, (2), p. 291-302.

**Angelucci, F., Sayed, A.A., Williams, D.L., Boumis, G., Brunori, M., Dimastrogiovanni, D., Miele, A.E., Pauly, F. and Bellelli, A. (2009).** Inhibition of *Schistosoma mansoni* thioredoxin-glutathione reductase by auranofin: structural and kinetic aspects. *J Biol Chem*, 2009, 284, (42), p. 28977–28985.

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

**Belli, S.I., Walker, R.A., and Flowers, S.A. (2005).** Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status. *Proteomics*, 2005, 5, (4), p. 918-924.

**Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D. and Wang, R. (1996).** The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 1996, 4, p. 14-19.

**Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72, p. 248-254.

**Bruce-Chwatt, L.J. (1981).** Alphonse Laveran's discovery 100 years ago and today's global fight against malaria. *J R Soc Med*, 1981, 74, (7), p. 531-536.

**Burns, K.E., Xiang, Y., Kinsland, C.L., McLafferty, F.W., and Begley, T.P. (2005).** Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc*, 2005, 127, (11), p. 3682-3683.

**Butzloff, S., Groves, M.R., Wrenger, C. and Müller, I.B. (2012).** Cytometric quantification of singlet oxygen in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cytometry A.*, 2012, 81, p. 698-703.

**Böhm, H.J., Klebe, G. and Kubinyi, H. (1996).** Wirkstoffdesign (Heidelberg/Berlin/Oxford: Spektrum Akademischer Verlag).

**Bonilla, M., Denicola, A., Novoselov, S.V., Turanov, A.A., Protasio, A., Izmendi, D., Gladyshev, V.N. and Salinas, G. (2008).** Platyhelminth Mitochondrial and Cytosolic Redox Homeostasis Is Controlled by a Single Thioredoxin Glutathione Reductase and Dependent on Selenium and Glutathione.

*The Journal Of Biological Chemistry*, 2008, 283, (26), p. 17898–17907.

**Carlton, J.M., Adams, J.H., Silva, J.C., Bidwell, S.L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Merino, E.F., Amedeo, P., Cheng, Q., Coulson, R.M., Crabb, B.S., Del Portillo, H.A., Essien, K., Feldblyum, T.V., Fernandez-Becerra, C., Gilson, P.R., Gueye, A.H., Guo, X., Kang'a, S., Kooij, T.W., Korsinczky, M., Meyer, E.V., Nene, V., Paulsen, I., White, O., Ralph, S.A., Ren, Q., Sargeant, T.J., Salzberg, S.L., Stoeckert, C.J., Sullivan, S.A., Yamamoto, M.M., Hoffman, S.L., Wortman, J.R., Gardner, M.J., Galinski, M.R., Barnwell, J.W., and Fraser-Liggett, C.M. (2008).** Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*.

*Nature*, 2008, 455, (7214), p. 757-763.

**Cassera, M.B., Gozzo, F.C., D'Alexandri, F.L., Merino, E.F., del Portillo, H.A., Peres, V.J., Almeida, I.C., Eberlin, M.N., Wunderlich, G., Wiesner, J., Jomaa, H., Kimura, E.A., and Katzin, A.M. (2004).** The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*.

*J Biol Chem*, 2004, 279, (50), p. 51749-51759.

**Clark, I.A., Alleva, L.M., Mills, A.C., and Cowden, W.B. (2004).** Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions.

*Clin Microbiol Rev*, 2004, 17, (3), p. 509-539.

**Coatney, G.R., Collins, W.E., Warren, M., Contacos P.G. (1971)** The Primate Malarías. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971

**Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2005).** *Plasmodium ovale*: parasite and disease.

*Clin Microbiol Rev*, 2005, 18, (3), p. 570-581.

**Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2007).** *Plasmodium malariae*: parasite and disease.

*Clin Microbiol Rev*, 2007, 20, (4), p. 579-592.

**Cooke, B.M., Mohandas, N., and Coppel, R.L. (2001).** The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes.

*Adv Parasitol*, 2001, 50, p. 1-86.

**Cooke, G.S., and Hill, A.V. (2001).** Genetics of susceptibility to human infectious disease.

*Nat Rev Genet*, 2001, 2, (12), p. 967-977.

**Cox, F.E. (2010).** History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.

*Parasit Vectors*, 2010, 3, (1), p. 5.

**Debnath, A., Parsonage, D., Andrade, R.M., He, C., Cobo, E.R., Hirata, K., Chen, S., Garcia-Rivera, G., Orozco, E., Martinez, M.B., Gunatilleke, S.S., Barrios, A.M., Arkin, M.R., Poole, L.B., McKerrow, J.H., and Reed, S.L. (2012).** A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nat Med*, 2012, 18, (6), p. 956-960.

**Dempsey, W.B. (1971).** Role of vitamin B<sub>6</sub> biosynthetic rate in the study of vitamin B<sub>6</sub> synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1971, 108, (3), p. 1001-1007.

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

**Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D. (1979)** Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1979, 16 (6), p. 710-718.

**Divo, A.A. (1985).** Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *J. Protozool*, 1985, 32, p. 59-64.

**Dong, Y.X., Sueda, S., Nikawa, J., and Kondo, H. (2004).** Characterization of the products of the genes SNO1 and SNZ1 involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 2004, 271, (4), p. 745-752.

**Ehrenshaft, M., Bilski, P., Li, M.Y., Chignell, C.F., and Daub, M.E. (1999).** A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, (16), p. 9374-9378.

**Ehrenshaft, M., and Daub, M.E. (2001).** Isolation of Pdx2, a second novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaebacteria, and a subset of eubacteria. *J Bacteriol*, 2001, 183, (11), p. 3383-3390.

**Ekland, E.H. and Fidock D.A. (2007).** Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance. *Curr Opin Microbiol.*, 2007, 10, (4), p. 363-370.

**Eliot, A.C., and Kirsch, J.F. (2004).** Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73, p. 383-415.

**Enserink, M. (2005).** Infectious diseases. Source of new hope against malaria is in short supply. *Science*, 2005, 307, (5706), p. 33.

**Ferone, R., Burchall, J.J., and Hitchings, G.H. (1969).** *Plasmodium berghei* dihydrofolate reductase. Isolation, properties, and inhibition by antifolates. *Mol Pharmacol*, 1969, 5, (1), p. 49-59.

**Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R., and Nwaka, S. (2004).** Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3, (6), p. 509-520.

**Fitzpatrick, T.B., Amrhein, N., Kappes, B., Macheroux, P., Tews, I., and Raschle, T. (2007).** Two independent routes of de novo vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis: not that different after all. *Biochem J*, 2007, 407, (1), p. 1-13.

**Flicker, K., Neuwirth, M., Strohmeier, M., Kappes, B., Tews, I., and Macheroux, P. (2007).** Structural and thermodynamic insights into the assembly of the heteromeric pyridoxal phosphate synthase from *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*, 2007, 374, (3), p. 732-748.

**Fonda, M.L. and Harker, C.W. (1982).** Metabolism of pyridoxine and protein binding of the metabolites in human erythrocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982, 35, p. 1391-1399.

**Freinbichler, W., Colivicchi, M.A., Stefanini, C., Bianchi, L., Ballini, C., Misini, B., Weinberger, P., Linert, W., Vares'lija, D., Tipton, K.F., Della Corte, L. (2011).** Highly reactive oxygen species: Detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68, p. 2067-2079.

**Friedrich, W. (1988).** Vitamins, Walter de Gruyter.

**Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., and Barrell, B. (2002).** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2002, 419, (6906), p. 498-511.

**Gengenbacher, M., Fitzpatrick, T.B., Raschle, T., Flicker, K., Sinning, I., Muller, S., Macheroux, P., Tews, I., and Kappes, B. (2006).** Vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem*, 2006, 281, (6), p. 3633-3641.

**Good, M.F., and Doolan, D.L. (1999).** Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol*, 1999, 11, (4), p. 412-419.

**Graefe, K.H., Lutz, W.K. and Bönisch, H. (2011).** Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. (Stuttgart: Thieme Verlag)

**Greenwood, B.M., and Targett, G.A. (2011).** Malaria vaccines and the new malaria agenda.

*Clin Microbiol Infect*, 2011, 17, (11), p. 1600-1607.

**Guédez Rodríguez, G.L. (2011).** Assembly and Activation of the Plasmodial Pyridoxal 5'-Phosphate Synthase Complex - Understanding the Structural Mechanism of PLP Biosynthesis. Dissertation thesis, Ruperto-Carola University of Heidelberg, Heidelberg.

**Hanes, J.W., Keresztes, I., and Begley, T.P. (2008).** <sup>13</sup>C-NMR snapshots of the complex reaction coordinate of pyridoxal phosphate synthase.

*Nat Chem Biol*, 2008, 4, (7), p. 425-430.

**Hyde, J.E. (2005).** Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*.

*Acta Trop*, 2005, 94, (3), p. 191-206.

**Ilari, A., Baiocco, P., Messori, L., Fiorillo, A., Boffi, A., Gramiccia, M., Di Muccio, T. and Colotti, G. (2012).** A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition.

