

Aus dem Institut für Virologie
des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
mit Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität

Direktor: Prof. Dr. S. Becker

**Konstruktion und Charakterisierung einer
Mutante des GPI-Biosyntheseweges von
*Plasmodium falciparum***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von

Caroline Julia Marlies Dorn

aus Würzburg

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 24.09.2009.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. T. Schwarz

Korreferent: Prof. Dr. S. Becker

Meinen Eltern und meinem Bruder Philipp

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| I.TITELBLATT..... | 1 |
| II.INHALTSVERZEICHNIS..... | 2 |
| III.ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 5 |
| IV.VORWORT..... | 8 |
| 1. EINLEITUNG..... | 9 |
| 1.1 Die Bedeutung der Malaria..... | 9 |
| 1.2 Malaria bei Kindern..... | 13 |
| 1.3 Die Erreger..... | 15 |
| 1.3.1 Malaria tertiana (<i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i>) und quartana (<i>P. malariae</i>)..... | 15 |
| 1.3.2 Malaria tropica..... | 16 |
| 1.3.3 Die Morphologie..... | 17 |
| 1.3.4 Der Entwicklungszyklus..... | 22 |
| 1.4 Pathologie..... | 26 |
| 1.4.1 Makroskopische und mikroskopische pathologische Anatomie..... | 26 |
| 1.5 Pathophysiologie der Malariaerkrankung..... | 28 |
| 1.6 Immunologie..... | 31 |
| 1.7 Klinik der Malariaerkrankung (eine Zusammenfassung)..... | 36 |
| 1.8 Diagnostik der Malariaerkrankung..... | 37 |
| 1.9 Therapie und Prophylaxe der Malariaerkrankung..... | 40 |
| 1.9.1 Therapie..... | 40 |
| 1.9.2 Prophylaxe..... | 47 |
| 1.10 Glykosylphosphatidylinositole..... | 48 |
| 1.10.1 Struktur und Vorkommen der GPIs..... | 50 |
| 1.10.2 GPIs bei <i>Plasmodium falciparum</i> | 51 |
| 1.10.3 Biosynthese der GPIs..... | 56 |
| 1.10.4 Funktion und Bedeutung der GPIs..... | 58 |
| 1.11 Dol-P-Man..... | 61 |
| 1.12 Angeborene Defekte der Glykosylierung (Congenital disorders of Glycosylation, CDG)..... | 63 |
| 2. ZIELSETZUNG..... | 66 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN..... | 68 |
| 3.1 MATERIAL..... | 68 |
| 3.1.1 Geräte..... | 68 |
| 3.1.2 Chemikalien, Enzyme und „Kits“..... | 69 |
| 3.1.3 Bakterien, Hefen, Plasmide, Parasiten und Oligonukleotide..... | 70 |
| 3.1.3.1 Bakterien: <i>E.coli</i> -Stämme..... | 70 |
| 3.1.3.2 Hefen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)..... | 71 |
| 3.1.3.3 Parasiten..... | 71 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.4 | Vektoren..... | 71 |
| 3.1.4.1 | Der pGTPneo46-Vektor..... | 71 |
| 3.1.4.2 | Der pCR®2.1 TOPO-Vektor..... | 72 |
| 3.1.4.3 | Der pcDNA3.1D/V5-His-TOPO®-Vektor..... | 74 |
| 3.1.4.4 | Der pRS426-Vektor..... | 75 |
| 3.1.4.5 | Der pMAL-c2E-Vektor..... | 76 |
| 3.1.5 | Oligonukleotide..... | 77 |
| 3.1.6 | Puffer, Lösungen und Nährmedien..... | 79 |
| 3.1.6.1 | Lösungen..... | 79 |
| 3.1.6.2 | Puffer..... | 80 |
| 3.1.6.3 | Nährmedien für Bakterien, Hefen und <i>P. falciparum</i> | 82 |
| 3.1.6.3.1 | Nährmedien für Bakterien und Hefen..... | 82 |
| 3.1.6.3.2 | Medium für die <i>in-vitro</i> -Kultivierung von <i>P. falciparum</i> | 84 |
| 3.2 | METHODEN..... | 86 |
| 3.2.1 | <i>In-vitro</i> -Kultivierung von <i>P. falciparum</i> | 86 |
| 3.2.1.1 | Züchtungsbedingungen..... | 86 |
| 3.2.1.2 | Kontrolle der Vermehrung der Parasiten..... | 86 |
| 3.2.1.3 | Kyrostabilisate der Parasiten..... | 86 |
| 3.2.1.4 | Isolieren der Parasiten aus der <i>in-vitro</i> -Kultur..... | 87 |
| 3.2.1.5 | Transfektion von <i>P. falciparum</i> | 88 |
| 3.2.2 | Züchtung und Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 88 |
| 3.2.2.1 | Anzucht und Stammkonservierung..... | 88 |
| 3.2.2.2 | Transformation von Hefezellen in kleinem Maßstab..... | 88 |
| 3.2.3 | Transformation von Bakterien mit Plasmiden und Plasmidisolierung..... | 89 |
| 3.2.3.1 | Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> | 89 |
| 3.2.3.2 | Durchführung der Transformation..... | 90 |
| 3.2.3.3 | Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> | 90 |
| 3.2.4 | Aufarbeitung und Analyse von DNA..... | 90 |
| 3.2.4.1 | Plasmodien-DNA Isolierung..... | 90 |
| 3.2.4.2 | DNA-Reinigung durch Phenol-Choloroform-Extraktion..... | 91 |
| 3.2.4.3 | Fällen und Waschen von DNA..... | 91 |
| 3.2.4.4 | Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten..... | 91 |
| 3.2.4.5 | Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen..... | 92 |
| 3.2.4.6 | Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA..... | 92 |
| 3.2.4.7 | Restriktion von DNA..... | 92 |
| 3.2.4.8 | Dephosphorylierung von DNA..... | 93 |
| 3.2.4.9 | Ligation von DNA..... | 94 |
| 3.2.5 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und DNA-Sequenzierung..... | 94 |
| 3.2.5.1 | Gewinnung, Reinigung, Mutation und Klonierung von DNA-Fragmenten..... | 94 |
| 3.2.5.2 | Site Mutagenesis..... | 95 |
| 3.2.5.3 | Enzymatische Sequenzierung von DNA..... | 96 |
| 3.2.6 | DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung..... | 97 |
| 3.2.6.1 | Southern Blot..... | 97 |
| 3.2.6.2 | DNA-Hybridisierung..... | 98 |
| 3.2.6.3 | Nachweis markierter DNA..... | 98 |
| 3.2.7 | Nachweis von Proteinen..... | 99 |
| 3.2.7.1 | SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese..... | 99 |
| 3.2.7.2 | Proteinfärbung mit Coomassie Blau..... | 101 |
| 3.2.7.3 | Western Blot..... | 102 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2.8 | Computer Software..... | 104 |
| 4. | ERGEBNISSE..... | 105 |
| 4.1 | Erstellung einer <i>P. falciparum</i> -Mutante mit Gst/Flag-markiertem DPM1-Protein... 105 | 105 |
| 4.1.1 | Charakterisierung der Dol-P-Man-Synthase von <i>P. falciparum</i> und Vergleich mit anderen Organismen..... | 105 |
| 4.1.1.2 | Gegenüberstellung des DPM1-Proteins von <i>P. falciparum</i> und <i>S. cerevisiae</i> | 106 |
| 4.1.1.3 | Nukleotid- und Aminosäuresequenz des DPM1-Gens von <i>P. falciparum</i> | 106 |
| 4.1.1.4 | Mögliche Sekundärstruktur des DPM1-Proteins von <i>S. cerevisiae</i> | 109 |
| 4.1.1.5 | Mögliche Sekundärstruktur des DPM1-Proteins von <i>P. falciparum</i> | 110 |
| 4.1.1.6 | Vergleich potentieller Transmembrandomänen zwischen dem DPM1-Protein von <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>T. brucei</i> und mit Gst/Flag markiertem PfDPM1..... | 112 |
| 4.1.1.7 | Vergleich potentieller posttranslationaler Modifizierungen des DPM1-Proteins von <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. falciparum</i> | 114 |
| 4.1.2 | Expression des Gst/Flag markierten DPM1-Proteins in <i>P. falciparum</i> | 115 |
| 4.1.2.1 | Das Expressionssystem in <i>P. falciparum</i> | 115 |
| 4.1.2.2 | Der Expressionsvektor pGTPneo46..... | 115 |
| 4.1.2.3 | Zwischenklonierung des PfDPM1-Gens in den pCR®TOPO-Vektor..... | 116 |
| 4.1.2.4 | Klonierung von Gst/Flag-markiertem PfDPM1 in pGTPneoe46..... | 117 |
| 4.1.3 | Transfektion des Konstruktes in Kultur von <i>P. falciparum</i> | 120 |
| 4.2 | Überexpression von Strep-tag-markiertem DPM1 in <i>P. falciparum</i> | 122 |
| 4.2.1 | Ziel des Experiments..... | 122 |
| 4.2.2 | Klonierung eines Strep-tag-markierten PfDPM1-Konstruktes..... | 123 |
| 4.2.3 | Transfektion des PfDPM1-Konstruktes in <i>P. falciparum</i> -Kultur..... | 126 |
| 4.2.4 | Nachweis des PfDPM1Strep-Proteins mittels Western Blot..... | 127 |
| 4.3 | Erstellung eines <i>S. cerevisiae</i> -Gst/Flag markierten DPM1-Konstruktes..... | 128 |
| 4.3.1 | Klonierung des markierten Gens in den pRS 426MET-Vektor..... | 128 |
| 4.3.2 | Ausplattierung der transformierten konditional letalen Mutante auf Permissiv- und Nichtpermissiv-Nährböden..... | 130 |
| 4.3.3 | Nachweis des Gst/Flag markierten DPM1-Proteins von <i>S. cerevisiae</i> mittels Western Blot..... | 132 |
| 5. | DISKUSSION..... | 133 |
| 5.1 | Kurze Übersicht der vorliegenden Ergebnisse..... | 133 |
| 5.2 | Charakterisierung des DPM1-Proteins von <i>P. falciparum</i> | 136 |
| 5.3 | Gegenüberstellung der Sequenzen des DPM1-Proteins von <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. brucei</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>S. pombe</i> und <i>P. falciparum</i> | 137 |
| 5.4 | Liegt eine Interaktion der Markersequenz Gst mit PfDPM1 vor?..... | 138 |
| 5.5 | Erkenntnisse zur Einordnung der parasitären DPM-Synthase aus Komplementierungsstudien..... | 139 |
| 5.6 | Ausblick..... | 143 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 145 |
| 7. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 149 |
| 8. | DANKSAGUNG..... | 182 |
| 9. | LEBENS LAUF..... | 183 |
| 10. | ERKLÄRUNG..... | 186 |
| 11. | VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER..... | 187 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| A | Adenosin |
| Abb. | Abbildung |
| Abs. | Absolut |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäuren |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| Bidest. | zweifach-destilliertes Wasser |
| Blast | Basic local alignment search tool program |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| cDNS | „copy-DNS“ (komplementäre DNS) |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| Da | Dalton |
| dATP | 2'Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | 2'Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| dGTP | 2'Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| <i>dhfr</i> | Dihydrofolatreduktase-Gen |
| DIG | Dioxygenin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS, DNA | Desoxyribonukleinsäure, Desoxyribonucleic acid |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| Dol-P-Man | Dolichol-Phosphat-Mannose |
| Dol-P-GlcNAc | Dolichol-Pyrophosphat-N-Acetyl-Glucosamin |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Äthylendiamin-tetraessigsäure (Ethylenediamine-tetraacetic acid) |
| Endkonz. | Endkonzentration |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | Enhanced Chemiluminescence |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| EST | expressed sequence tag |
| EtN | Äthanolamin (Ethanolamine) |
| EtOH | Äthanol (Ethanol) |
| <i>et al.</i> | <i>Et aliter</i> |
| F | Farad |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| g | Gravitationskonstante (g = 9,81 m/s) |
| GDP-Man | Guanosinediphosphat-Mannose |
| GlcN | Glucosamin |
| GlcNAc | N-acetyl-Glucosamin |
| °C | Grad Celsius |
| h | Stunde |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton (= 1000g/mol) |
| LB | Luria-Bertani |
| Lsg. | Lösung |
| M | Molar |

| | |
|-------------------------|--|
| Man | Mannose |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| µg | Mikrogramm |
| min | Minuten |
| mRNS | messenger RNS |
| NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| <i>neo</i> ^r | Neomycinphosphotransferase-Gen |
| N-terminal | Amino-terminal |
| OAc | Acetat |
| o.g. | oben genannt |
| OD | Optische Dichte |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| Pfu | Plaque forming Unit (Plaques bildende Einheiten) |
| RT | Raumtemperatur |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| Rpm | Rotation pro Minute |
| SD | Synthetic Dextrose |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| s.h. | siehe |
| T | Thymidin |
| TAE | Trisacetatessigsäure |
| TBE | Trisboratessigsäure |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| U | Units |
| V/V | Volumen pro Volumen |

Abkürzungen der Aminosäuren (Einbuchstaben-Code)

| | | | |
|---|----------|----------------|---------------------------------|
| A | Ala | Alanin | GCT, GCC, GCA und GCG |
| B | Asp, Asn | Asparaginsäure | GAT, GAC, AAT und AAC |
| C | Cys | Cystein | TGT und TGC |
| D | Asp | Asparaginsäure | GAT und GAC |
| E | Glu | Glutaminsäure | GAA und GAG |
| F | Phe | Phenylalanin | TTT und TTC |
| G | Gly | Glycin | GGT, GGC, GGA und GGG |
| H | His | Histidin | CAT und CAC |
| I | Ile | Isoleucin | ATT, ATC und ATA |
| K | Lys | Lysin | AAA und AAG |
| L | Leu | Leucin | TTG, TTA, CTT, CTC, CTA und CTG |
| M | Met | Methionin | ATG |
| N | Asn | Asparagin | AAT und AAC |
| P | Pro | Prolin | CCT, CCC, CCA und CCG |
| Q | Gln | Glutamin | CAA und CAG |
| R | Arg | Arginin | CGT, CGC, CGA, CGG, AGA und AGG |
| S | Ser | Serin | TCT, TCC, TCA, TCG, AGT und AGC |

| | | | |
|---|----------|------------|-----------------------|
| T | Thr | Threonin | ACT, ACC, ACA und ACG |
| V | Val | Valin | TGG |
| W | Trp | Tryptophan | TGG |
| Y | Tyr | Tyrosin | TAT und TAC |
| Z | Glu, Gln | Glutamin | GAA, GAG, CAA und CAG |
| * | End | Terminator | TAA, TAG und TGA |

VORWORT

Die umfangreiche Einleitung dieser Arbeit ist für eine medizinische Doktorarbeit sicher ungewöhnlich. Ich habe jedoch versucht, das extensive Kapitel der Malariaerkrankung sowohl unter epidemiologischen, immunologischen, parasitologischen und therapeutischen Gesichtspunkten zu beleuchten. Neben der Abhandlung dieses medizinischen Themenkomplexes stellte sich die Aufgabe, auch auf die Biochemie der GPIs und die Bedeutung dieser Moleküle, insbesondere für die Malaria, einzugehen.

1. EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung der Malaria

Malaria ist eine Erkrankung, die durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht wird. Sie werden von weiblichen Stechmücken der Gattung *Anopheles* übertragen, die durch Speichelabgabe beim Blutsaugen dem Menschen die infektiösen Sporozoiten inokulieren (siehe Abb. 7). Weltweit ist die Gattung *Anopheles* (griechisch: nutzlos, unvoreilhaft) mit etwa 400 Arten vertreten, von denen 50 Arten für die Übertragung der Malaria verantwortlich sind. Bisher sind jedoch nur vier humanpathogene Arten bekannt: *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica), *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* (Malaria tertiana) und *Plasmodium malariae* (Malaria quartana). Alle Malariaformen sind schwerwiegende Erkrankungen, doch nur die Malaria tropica ist unmittelbar lebensbedrohlich. Eine schnelle Diagnose und eine möglichst frühzeitige Therapie sind deshalb von größter Bedeutung für die Prognose.

Der Name der Malaria stammt aus dem Italienischen und ist im Zusammenhang mit der Vorstellung von krankmachender, schlechter Luft in Sumpfbereichen zu sehen, „mal aria“. Malaria ist eine der weltweit häufigsten und wichtigsten Infektionskrankheiten überhaupt. Sie tritt in tropischen und subtropischen Regionen aller Kontinente (bis auf Australien), in ca. 100 Ländern endemisch auf (Robert-Koch-Institut „Merkblätter für Ärzte“, 2006). 80-90% der Krankheits- und Todesfälle an Malaria treten im tropischen Afrika auf (WHO, 2004). Ausgedehnte Malariagebiete gibt es auch in Brasilien und angrenzenden Ländern Südamerikas, seltener in Mittelamerika sowie in Haiti und den angrenzenden Gebieten der Dominikanischen Republik, der einzigen Insel in der ansonsten malariafreien Karibik. Im Vorderen Orient findet sich die Malaria nur sporadisch; Malariagebiete erstrecken sich aber von Pakistan über China und Südostasien bis in den pazifischen Raum hinein. Ca. 40% der Weltbevölkerung lebt in malariaendemischen Gebieten, meist in Ländern der sogenannten „Dritten Welt“ (Robert-Koch-Institut, „Merkblätter für Ärzte, 2006; WHO 2007).

Jährlich infizieren sich ca. 300-500 Millionen Menschen mit dem Erreger (Greenwood & Mutabinga, 2002; WHO, 2007), mehr als 1 Million Menschen stirbt an der Infektion pro Jahr (WHO, 2007). Etwa die Hälfte sind Kinder unter fünf Jahren (Robert-Koch-Institut „Merkblätter für Ärzte“, 2006; Greenwood *et al.*, 1997). Es wird geschätzt, dass im Jahr 2002

2,2 Billionen Menschen der lebensbedrohlichen Gefahr einer Falciparum-Malariainfektion ausgesetzt waren (Snow et al., 2005, WHO, 2007).

In Europa, Nordamerika und Australien gibt es heute keine natürlich vorkommende Malaria mehr. Dies ist unter anderem auf erfolgreiche Eradikationsprogramme mit Insektiziden, wie beispielsweise DDT oder die Trockenlegung von Sumpfgebieten zurückzuführen (Payne, 2001). Noch bis Mitte des 20. Jahrhunderts war die Malaria in gemäßigten Klimazonen wie Griechenland, Italien oder Japan endemisch (Riley, 2000). Eine Verbreitungskarte der Malaria von 1920 (G. Venzmer: Geisseln der Tropen, Kosmos, Franckhsche Verlagshandlung, Stuttgart 1928) zeigt, dass auch Deutschland und England bis Kriegsende zu den endemischen Malariagebieten gehörten. Der letzte größere Seuchenherd mit über 1000 Erkrankten in einem Arbeiterlager am Tegeler See in Berlin erlosch erst 1947. Auch in Schweden und Finnland war die Malaria verbreitet, und russische Endemiegebiete reichten bis in den Raum Archangelsk an der Drina (64. Breitengrad) (Geigy & Herbig, 1955). Erst vor gut 30 Jahren wurde 1970 Italien und 1975, erstmals in seiner Geschichte, Europa, von der WHO zum malariefreien Gebiet erklärt.

1957 initiierte die WHO ein Programm, das die weltweite Ausrottung der Malariaparasiten zum Ziel hatte. Der Einsatz von DDT (Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan) zur Vektor-Eradikation (*Anopheles*) war zunächst äußerst erfolgreich. Parallel dazu suchte man die Vernichtung der Parasiten durch Einsatz von Chloroquin zu erreichen. Beispielsweise wurden von der U.S. International Cooperation Administration zwischen 1960 und 1962 schätzungsweise 300 Millionen Chloroquintabletten verteilt. Aber bereits 1969 waren die damaligen Bekämpfungsmaßnahmen im Kern gescheitert und mussten abgebrochen werden. Der flächendeckende Einsatz von Insektiziden hatte sich aufgrund zunehmender Resistenzentwicklung bei den Stechmücken (Vektoren) als ein nicht gangbarer Weg erwiesen. Bereits 1956 hatten die ersten 4 der 50 *Anopheles*-Arten Insektizid-Resistenz entwickelt. 1968 waren es bereits 38 Arten, und kurz darauf beobachtete man bei allen 50 möglichen Überträgerarten Einfach- oder sogar Mehrfachresistenzen (gegen mehrere Insektizide). Aus medizinischer Sicht war diese Entwicklung zunächst noch nicht beunruhigend, da mit Chloroquin ein sicheres Therapeutikum zur Verfügung stand. Das änderte sich Anfang der sechziger Jahre, als die ersten Malariaerreger den Schritt zur Resistenz vollzogen und in Venezuela und Thailand die ersten Chloroquin-resistenten Stämme auftraten (Abb. 1) (Schimitschek & Werner, 1985). Damit war klar, dass die zwischen 1958 und 1963 erzielten Erfolge der Malaria-Eradikation auf Dauer nicht haltbar sein würden.

Im Oktober 1998 begannen die WHO, UNICEF, UNDP und die Weltbank ein erneutes Programm, „Roll back Malaria“, um der Erkrankung Einhalt zu gebieten.

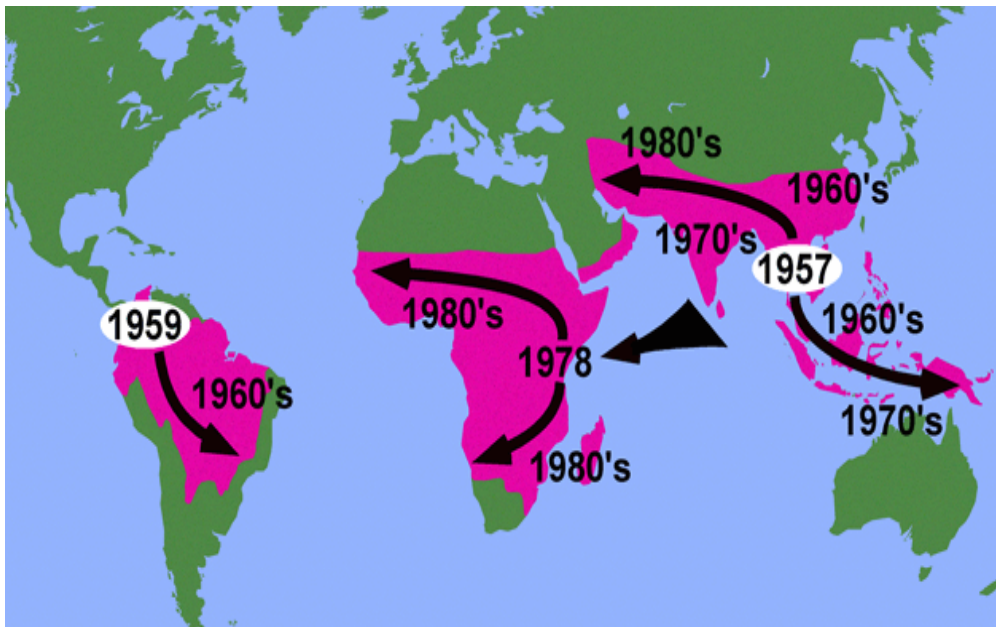


Abbildung 1:
Ausbreitung der
Chloroquin-
Resistenz

(Freundlich überlassen von Dorn, A.; La Roche, Basel)