*Amino Acids*, 2012, 42, p. 803-811

**Jensen, J.B., and Trager, W. (1977).** *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method.

*J Parasitol*, 1977, 63, (5), p. 883-886.

**Kaul, D.K., Roth, E.F., Jr., Nagel, R.L., Howard, R.J., and Handunnetti, S.M. (1991).** Rosetting of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction under flow conditions.

*Blood*, 1991, 78, (3), p. 812-819.

**Knöckel, J., Müller, I.B., Butzloff, S., Bergmann, B., Walter, R.D. and Wrenger, C. (2012).** The antioxidative effect of de novo generated vitamin B<sub>6</sub> in *Plasmodium falciparum* validated by protein interference.

*Biochem. J.*, 2012, 443, p. 397-405.

**Knowles, B.B., and Aden, D.P. (1983).** Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefore., vol. US Patent 4393133, The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, Pa.: USA.

**Knowles, B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P. (1980).** Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen.

*Science*, 1980, 209, (4455), p. 497-499.

**Krnajski, Z., Gilberger, T.W., Walter, R.D. and Müller, S. (2002).** Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages.

*J. Biol.Chem.*, 2002, 277 (2002), p. 25970-25975.

- Kuntz, A.N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A.A., Califf, L.L., Dessolin, J., Arnér, E.S. and Williams, D.L. (2007).** Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS Med*, 2007, 4, (6), e206.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, (5259), p. 680-685.
- Lam, H.M., and Winkler, M.E. (1992).** Characterization of the complex pdxH-tyrS operon of *Escherichia coli* K-12 and pleiotropic phenotypes caused by pdxH insertion mutations. *J Bacteriol*, 1992, 174, (19), p. 6033-6045.
- Lambros, C., and Vanderberg, J.P. (1979).** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, 1979, 65, (3), p. 418-420.
- Lelièvre, J., Almela, M.J., Lozano, S., Miguel, C., Franco, V., Leroy, D. and Herreros, E. (2012).** Activity of Clinically Relevant Antimalarial Drugs on *Plasmodium falciparum* Mature Gametocytes in an ATP Bioluminescence “Transmission Blocking” Assay. *PLoS ONE*, 2012, 7, (4), e35019.
- Lu, J., Chew, E.H., Holmgren, S. and Targeting, A. (2007).** TrxR is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, p. 12288–12293.
- Lucius, R., and Loos-Frank, B. (2008).** Biologie von Parasiten, 2 Edition (Springer Verlag).
- Manson, P. (1898).** Surgeon-Major Ronald Ross’s Recent Investigations on the Mosquito-Malaria Theory. *Br Med J*, 1898, 1, (1955), p. 1575-1577.
- Manson, P. (1900).** Experimental Proof of The Mosquito-Malaria Theory. *Brit Med J*, 1900, p. 949-951.
- McConkey, G.A., Pinney, J.W., Westhead, D.R., Plueckhahn, K., Fitzpatrick, T.B., Macheroux, P., and Kappes, B. (2004).** Annotating the Plasmodium genome and the enigma of the shikimate pathway. *Trends Parasitol*, 2004, 20, (2), p. 60-65.
- Mehlhorn, H., and Piekarski, G. (2002).** Grundriss der Parasitenkunde (Heidelberg/Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).
- Mehta, S.R., and Das, S. (2006).** Management of malaria: recent trends. *J Commun Dis*, 2006, 38, (2), p. 130-138.

- Mencher, S.K. and Wang, L.G. (2005).** Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue). *BMC Clinical Pharmacology*, 2005, 5, (3).
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K. (2002).** The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002, 415, (6872), p. 673-679.
- Motulsky, H. (2003).** GraphPad Prism Version 4.0 - Statistics Guide: Statistical analyses for laboratory and clinical researchers. (San Diego, CA: GraphPad Prism Software Inc.).
- Mozzarelli, A. and Bettati, S. (2006).** Exploring the Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes. *The Chemical Record*, 2006, 6, p. 275-287.
- Müller, I.B., Knockel, J., Groves, M.R., Jordanova, R., Ealick, S.E., Walter, R.D., and Wrenger, C. (2008).** The assembly of the plasmodial PLP synthase complex follows a defined course. *PLoS One*, 2008, 3, (3), e1815.
- Müller, I.B., Wu, F., Bergmann, B., Knöckel, J., Walter, R.D., Gehring, H. and Wrenger, C. (2009).** Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, 2009, 4, (2), e4406.
- Müller, I.B., Hyde, J.E. and Wrenger, C. (2010).** Vitamin B metabolism in *Plasmodium falciparum* as a source of drug targets. *Trends in Parasitology*, 2010, 26, (1), p. 35-43
- Noedl, H., Wongsrichanalai, Ch. and Wernsdorfer, W.H. (2003).** Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends in Parasitology*, 2003, 19, (4), p. 175-181.
- Osmani, A.H., May, G.S., and Osmani, S.A. (1999).** The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem*, 1999, 274, (33), p. 23565-23569.
- Pain, A., Bohme, U., Berry, A.E., Mungall, K., Finn, R.D., Jackson, A.P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E.M., Aslett, M.A., Balasubrammaniam, S., Borgwardt, K., Brooks, K., Carret, C., Carver, T.J., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clark, T.G., Galinski, M.R., Hall, N., Harper, D., Harris, D., Hauser, H., Ivens, A., Janssen, C.S., Keane, T., Larke, N., Lapp, S., Marti, M., Moule, S., Meyer, I.M., Ormond, D., Peters, N., Sanders, M., Sanders, S., Sargeant, T.J., Simmonds, M., Smith, F., Squares, R., Thurston, S., Tivey, A.R., Walker, D., White, B., Zuijderwijk, E., Churcher, C., Quail, M.A., Cowman, A.F., Turner, C.M., Rajandream, M.A., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Newbold, C.I., Barrell, B.G., and Berriman, M. (2008).** The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature*, 2008, 455, (7214), p. 799-803.



- Percudani, R., and Peracchi, A. (2003).** A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes.  
*EMBO Rep*, 2003, 4, (9), p. 850-854.
- Raschle, T., Amrhein, N., and Fitzpatrick, T.B. (2005).** On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*.  
*J Biol Chem*, 2005, 280, (37), p. 32291-32300.
- Reeksting, S.B., Muller, I.B., Burger, P.B., Burgos, E.S., Salmon, L., Louw, A.I., Birkholtz, L.M., and Wrenger, C. (2012).** Exploring inhibition of Pdx1, a component of the PLP synthase complex of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.  
*Biochem J*, 2012, p.
- Roberts, F., Roberts, C.W., Johnson, J.J., Kyle, D.E., Krell, T., Coggins, J.R., Coombs, G.H., Milhous, W.K., Tzipori, S., Ferguson, D.J., Chakrabarti, D., and McLeod, R. (1998).** Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites.  
*Nature*, 1998, 393, (6687), p. 801-805.
- Sannella, A.R., Casini, A., Gabbiani, C., Messori, L., Bilia, A.R., Vincieri, F.F., Majori, G. and Severini, C. (2008).** New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metallogrug. exhibits potent antimalarial effects in vitro: mechanistic and pharmacological implications.  
*FEBS Lett*, 2008, 582, (6), p. 844-847.
- Sherman, I.W. (1977).** Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites.  
*Bull World Health Organ*, 1977, 55, p. 265-276.
- Shortt, H.E., and Garnham, P.C.C. (1948).** Pre-erythrocytic stages in mammalian malaria parasites.  
*Nature*, 1948, 161, p. 126.
- Song, L.J., Li, J.H., Xie, S.Y., Qian, C.Y., Wang, J., Zhang, W., Yin, X.R., Hua, Z.C. and Yu, C.X. (2012).** Thioredoxin Glutathione Reductase as a Novel Drug Target: Evidence from *Schistosoma japonicum*.  
*PLoS ONE*, 2012, 7, (2), e31456.
- Stocker, P., Lesgards, J.F., Vidal, N., Chalier, F. und Prost, M. (2003).** ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins.  
*Biochim Biophys Acta*, 2003, 1621, p. 1-8.
- Strohmeier, M., Raschle, T., Mazurkiewicz, J., Rippe, K., Sinning, I., Fitzpatrick, T.B., and Tews, I. (2006).** Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103, (51), p. 19284-19289.
- Trager, W., and Jensen, J.B. (1976).** Human malaria parasites in continuous culture.  
*Science*, 1976, 193, (4254), p. 673-675.

- Ursos, L.M., and Roepe, P.D. (2002).** Chloroquine resistance in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*.  
*Med Res Rev*, 2002, 22, (5), p. 465-491.
- Westheide, W., and Rieger, R. (1996).** Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere (Stuttgart: Gustav Fischer Verlag).
- Wetzel, D.K., Ehrenshaft, M., Denslow, S.A., and Daub, M.E. (2004).** Functional complementation between the PDX1 vitamin B<sub>6</sub> biosynthetic gene of *Cercospora nicotianae* and pdxJ of *Escherichia coli*.  
*FEBS Lett*, 2004, 564, p. 143-146.
- Wrenger, C., Eschbach, M.L., Muller, I.B., Warnecke, D., and Walter, R.D. (2005).** Analysis of the vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.  
*J Biol Chem*, 2005, 280, (7), p. 5242-5248.
- Yang, Y., Zhao, G., Man, T.K., and Winkler, M.E. (1998).** Involvement of the gapA- and epd (gapB)-encoded dehydrogenases in pyridoxal 5'-phosphate coenzyme biosynthesis in *Escherichia coli* K-12.  
*J Bacteriol*, 1998, 180, (16), p. 4294-4299.
- Yoo, M.H., Xu, X.M., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N. and Hatfield, D.L. (2006).** Thio-redoxin reductase deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells.  
*J. Biol. Chem.*, 2006, 281, p. 13005–13008.
- Zein, F., Zhang, Y., Kang, Y.N., Burns, K., Begley, T.P., and Ealick, S.E. (2006).** Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*.  
*Biochemistry*, 2006, 45, (49), p. 14609-14620.
- Zhu, J., Burgner, J.W., Harms, E., Belitsky, B.R., and Smith, J.L. (2005).** A new arrangement of ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrels in the synthase subunit of PLP synthase.  
*J Biol Chem*, 2005, 280, (30), p. 27914-27923.

## Anlagen

A. Übersichtstabelle der Restaktivitäten und IC<sub>50</sub>-Werte

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Mittelwerte der ermittelten Restaktivitäten von Pdx1, Pdx2 und der PLP-Synthase unter Einfluss der getesteten Substanzen, sowie die jeweiligen Standardabweichungen. Weiterhin sind die errechneten IC<sub>50</sub>-Werte auf das Wachstum von HepG2-Zellen und Plasmodien aufgeführt.

**Tabelle 12: Übersicht über die Mittelwerte der Restaktivitäten und IC<sub>50</sub>-Werte aus den verschiedenen Assays.**

		Restaktivität [%]			IC <sub>50</sub> [μM]	
		Pdx2	Pdx1	PLP-Synthase	HepG2	3D7
Sigma	Au	1,5 ± 0,3	91,0 ± 5,8	32,7 ± 4,9	3,5 ± 0,6	2,8 ± 0,5
Oxeltis	1	107,5 ± 10,0	90,3 ± 7,9	95,0 ± 13,2	-	-
Oxeltis	2	108,5 ± 8,0	92,3 ± 9,2	96,0 ± 5,3	-	-
Oxeltis	3	104,1 ± 5,5	90,3 ± 5,5	95,3 ± 15,9	-	-
Oxeltis	4	99,2 ± 4,0	87,3 ± 7,8	76,7 ± 7,8	-	-
Oxeltis	5	104,0 ± 6,0	91,3 ± 9,1	96,3 ± 5,0	-	-
Oxeltis	6	102,5 ± 6,9	94,3 ± 7,6	86,3 ± 5,7	-	-
Oxeltis	7	103,1 ± 12,8	96,0 ± 9,0	84,7 ± 7,4	-	-
Oxeltis	8	102,1 ± 6,4	92,3 ± 8,1	84,0 ± 8,8	-	-
Oxeltis	9	101,0 ± 13,2	92,3 ± 5,7	104,0 ± 6,9	-	-
Oxeltis	10	95,5 ± 11,1	91,3 ± 7,9	86,0 ± 3,0	-	-
Oxeltis	11	104,2 ± 10,7	93,3 ± 7,6	93,3 ± 7,6	>300 *	-
Oxeltis	12	106,0 ± 11,4	95,5 ± 6,4	91,7 ± 6,8	>300 *	-
Oxeltis	13	104,0 ± 15,0	97,3 ± 4,6	94,0 ± 7,8	>300 *	-
Oxeltis	14-0	95,4 ± 16,8	97,8 ± 6,2	95,3 ± 7,5	107,7 ± 15,8	-
Molport	14-M	3,2 ± 0,4	65,0 ± 10,2	60,3 ± 10,5	92,4 ± 10,6	5,7 ± 0,3
Molport	15	3,4 ± 0,5	32,3 ± 3,2	39,8 ± 4,9	13,2 ± 1,9	9,2 ± 1,6
Molport	16	83,1 ± 10,8	100,0 ± 7,7	91,3 ± 9,7	123,5 ± 14,6	7,8 ± 0,6
Oxeltis	17	83,7 ± 3,7	97,8 ± 4,1	92,7 ± 6,7	>300 *	-
Molport	18	103,1 ± 11,8	79,4 ± 8,6 **	63,0 ± 9,6 **	>300 *	59,1 ± 10,8
Molport	19	15,0 ± 2,0	71,0 ± 7,3	53,0 ± 10,2	>300 *	6,8 ± 0,5
Molport	20	1,5 ± 0,2	78,8 ± 2,9	44,7 ± 4,9	41,5 ± 3,1	46,7 ± 6,8
Oxeltis	21	96,5 ± 4,5	102,8 ± 8,8	88,3 ± 2,9	>300 *	-
Molport	22	11,5 ± 1,0	98,0 ± 9,3	86,0 ± 5,3	>300 *	> 100 *
Molport	23	48,2 ± 0,4	89,5 ± 5,1	80,7 ± 4,5	>300 *	> 100 *
Oxeltis	24	94,3 ± 79,7 **	56,7 ± 18,5 **	-34,0 ± 14,1 **	195,2 ± 10,9	-
Oxeltis	25	103,8 ± 8,3	103,8 ± 9,4	97,0 ± 6,0	37,9 ± 3,3	-
Oxeltis	26	103,5 ± 10,9	96,0 ± 5,7	103,0 ± 4,4	>300 *	-
Molport	27	51,5 ± 7,9	97,3 ± 7,7	96,3 ± 3,1	>300 *	12,6 ± 0,6

## Anlagen

---

		Restaktivität [%]			IC <sub>50</sub> [μM]	
		Pdx2	Pdx1	PLP-Synthase	HepG2	3D7
Evotec	E1	13,3 ± 2,4	94,2 ± 13,1	43,3 ± 22,0	4,6 ± 0,7	0,4 ± 0,1
Evotec	E2	8,7 ± 1,7	87,6 ± 8,5	36,0 ± 6,1	5,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1
Evotec	E3	12,0 ± 2,5	91,5 ± 11,4	69,7 ± 12,7	2,4 ± 0,5	0,6 ± 0,1
Evotec	E4	24,6 ± 4,7	92,1 ± 4,7	81,7 ± 6,0	15,3 ± 1,3	1,3 ± 0,3
Evotec	E5	13,3 ± 1,9	97,1 ± 12,2	83,0 ± 10,0	7,7 ± 1,1	1,0 ± 0,1
Evotec	E6	21,5 ± 9,8	92,5 ± 10,4	46,0 ± 31,5	6,0 ± 1,0	0,7 ± 0,1
Evotec	E7	10,2 ± 1,9	95,5 ± 3,9	88,0 ± 14,5	14,8 ± 0,9	1,5 ± 0,3
Evotec	E8	14,6 ± 1,1	90,9 ± 5,1	83,7 ± 11,9	7,8 ± 1,6	1,1 ± 0,2
Evotec	E9	15,5 ± 1,9	96,3 ± 7,4	78,0 ± 7,0	15,3 ± 0,7	1,7 ± 0,3
Evotec	E10	14,9 ± 1,5	94,7 ± 13,0	83,3 ± 7,1	5,6 ± 0,8	0,9 ± 0,2