Neben der kostengünstigen Verbreitung von mit Insektiziden behandelten Moskitonetzen wird die Versorgung von schwangeren Frauen mit Antimalariamitteln angestrebt, um schwerwiegende postnatale Konsequenzen einer Übertragung *in utero* zu verhindern. Darüber hinaus wird die Anwendung von Kombinationstherapien empfohlen, um einer Resistenzentwicklung vorzubeugen, wobei eine Komponente dieser Therapie gegen Falciparum-Malaria aus der Artemisinin-Gruppe stammen sollte (ACT= Artemisinin-based Combination Therapy) (Muheki *et al.*, 2004; Yeung *et al.*, 2004; WHO, 2007). Obwohl die Kombinationstherapie mit Artemisinin bei resistenter Malaria die größten Erfolge verspricht, ist die Behandlung in Endemiegebieten aufgrund zu hoher Kosten limitiert. Artemisinin wurde ursprünglich aus der chinesischen Pflanze qinghao, *Artemisia annua*, isoliert (Walker *et al.*, 2000). Der Hauptwirkstoff Artemisinin (chinesisch: qinghaosu = Extrakt aus qinghao) wird in der chinesischen Schrift „Wu shi er bing fang“, den „Rezepten gegen 52 Erkrankungen“ (168 v. Chr.) als Heilmittel gegen Hämorrhoiden empfohlen (Rowen, 2002). Ab dem 3. Jahrhundert wird Artemisinin zur Behandlung von Malaria-Fieberattacken eingesetzt (Ridley, 2003). Der Gehalt an Artemisinin schwankt in den Pflanzen in einem

weiten Bereich von 0,01% bis über 0,4%, mitunter auch bis zu 1% (Delabays, *et al.* 1993).

Wirtschaftlich ist Artemisinin nicht über chemische Synthese zu gewinnen (Ferreira & Janick 1996). Die Ursache ist vermutlich, dass Artemisinin nicht weniger als 9 Asymmetriezentren hat (Struktur siehe Abb.12). Der feldmäßige Anbau von *Artemisia annua* stellt daher die einzige sinnvolle Möglichkeit zur Gewinnung von Artemisinin dar.

Ein weiterer erstrebenswerter Ansatz des „Roll back Malaria“-Programmes stellt die Verbesserung des Zuganges zu medizinischer Versorgung dar. Ein großer Anteil an Todesfällen könnte durch eine früher einsetzende Behandlung verhindert werden (WHO, 2004). Einer Studie zufolge könnte die Verbreitung der Malaria um ca. 60% eingedämmt werden, wenn bei Auftreten einer Infektion das gesamte Umfeld des Erkrankten prophylaktisch behandelt werden würde (Africa Malaria Report, WHO 2003).

In den „malariafreien“ Ländern kam es hingegen in den letzten Jahren zu einem Anstieg der importierten Malariafälle. Häufig handelt es sich dabei um Infektionen, die auf einer Urlaubs- oder Geschäftsreise erworben wurden oder auch um die sogenannte „Flughafenmalaria“, die durch den unbeabsichtigten Transport von infizierten Anophelesmücken entsteht. Jährlich werden in Deutschland ca. 1000 Malaria-Fälle erfasst. Im Jahr 2004 wurden 707 Malaria-Erkrankungen gemäß dem Infektionsschutzgesetz gemeldet (Robert-Koch-Institut, „Merkblätter für Ärzte“; 2006), 2005 wurde von 628 Fällen in Deutschland berichtet (WHO, 2007). Der größte Anteil wird dabei aus afrikanischen Ländern importiert.

Um die Anzahl der Malariaerkrankungen weltweit zu reduzieren wird eine Immunisierung angestrebt, die einen zuverlässigen Schutz bieten könnte (Kerr, 2001).

Die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes gestaltet sich jedoch als schwierig. Der technische Aufwand zur Kultivierung von Plasmodien und Gewinnung von Probenmaterial ist groß. Eines der größten Probleme stellt jedoch die parasitäre Antigenvariation dar, denn jedes Entwicklungsstadium des Parasiten trägt unterschiedliche Antigene. Darüber hinaus spielt die erstaunliche Vielzahl parasitärer Proteine (mindestens 5000-6000) und das Unvermögen, ein spezifisches, immunologisches „Langzeitgedächtnis“ zu entwickeln, bei der Entwicklung eines Impfstoffes eine Rolle (Richie & Saul, 2002). Des Weiteren stellen die Zielgruppen eines Impfstoffes unterschiedliche Anforderungen: Ein Serum, das Ungeborene im Mutterleib vor der Sequestration infizierter Erythrozyten schützt, muss auf Grund der Plazentabeteiligung mit Interaktion an zahlreichen Rezeptoren anders gestaltet sein als eines, das Reisenden in malariaendemischen Gebieten vor der Infektion Schutz verleihen soll. Vielversprechende Kandidaten sind Antigene, zu welchen das Immunsystem Zugang besitzt, die schützende Immunität im Tiermodell erzielen und dabei keine oder möglichst wenig

Antigenvariation aufweisen (Richie & Saul, 2002). Viele Impfstoffe sind zur Zeit in Entwicklung, nur wenige wurden jedoch in klinischen Studien getestet. Zu den führenden Impfstoffkandidaten zählen beispielsweise das major merozoite surface protein 1 (MSP1) (Darko et al., 2005; Holder et al. 1999), sowie das *Plasmodium falciparum* multiple epitope (ME)- thrombospondin-related adhesion Protein (TRAP) (Moorthy et al., 2004) oder synthetisch hergestellte Glykosylphosphatidylinositole (GPIs) (Schofield et al., 2002). Diese schützten im Tierversuch bereits Mäuse vor Azidose, Lungenödemen und zerebralen Symptomen.

1.2 Malaria bei Kindern

Kinder stellen eine besondere Patientengruppe der Malaria dar. So ist diese Infektion Ursache für einen von fünf Todesfällen von Kindern in Afrika (WHO, 2007).

Über 40% der Kinder auf der Welt leben in Ländern, die als malariaendemisch gelten. 50% der Todesfälle an Malaria betreffen Kinder, die unter fünf Jahren alt sind und an einer Malaria tropica erkrankten (Snow et al., 1999). Kinder sind besonders betroffen, da sich die Immunität, die Erwachsene weitgehend vor schweren Krankheitsverläufen schützt, erst im Laufe von Jahren durch wiederholte Infektionen entwickeln muss (s. Kapitel „Immunologie“). Eine Malariainfektion in der Schwangerschaft kann zu einem geringeren Geburtsgewicht des Kindes führen, häufig auch zu einer Frühgeburt. Beide Aspekte bringen eine verlangsamte kognitive Entwicklung und häufig auch eine erhöhte neonatale Mortalität mit sich (Snow et al., 1999; Crawley & Nahlen, 2004) (s. auch Kapitel „Pathophysiologie“).