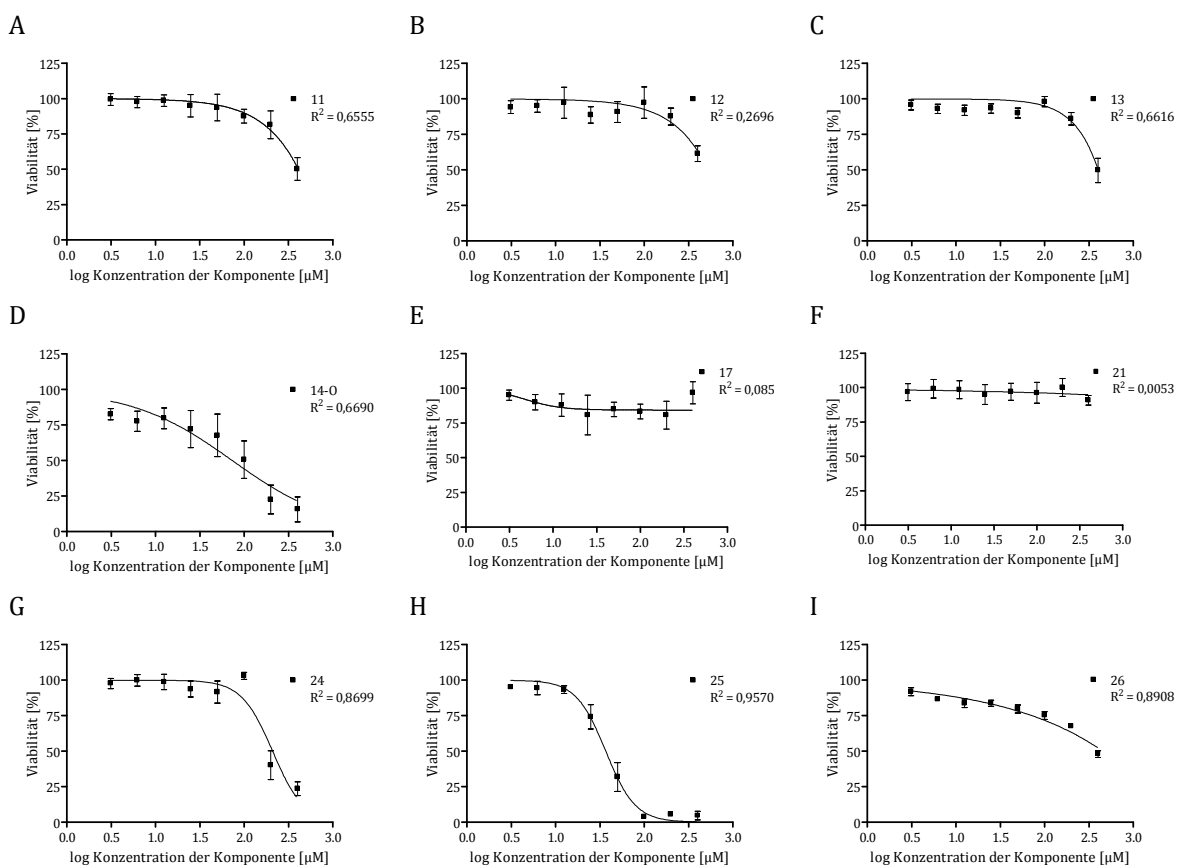
\* Im untersuchten Konzentrationsbereich konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden.

\*\* Eigenabsorption der Komponenten interferiert mit der Detektion von APADH/PLP.

---

## B. Dosis-Wirkungskurven und IC<sub>50</sub>-Werte der Zytotoxizität der HTS-Komponenten auf HepG2-Zellen

In der nachfolgenden Abbildung sind die Dosis-Wirkungskurven der Komponenten dargestellt, die auf *PfPdx1*, *PfPdx2*, die PLP-Synthase oder auf Plasmodien keine ausreichende Inhibierung gezeigt haben. Anhand dieser Kurven wurden die in Tabelle 12 gezeigten IC<sub>50</sub>-Werte auf das Wachstum der HepG2-Zellen berechnet.



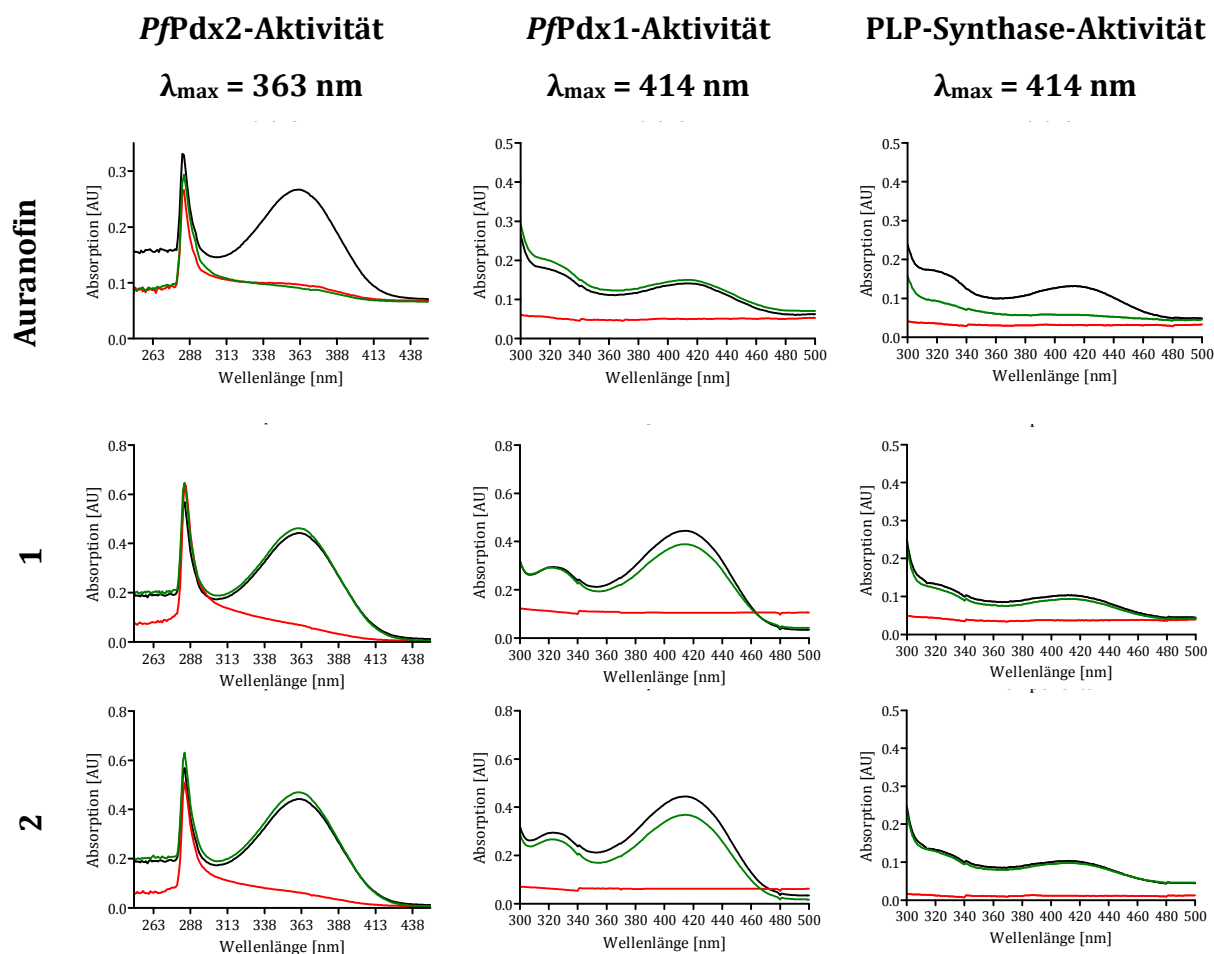
**Abbildung 30: Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven der inhibitorisch aktiven HTS-Komponenten und Auranofin auf das Wachstum von HepG2-Zellen.**

Dargestellt ist jeweils die Viabilität über die logarithmierte Konzentration (n = 3).

## C. Absorptionsspektren aus den drei Enzymaktivitätsassays

Um eine ggf. auftretende Eigenabsorption der getesteten Substanzen bei der Bewertung der erhaltenen Ergebnisse berücksichtigen zu können, wurden Absorptionsspektren aufgezeichnet, in denen der Reaktionsansatz/gehemmte Reaktion (●), die Negativkontrolle/Hintergrund (●) und eine Positivkontrolle/ungehemmt Reaktion (●) zu sehen sind. Nachfolgend sind repräsentative Spektren für die drei durchgeführten Enzymassays und die einzelnen getesteten Substanzen aufgeführt.

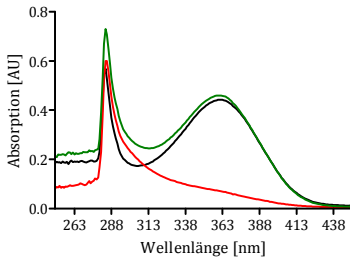
Es wurden jeweils 80  $\mu\text{M}$  der HTS-Komponente verwendet. Dazu kamen im Glutaminase-Aktivitätsassay 10 mM Glutamin, 15  $\mu\text{g}$  Pdx1 und 15  $\mu\text{g}$  Pdx2. Das Gesamtvolumen betrug 300  $\mu\text{l}$ . Im Pdx1-Aktivitätsassay wurden zusätzlich zur HTS-Komponente 200  $\mu\text{g}$  Pdx1, 0,5 mM R5P, 0,5 mM G3P, 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 100 mM Puffer W verwendet. Das Gesamtvolumen betrug 250  $\mu\text{l}$ . Beim PLP-Synthase-Aktivitätsassay wurden zusätzlich zu HTS-Komponente 100  $\mu\text{g}$  Pdx1, 100  $\mu\text{g}$  Pdx2, 10 mM Glutamin, 0,5 mM R5P, 0,5 mM G3P und 100 mM Puffer W gemischt und mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 250  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.