7% der Kinder, die eine zerebrale Malaria überleben, behalten als Folgeschäden häufig neurologische Probleme (Holding & Snow, 2001) wie Muskelschwäche, Spastik, Erblindung oder Epilepsie (WHO, 2004). Kinder, die sich scheinbar völlig von einer Malaria des Gehirns erholt haben, können im weiteren Verlauf jedoch kognitive Probleme wie Aufmerksamkeitsdefizite oder Störungen der Sprachentwicklung aufweisen (Holding et al., 1999).

Schätzungen zufolge leiden Kinder in Afrika an ca. 2 bis 6 Episoden von Fieberattacken, die durch Malaria verursacht werden (WHO, 2007), eine Zahl die je nach Region variiert (Murphy & Breman, 1999). Durch das Fieber reduziert sich der Appetit der Kinder, was zusätzlich die häufig schon bestehende Unterernährung fördert.

Ein weiterer durch Malaria provozierter Faktor, der die Entwicklung der betroffenen Kinder negativ beeinflusst, ist das Auftreten einer schweren Anämie im Krankheitsverlauf (Crawley

& Nahlen 2004). Obwohl Anämien auch durch Unterernährung, Haken- und Bandwurmbefall und HIV-Infektion verursacht werden können, ist die Malaria noch eine der wichtigsten Ursachen (Lusingu *et al.*, 2004). Bluttransfusionen könnten in dieser Situation zwar lebensrettend sein, jedoch ist die mögliche Infektion mit dem HI-Virus oder anderen durch Spenderblut übertragbare Infektionen gegen den Nutzen sorgfältig abzuwägen (WHO, 2004). Darüber hinaus sind kranke Kinder nicht in der Lage, am Schulunterricht teil zu nehmen oder müssen darauf verzichten, weil ein Familienmitglied erkrankt ist, dessen Aufgaben sie übernehmen müssen.

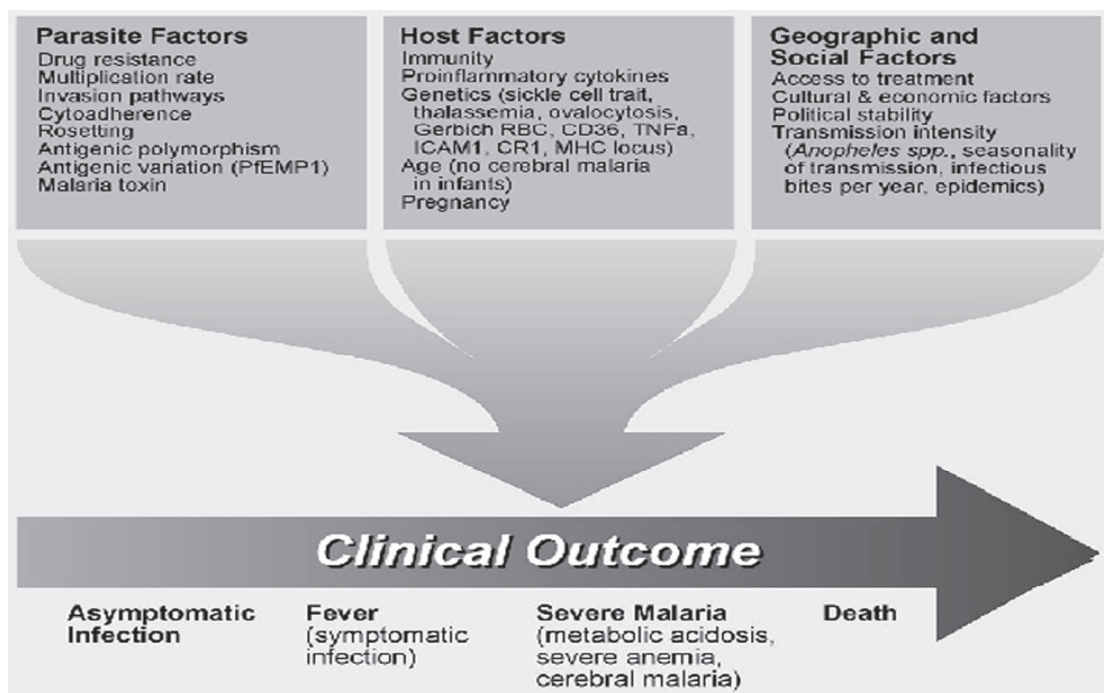


Abbildung 2: Einfluss verschiedener Malaria relevanter Faktoren auf die Erkrankung (Weatherall *et al.*, 2002).

Die klinischen Symptome der Malariaerkrankung bei einem afrikanischen Kind sind von parasitären, geographischen, sozialen und Wirtsfaktoren abhängig. Diese bewirken bei Kindern unterschiedlich schwere Krankheitsverläufe, von asymptomatischer Infektion über Fieber, komplizierter Infektion mit metabolischer Azidose, schwerer Anämie und zerebraler Malaria, bis hin zum Tod.

1.3 Die Erreger

Malariaerkrankungen werden von Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursacht, die der Ordnung *Hämosporida* angehören und der Familie *Plasmodiidae* zugeordnet sind (Lucius & Frank-Loos, 1997).

Es sind mehr als 170 Arten bekannt, die jedoch vor allem Tiere wie Vögel, Reptilien, Mäuse und Primaten infizieren (Boch & Supperer, 1992; Lucius & Loos-Frank, 1997).

Die Untersuchungen an asexuellen erythrozytären *in vitro* Kulturen von *Plasmodium falciparum*, sowie auch von nicht humanpathogenen Arten, wie *Plasmodium berghei* und *Plasmodium yoelii*, Erreger der Mäusemalaria (Singh *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2004) und *Plasmodium knowlesi*, einem Erreger, der sich auf Affen übertragen lässt (Collins *et al.*, 2004), haben viel zum Verständnis der Pathogenese der Malariaerkrankung beigetragen (Miller *et al.*, 2002).

Auf Grund ihrer medizinischen Bedeutung sind vor allem die vier humanpathogenen Arten, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* zu nennen (Carter & Mendis, 2002).

Die phylogenetische Verwandtschaft von *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* ist als sehr eng zu betrachten (Mehlotra *et al.*, 2000), während *P. falciparum* den Erregern der Vogel malaria, darunter z. B. *P. gallinaceum*, näher steht (Schneider & Shahabuddin, 2000).

1.3.1. Malaria tertiana (*P. vivax*, *P. ovale*) und quartana (*P. malariae*)

Die klinischen Symptome und der Krankheitsverlauf bei Infektionen von *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* weisen Ähnlichkeiten auf. In den ersten Tagen der erythrozytären Vermehrung steigt die Körpertemperatur langsam an, bis nach 5-10 Tagen Fieber bis 40°C und darüber erreicht wird. Diese Phase des Temperaturanstiegs wird als Initialfieber bezeichnet. Nach mehreren Tagen werden die bis dahin ungeordnet verlaufenden Vermehrungszyklen jedoch plötzlich synchronisiert, das heißt, fast alle Parasiten durchlaufen zum selben Zeitpunkt dasselbe Entwicklungsstadium. Die Schizonten reifen also alle gleichzeitig heran und zerfallen alle auch etwa zum gleichen Zeitpunkt. Dabei werden nicht nur Merozoiten, sondern auch Erythrozytenfragmente, Membranteile, Hämozoin und Metaboliten, schwallartig im Blut freigesetzt, was vermutlich die Ursache des schnellen Temperaturanstiegs, verbunden mit Schüttelfrost, ist (Pavithra *et al.*, 2004; Weatherall *et al.*, 2002). Sind die Merozoiten in neue Erythrozyten eingedrungen, normalisiert sich die Körpertemperatur wieder weitgehend, bis sich am dritten Tag („tertiana“) bei der *P. vivax*- und *P. ovale*-Infektion, bzw. am vierten Tag („quartana“) bei der *P. malariae*-Infektion der

Vorgang wiederholt. Die Malaria ist dann in das Stadium der typischen rhythmischen Fieberanfälle eingetreten, die zu dem Namen „Wechselfieber“ geführt haben.