**PfPdx2-Aktivität**

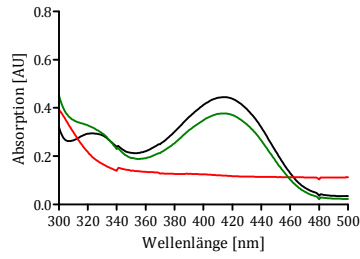
$\lambda_{\max} = 363 \text{ nm}$

3



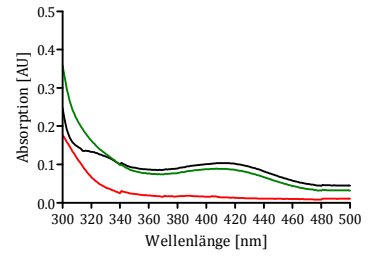
**PfPdx1-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

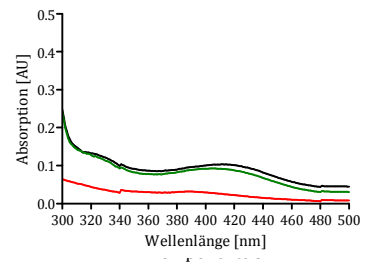
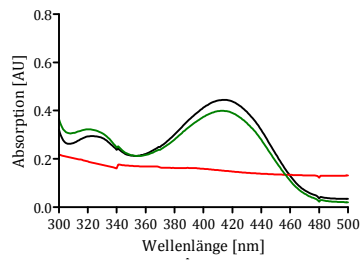
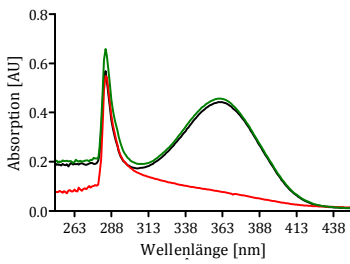


**PLP-Synthase-Aktivität**

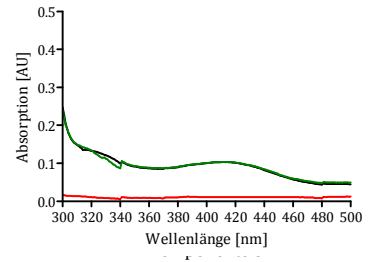
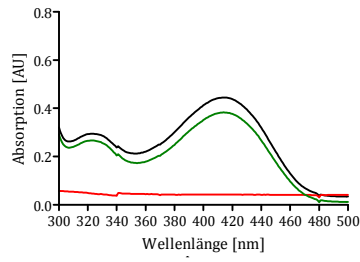
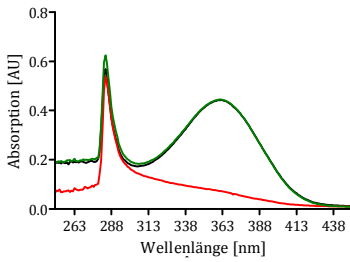
$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$



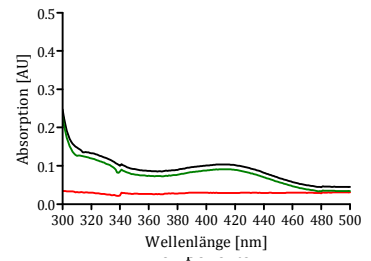
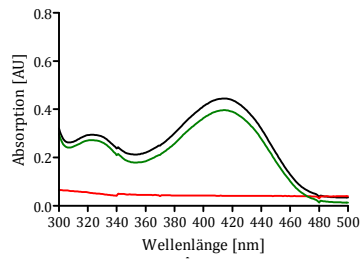
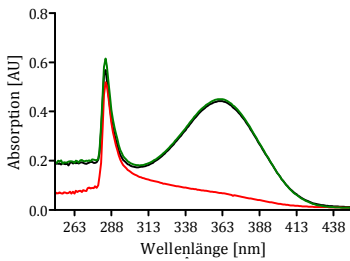
4



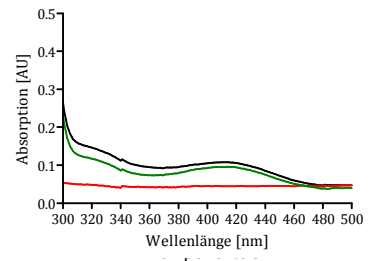
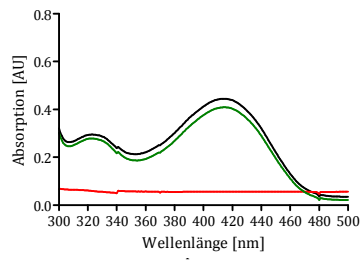
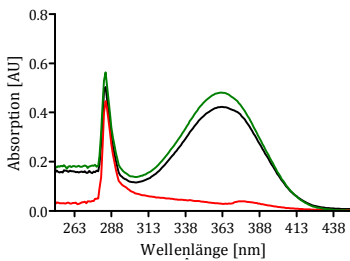
5



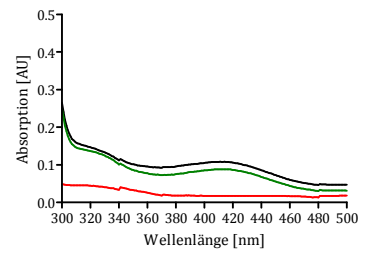
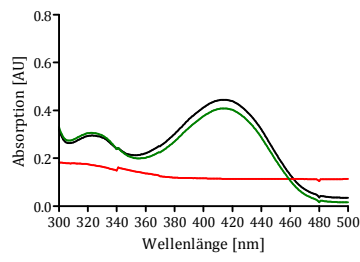
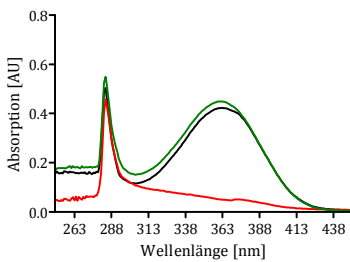
6



7



8



**PfPdx2-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 363 \text{ nm}$

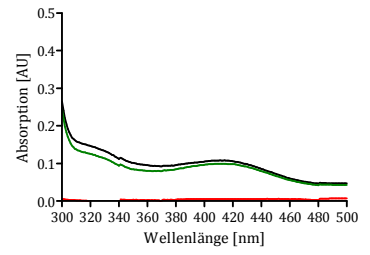
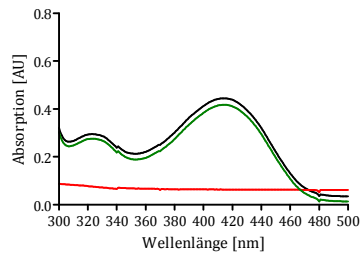
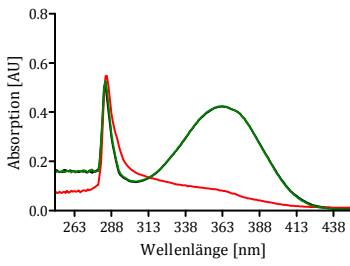
**PfPdx1-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

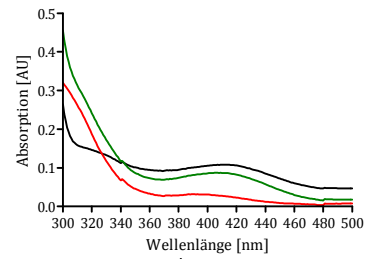
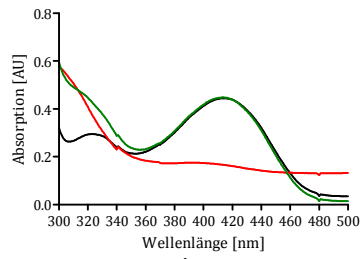
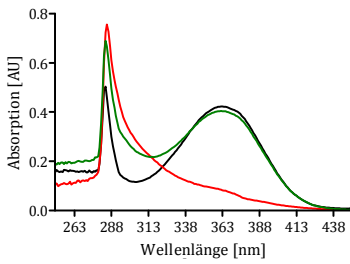
**PLP-Synthese-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

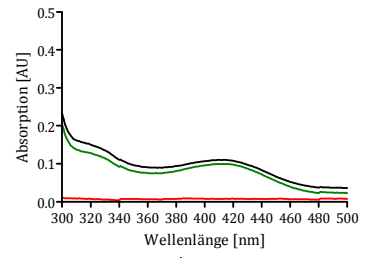
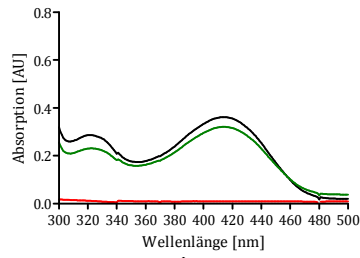
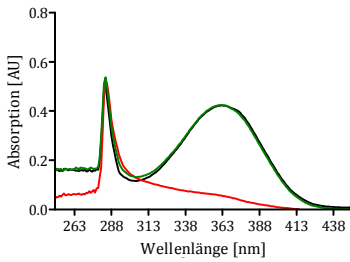
9



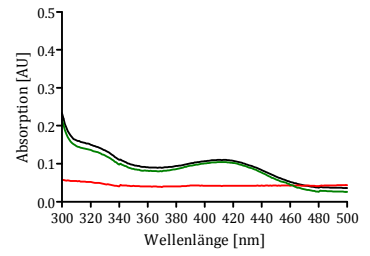
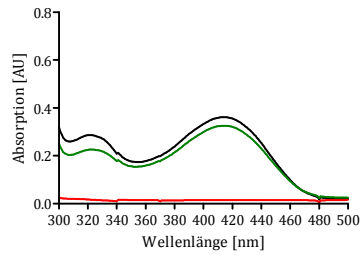
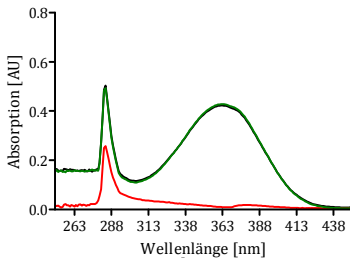
10