P. vivax und *P. ovale* verursachen die schwere, jedoch selten tödlich verlaufende Malaria tertiana mit periodischen Fieberschüben alle 48 Stunden (Dorsey *et al.*, 2000; Carter & Mendis, 2002). Auch die von *P. malariae* hervorgerufene Malaria quartana zeigt häufig einen gutartigen Krankheitsverlauf mit periodischen Fieberschüben, die jedoch alle 72 Stunden auftreten. Beide Arten der Malariaerkrankung werden als benigne angesehen, da sie im Gegensatz zur von *Plasmodium falciparum* verursachten Malaria tropica meist keine schweren und oft fatal verlaufenden Manifestationen wie zerebrale Malaria, Hypoglykämie oder Metabolische Azidose hervorrufen (Miller *et al.*, 2002; Carter & Mendis, 2002). Heute hat *P. malariae* jedoch seine einstige Prädominanz verloren und Malariainfektionen werden meist von *P. falciparum* oder *P. vivax* verursacht (Carter & Mendis, 2002). *P. ovale* dagegen weist eine äußerst limitierte Verbreitung auf. Der Parasit ist prävalent in Afrika südlich der Sahara, endemisches Vorkommen ist lediglich in Neu-Guinea und auf den Philippinen bekannt (Carter & Mendis, 2002).

1.3.2. Malaria tropica

Die Infektion mit *P. falciparum* führt zur gefährlichsten Form der Malariaerkrankung (Goerg *et al.*, 1999; Perlmann & Troye-Blomberg, 2000), die bei Nichtimmunen unbehandelt mit einer Letalität bis zu 20 % verbunden ist (Robert-Koch-Institut „Merckblätter für Ärzte“, 2006). *P. falciparum* unterscheidet sich in zwei Aspekten von den vorher genannten Malariaerregern: Erstens sind die Fieberschübe typischerweise nicht synchronisiert, d.h. die Fieberanfälle mit typischer Rhythmik fehlen fast immer, obwohl sie, der 48-stündigen erythrozytären Schizogonie entsprechend (Weatherall *et al.*, 2002), gelegentlich zu einem Tertiana-Rhythmus führen.

Die zweite Besonderheit von *P. falciparum* besteht darin, dass dieser Parasit die Oberflächenmembran der befallenen Erythrozyten verändert; es bilden sich Ausstülpungen der Zellmembran, sogenannte „knobs“, die sich an Gefäßwandzellen anheften und so die Blutkapillaren verstopfen (s. auch Pathologie und Pathophysiologie). Die dafür verantwortlichen Moleküle auf den Erythrozyten sind noch wenig charakterisiert. Ein Kandidat ist das sogenannte *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1); seine Expression korreliert mit der Fähigkeit infizierter Erythrozyten zur

Zytoadhärenz (Sharma 1991; Aikawa *et al.*, 1990). Der Vorteil des Parasiten liegt vermutlich darin, dass die „angehefteten“ Erythrozyten dem Blutkreislauf entzogen sind und nicht mehr in der Milz eliminiert werden können. Die Adhäsionsvorgänge können sich grundsätzlich in allen Organen ereignen, der hohe Sauerstoffbedarf des Gehirns (ca. 20% des Gesamtbedarfs des Körpers) ist jedoch vermutlich die Ursache für die häufigste Form der Organmanifestation, die sog. zerebrale Malaria: zunehmende Bewusstseinstörung, die innerhalb von Stunden in ein tiefes Koma übergehen kann. Andere Krankheitsbilder sind die gastrointestinale Malaria mit Durchfällen und häufig Blutbeimengungen im Stuhl; die biliäre Form mit Schmerzen im Oberbauch und galligem Erbrechen bei ansteigenden Bilirubinwerten im Serum; die kardiale Form mit Tachykardien, Extrasystolen, EKG-Veränderungen und Herzdilatation. Die komplizierte Malaria präsentiert sich als eine Septikämie, wie sie durch gramnegative Bakterien verursacht wird. Zunehmender Schockzustand bei nicht selten wenig Fieber oder sogar Normaltemperatur erschweren die Diagnose außerordentlich. Bei allen Malariaformen kommt es fast regelmäßig zu einer eingeschränkten Nierenfunktion, die meist reversibel verläuft, bei Malaria tropica aber schnell in ein akutes Nierenversagen übergehen kann. Die Diagnostik der Malaria ist aber sehr einfach, wenn an die Möglichkeit einer Malariainfektion gedacht wird.

1.3.3 Morphologie

Der Stamm der Apicomplexa wurde eingeführt, um Protozoen zu klassifizieren, die eine definierte, elektronenmikroskopisch erkennbare Kombination von Strukturelementen besitzen, die man als „Apikalen Komplex“ bezeichnet (siehe Abb. 3). Diese Strukturkomponenten sind Polar-Ringe, Micronemata, Rhoptrien, subpelliculäre Mikrotubuli, Mikroporen und das Conoid.

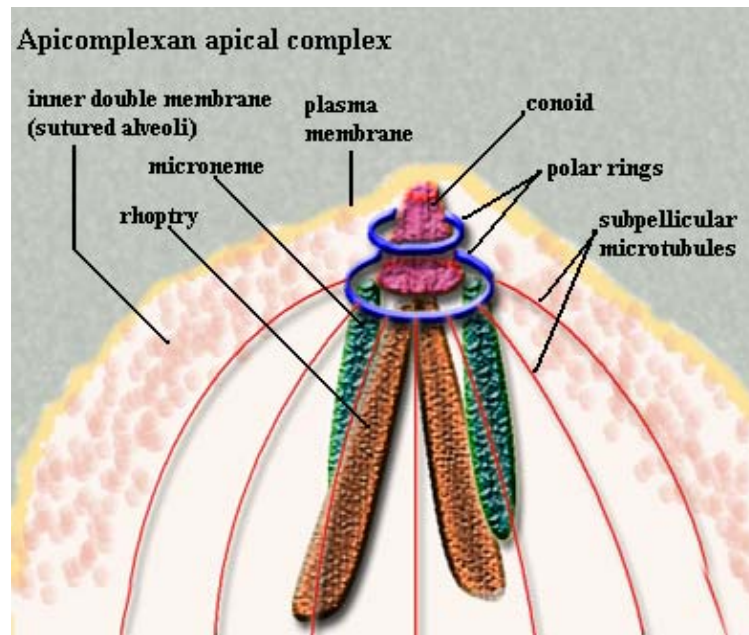


Abb. 3: Apikal-Komplex mit den charakteristischen Bestandteilen der Apicomplexa (<http://www.palaeos.com/Eukarya/Lists/EuGlossary/EuGlossary.htm>): Rhoptrien (rhoptry), Micronemata (microneme), Polar-Ringe (polar rings), subpelliculare Microtubuli (subpellicular microtubules) und Conoid (conoid)

Auch Plasmodien weisen einen derart beschriebenen apikalen Komplex und eine dreischichtige Pellicula auf.