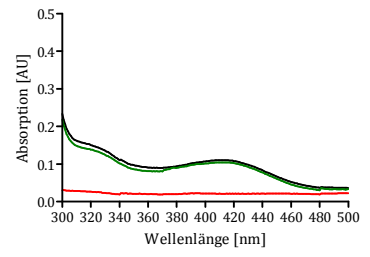
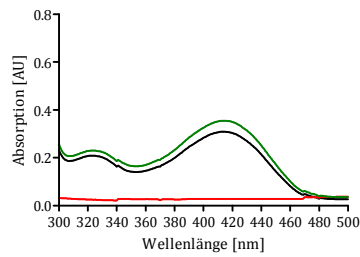
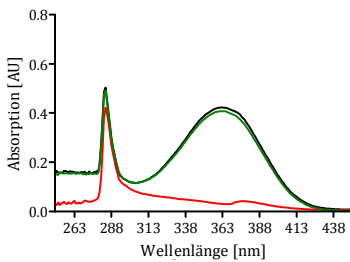
11



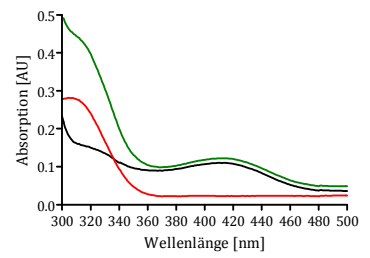
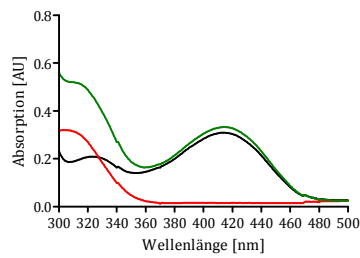
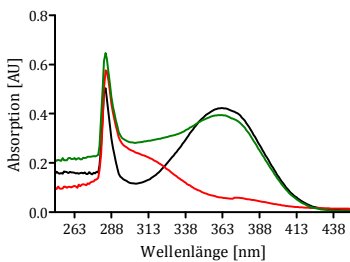
12



13



14-0





**PfPdx2-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 363 \text{ nm}$

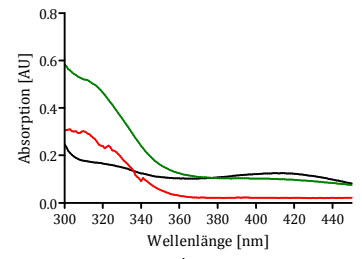
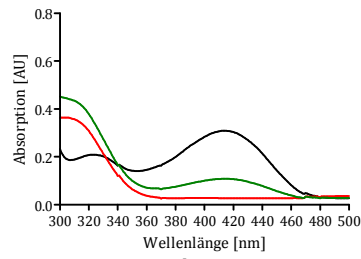
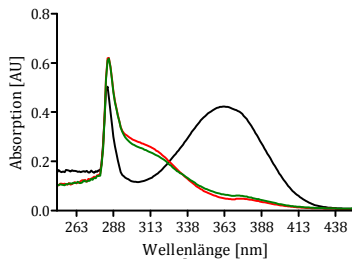
**PfPdx1-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

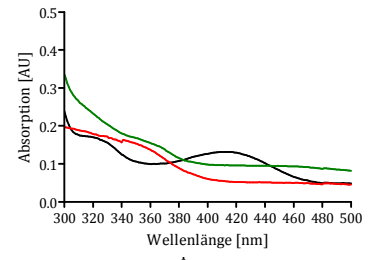
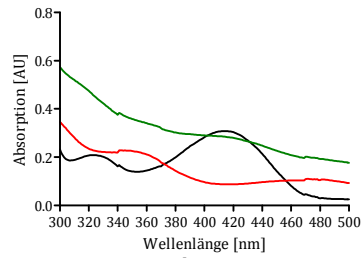
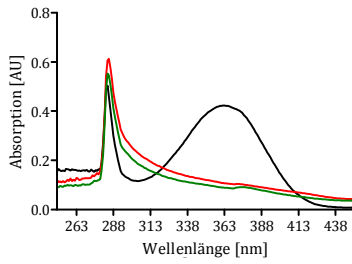
**PLP-Synthese-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

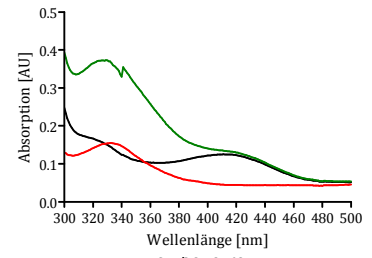
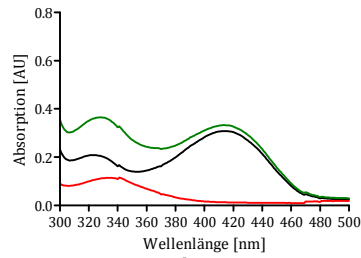
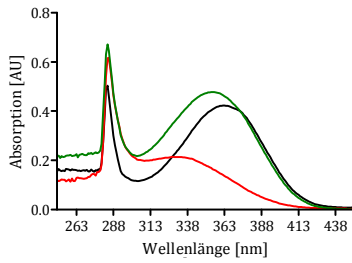
**14-M**



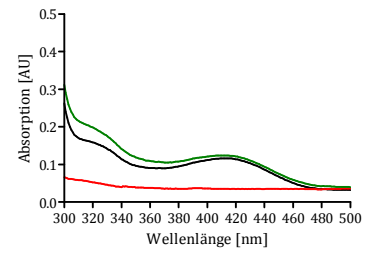
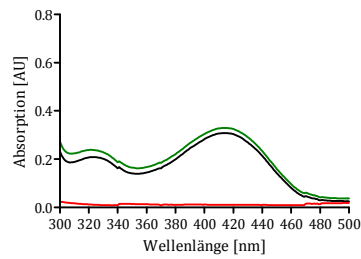
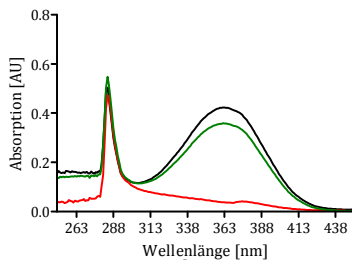
**15**



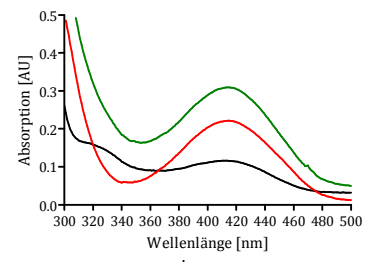
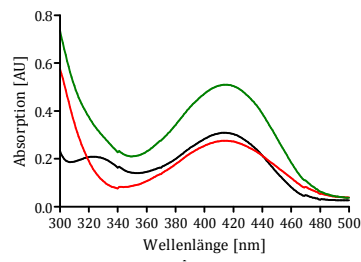
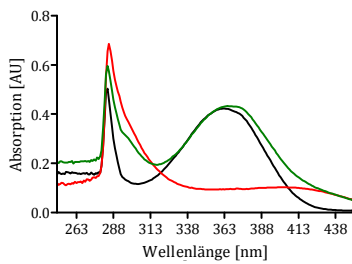
**16**



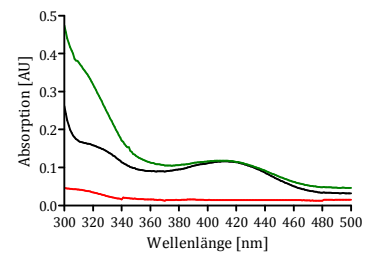
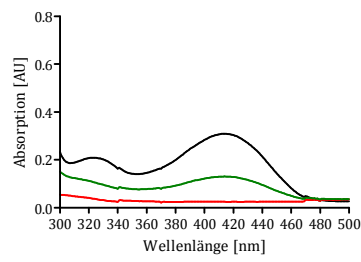
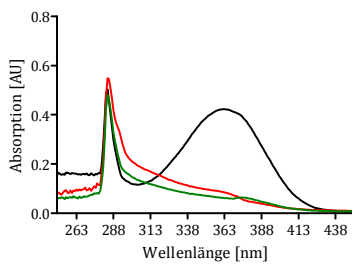
**17**