Die unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung unterscheiden sich jedoch sehr in der Morphologie. Sporozysten von Plasmodien sind ca. 10-15 μm lang. Nach dem Eindringen in Hepatozyten runden sie sich zu ca. 3 μm großen Organismen ab, die in der Folge zu 30-70 μm messenden Leberschizonten heranwachsen (Lucius & Loos-Frank, 1997). Die Erstgeneration exoerythrozytärer Merozoiten von *Plasmodium* in hepatischen Zellen wird als „Cryptozoiten“ bezeichnet; sie befallen neue Leberzellen und eine weitere schizogonische Phase kann sich anschließen, die zur Bildung von Metacryptozoiten führt (exoerythrozytäre Merozoiten der zweiten Generation). Diese verlassen die Leberzellen, invadieren Erythrozyten und initiieren somit die erythrozytäre Phase (Cheng, 1986). Metacryptozoiten befallen die Wirts-Erythrozyten etwa 6 Tage nach Infektion mit *P. vivax* und nach 8 Tagen mit *P. falciparum*.

Während der Entwicklung des Parasiten in den Erythrozyten, können verschiedene, morphologisch unterschiedliche Entwicklungsstadien beobachtet werden:

1. Das Ringstadium, auch als „Siegelring“ bezeichnet, entsteht durch die Vakuole im Zytoplasma des Parasiten. Am Rand des die Vakuole umgebenden Zytoplasmas ist der Nukleus lokalisiert, der die „Gemme“ des Rings bildet. In der Giemsa- oder Wright's-Färbung erscheint das Zytoplasma blau und der Kern rot.
2. Eine Vergrößerung durch Zunahme des blauen Zytoplasmas ist erkennbar.
3. In *P. vivax* sind rote Granula erkennbar, die sogenannte „Schüffnersche Tüpfelung“. In *P. ovale* Infektionen finden sich ähnliche Granula, aber die infizierten Zellen sind von ovaler Form und erscheinen nicht vergrößert. Bei Infektionen mit *P. falciparum* finden sich die parasitierten Erythrozyten generell im Blut viszeraler Organe; die Granula, bekannt als „Maurersche Fleckung“, sind in ihrer Anzahl geringer und nach Färbung tiefrot. Bei *P. malariae* Infektionen werden keinerlei Granula beobachtet.
4. Der Beginn der Kernteilung: die einzelnen Kerne teilen sich, jede der Tochterkerne teilt sich abermals, so dass zunächst vier Kerne entstehen; weitere Kernteilungen folgen.
5. In dem Vorgang der Segmentation ordnen sich die Kerne an der Peripherie an, umgeben von Teilen des Zytoplasmas.
6. Die Merozoiten bilden sich, wobei jede „Einheit“ aus einem Kern und umgebendem Zytoplasma besteht.

Diese Merozoiten verlassen die Blutzelle und invadieren neue Erythrozyten, in welchen sich der Zyklus wiederholt. Die sogenannten „ghost cells“, zerstörte Erythrozyten, die die Parasiten zurücklassen, werden in der Milz abgebaut (Cheng, 1986).

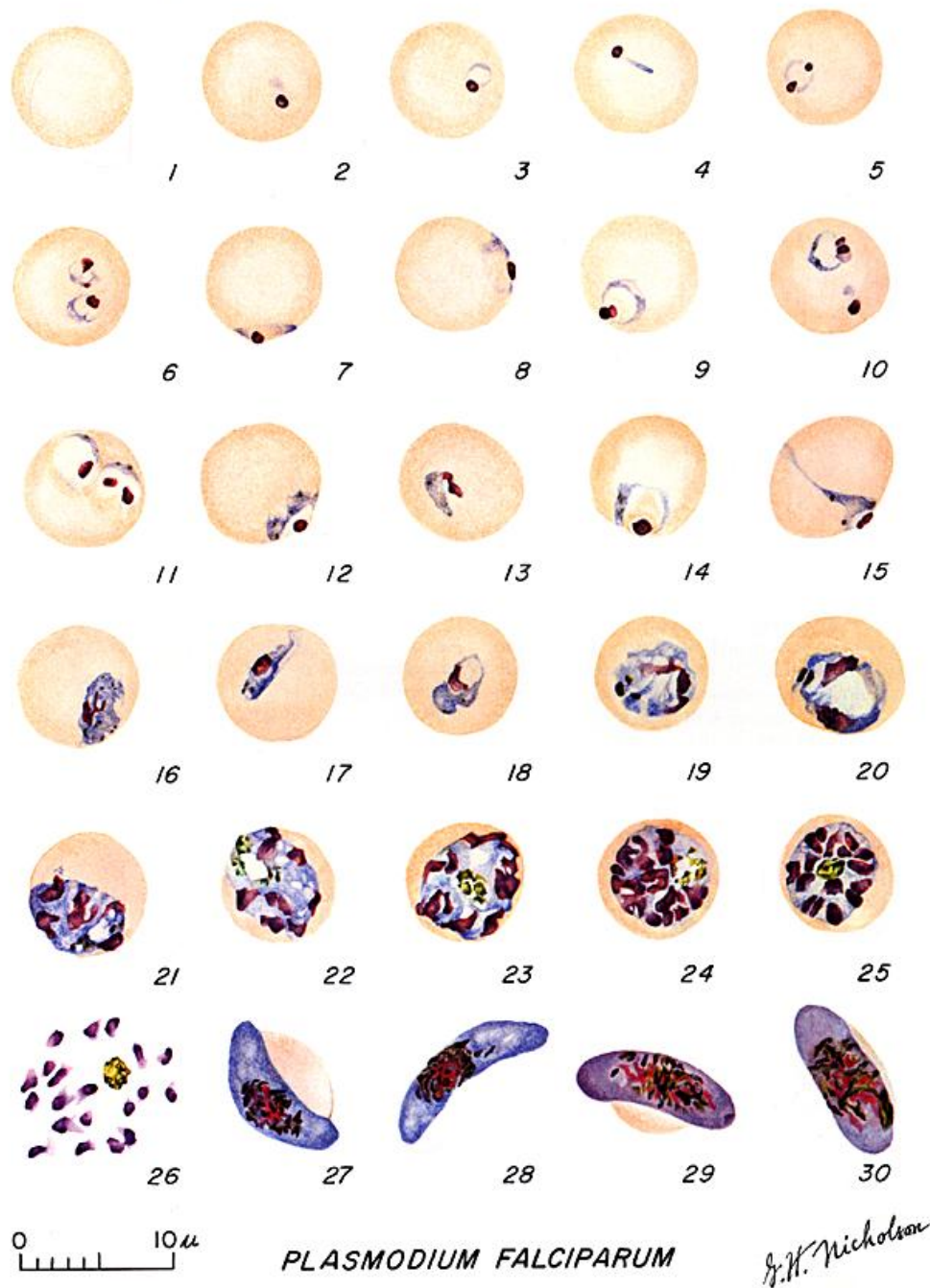


Abb. 4: Übersicht der Reifungsstadien und Morphologie von *P. falciparum*

Quelle: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malarías. Bethesda: U.S. Department of Health, Education and Welfare; 1971.

Fig. 1: Normaler Erythrozyt; Fig. 2-18: Trophozoiten (darunter zeigen Fig. 2-10 Trophozoiten im Ring-Stadium); Fig. 19-26: Schizonten (Fig. 26 zeigt einen rupturierten Schizont); Figs. 27, 28: Reifer Makrogametocyt (weiblich); Figs. 29, 30: Reifer Mikrogametocytes (männlich).

Merozoiten sind ca. einen Mikrometer lang und oval und stellen die invasiven Stadien der Schizogonie dar. Nach der Invasion des Erythrozyten besteht der Parasit zunächst aus einer Plasmablaste mit zentraler Nahrungsvakuole und einem randständigen Kern, der gut anfärbbar ist. Der apikale Komplex ist besonders ausgeprägt (Lee *et al.*, 1985). Nach dem mikroskopischen Bild Giemsa-gefärbter Präparate wird dieses Stadium als „Siegelring“ bezeichnet (Lucius & Loos-Frank, 1997).