**18**



**19**



**PfPdx2-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 363 \text{ nm}$

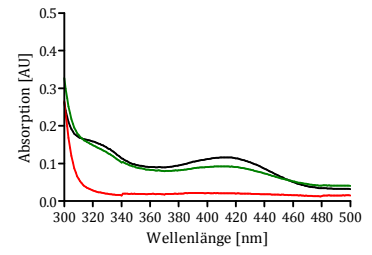
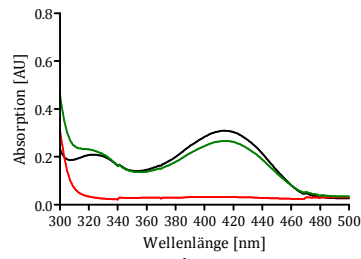
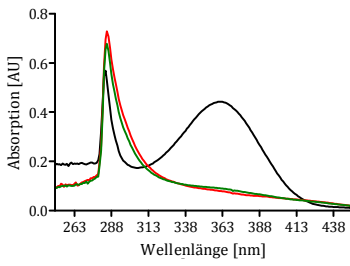
**PfPdx1-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

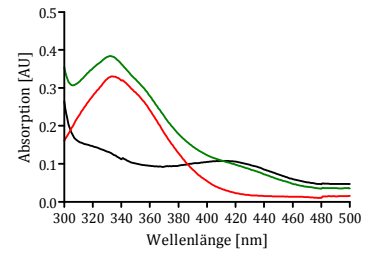
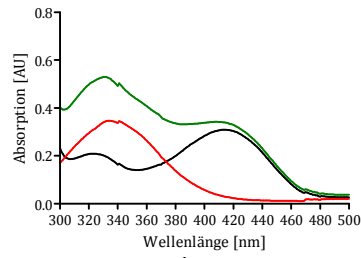
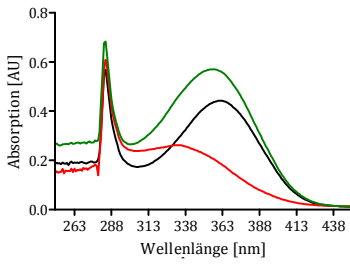
**PLP-Synthase-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

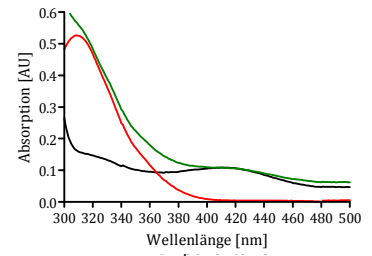
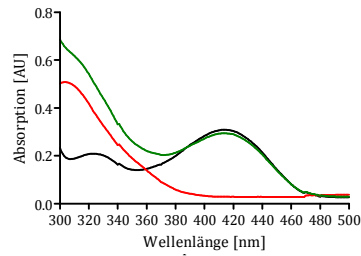
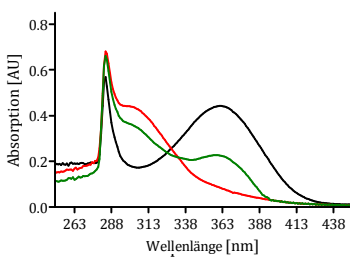
20



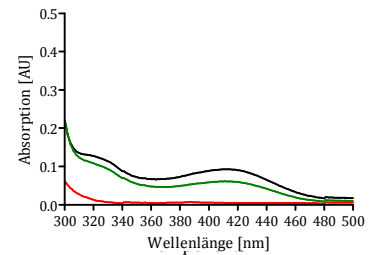
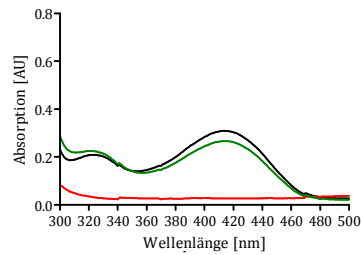
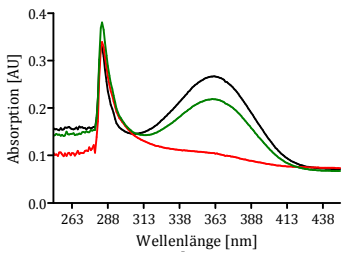
21



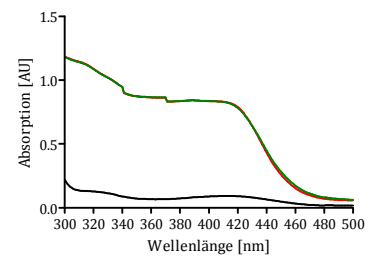
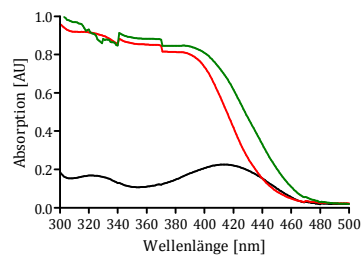
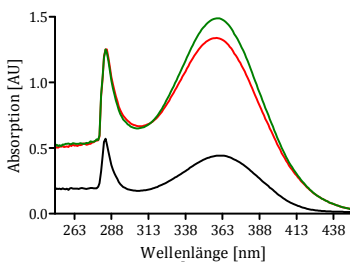
22



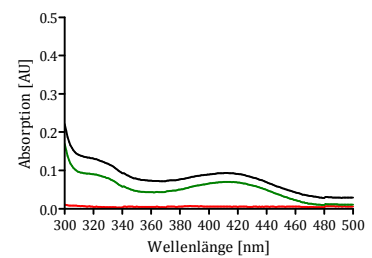
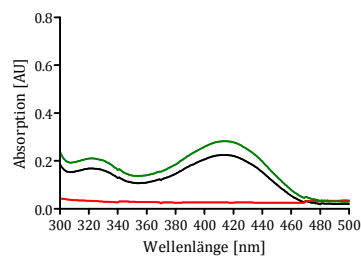
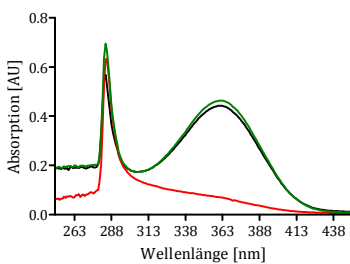
23



24



25



***PfPdx2*-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 363 \text{ nm}$

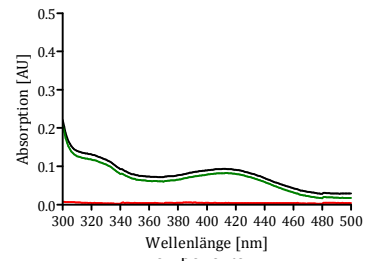
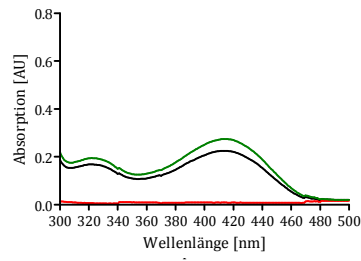
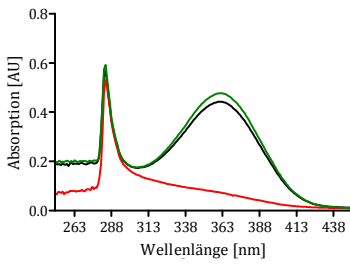
***PfPdx1*-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

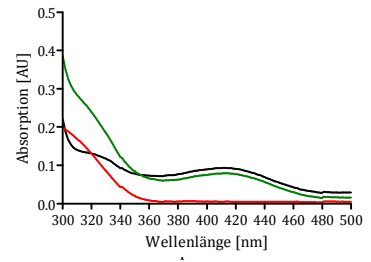
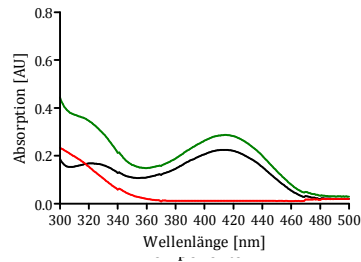
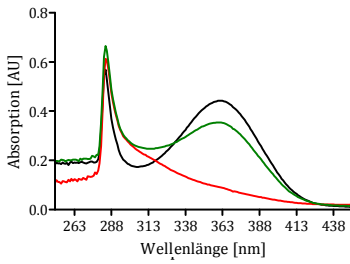
**PLP-Synthese-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

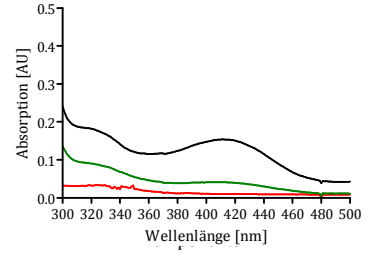
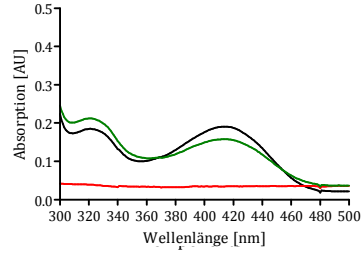
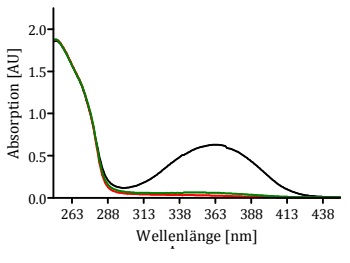
**26**



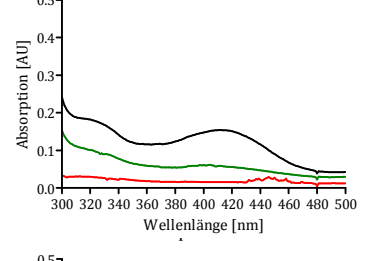
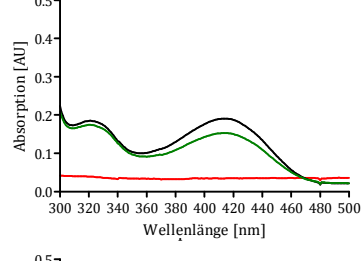
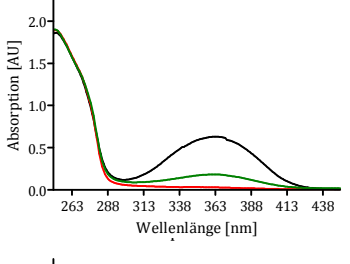
**27**



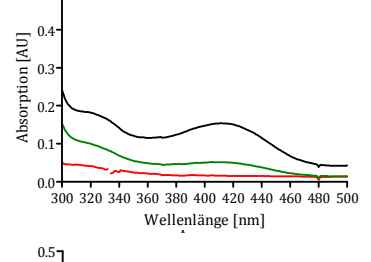
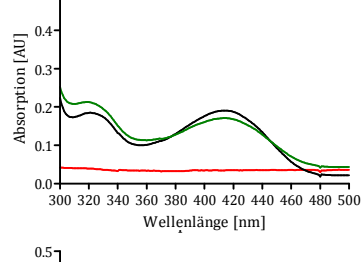
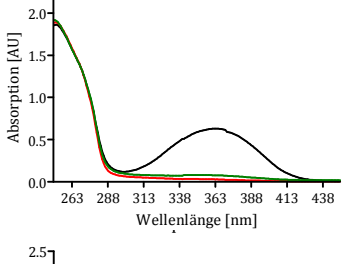
**E1**



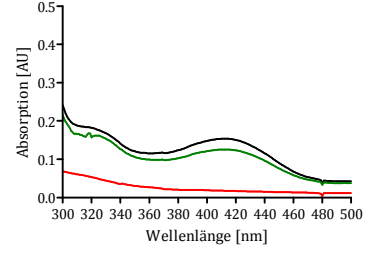
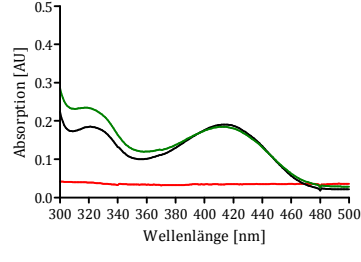
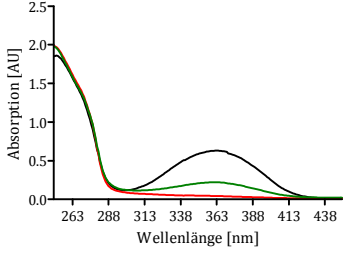
**E2**



**E3**



**E4**



***PfPdx2*-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 363 \text{ nm}$

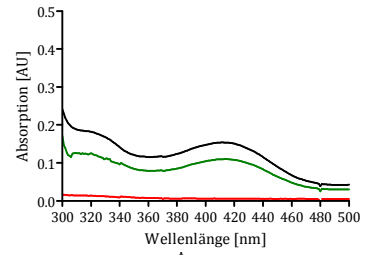
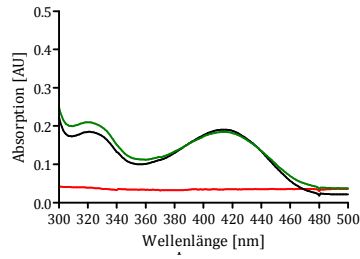
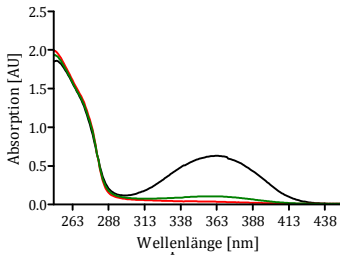
***PfPdx1*-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

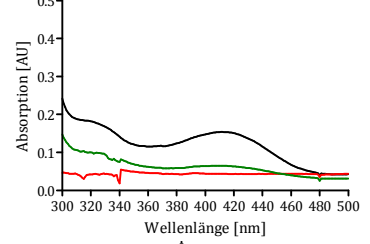
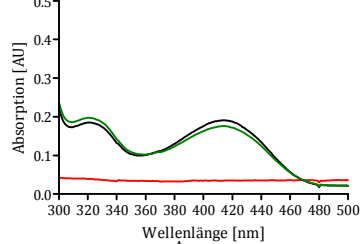
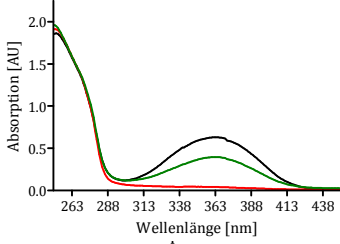
**PLP-Synthase-Aktivität**

$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$

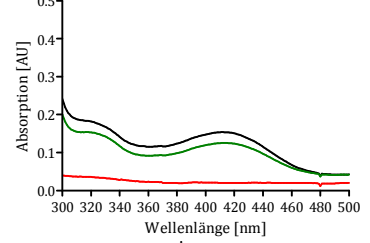
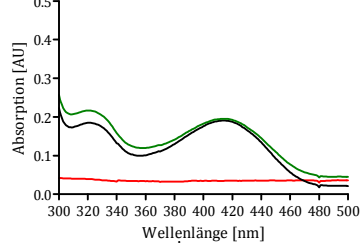
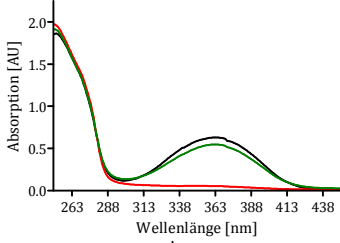
**E5**



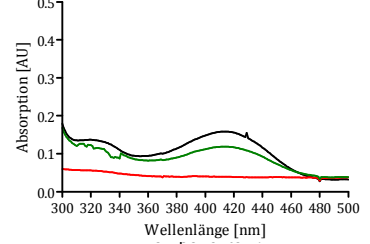
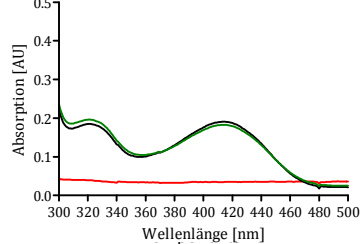
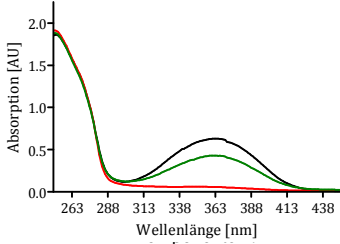
**E6**



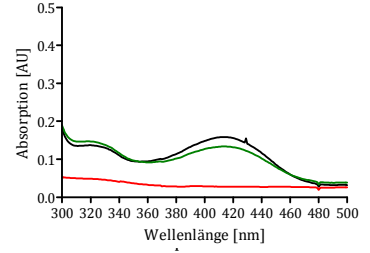
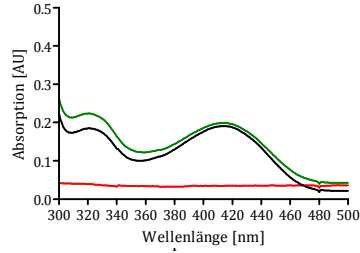
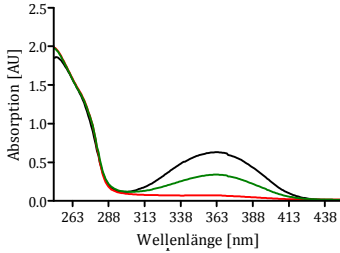
**E7**



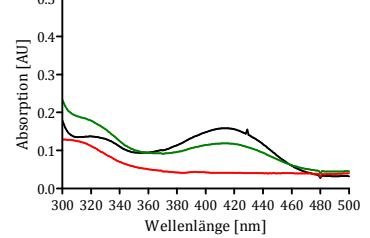
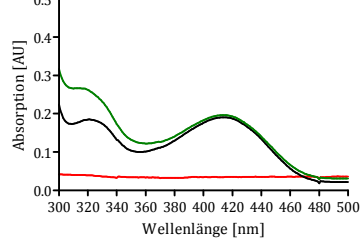
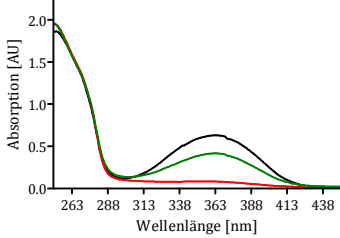
**E8**



**E9**



**E10**



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Master Thesis ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn entsprechende aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Weiterhin bestätige ich, dass diese Arbeit nicht bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

*Madlen Hotze*

Hamburg, 14. März 2013