In der Nahrungsvakuole des Parasiten liegt das Malariapigment Hämozoin in Konglomeraten als unlösliches Abbauprodukt des Hämoglobins, ein mit Proteinen assoziiertes Polymer des Häm (Lucius & Loos-Frank, 1997). Das Hämozoin ist jedoch in Siegelringstadien noch nicht vorhanden.

Der apikale Komplex besteht aus dem apikalen Polring, in dem die Ausführungsgänge der Rhoptrien und Mikronemen enden, und dem Conoid (Bannister *et al.*, 2000).

Beide, die keulenförmigen Rhoptrien und die fibrillenförmigen Mikronemata sind Teile des Penetrationsapparates der invasiven Parasitenstadien. Diese Organellen hängen vom Binnenraum des nach hinten offenen Conoids in die Zelle.

Die dreischichtige Pellicula besteht aus der Plasmamembran und einer inneren, aus zwei verklebten Elementarmembranen gebildeten Membran (Dönges, 1988). Diese innere Membran wird durch Mikroporen unterbrochen, die der Nahrungsaufnahme dienen könnten. Durch Endozytose gebildete Nahrungsvakuolen gelangen vermutlich durch Mikroporen in das Innere der Zelle (Senaud *et al.*, 1976). An den Polen der Zelle existieren durch ringförmige Versteifungen stabilisierte Bereiche, die Polringe, die durch die innere Membran freigelassen werden. Diese beschriebenen Strukturen werden sowohl von den Merozoiten als auch von den Sporozoiten ausgebildet. Gametozyten besitzen im Gegensatz dazu keine Polstruktur. Sie haben bei den meisten Arten eine runde Gestalt, sind bei *P.falciparum* aber halbmondförmig (Lucius & Loos-Frank, 1997).

Auch die Ultrastruktur der Parasiten weist einige Besonderheiten auf: Der Kern wird von einer durchbrochenen Doppelmembran umgeben, ein Nukleolus ist nicht nachweisbar (Lee *et al.*, 1985).

Obwohl eine Anzahl von distinkten DNA-Makromolekülen nachweisbar ist, werden während der Zellteilung keine kondensierten Chromosomen gebildet (Knell, 1991).

Im Zytoplasma des Parasiten liegt immer nur ein Mitochondrium vor, das je nach Entwicklungsstadium größer oder kleiner sein kann, bzw. mit oder ohne Cristae ausgestattet ist (Learnaramkul *et al.*, 1999). Darüber hinaus enthält das Zytoplasma von Plasmodien eine

Anzahl membranumhüllter Vesikel, die als Bestandteile des endoplasmatischen Retikulums identifiziert wurden (Meis *et al.*, 1983).

Obwohl eine Enzymaktivität entdeckt wurde, welche in anderen Zellen dem Golgi-Apparat zugeordnet werden konnte, sind bisher keine Golgi-typischen Vesikel beschrieben (Elmendorf & Haldar, 1993).

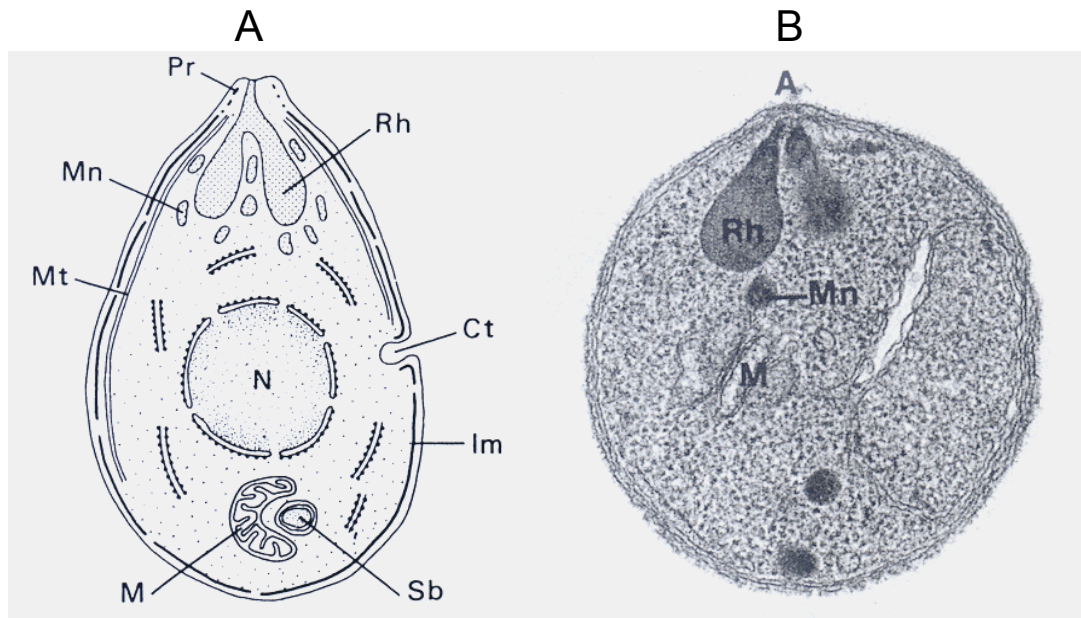


Abb. 5: Schematische (A) und elektronenmikroskopische (B) Darstellung eines Merozoiten.
 Ct: Zytostom, Im: Innere Membran, M: Mitochondrium, Mn: Micronemata, Mt: Subpelliculäre Mikrotubuli, N: Nucleus, Pr: Polarring, Rh: Rhoptrien, Sb: Spherical body.
 Shams-Eldin (2001).

1.3.4 Der Entwicklungszyklus

Die Vermehrung der Plasmodien ist an einen Wirtswechsel (Mücke/Mensch) und an einen Generationswechsel (geschlechtlich/ungeschlechtlich) gebunden.

Jedem Zyklus gehören je eine geschlechtliche und drei ungeschlechtliche Phasen an (Boch & Supperer, 1992; Crans, 1992): Die geschlechtliche und die erste ungeschlechtliche Phase finden in der weiblichen *Anopheles*-Mücke statt.

Bei dem Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke gelangen Sporozoiten durch den Speichel in die Subkutanschicht oder direkt in Blutkapillaren. Schon ca. 10 Sporozoiten sind ausreichend, um einen Menschen zu infizieren (Sinnis, 1996).

Die Parasiten befinden sich dabei allerdings nur kurze Zeit in der Blutbahn, denn ihr erstes Ziel ist die Leber. Durch Invasion in Hepatozyten entzieht sich der Parasit dem menschlichen Immunsystem (Molineaux, 1988) und ist so für den Ablauf der ersten ungeschlechtlichen Vermehrungsphase im Wirtsorganismus, die hepatische Schizogonie (Boch & Supperer, 1992), relativ gut geschützt.

Auf ihrem Weg scheinen die Sporozoiten mehrere Hepatozyten zu passieren, bevor der Parasiteninvasion die Vermehrung folgt (Mota *et al.*, 2001).

Der Co-Rezeptor der Sporozoiten, der für die Invasion in Leberparenchymzellen benötigt wird, ist zum einen eine Thrombospondin-Domäne des Circumsporozoitenproteins, zum anderen ist auch das Thrombospondin-related adhesive Protein (TRAP) involviert (Miller *et al.*, 2002). Diese Domänen binden spezifisch an Heparinsulfat Proteoglykane der Hepatozyten (Frevert *et al.*, 1993). Innerhalb der Leberparenchymzelle entwickelt sich die Zelle in einer parasitophoren Vakuole unter Sporozoiten-Einfluss zu einem Gewebstrophozoiten, der sich schnell vergrößert.

Die Parasiten machen schon nach zweitägigem Wachstum mehrere Kernteilungen durch: Es entstehen multinukleäre Zellen, die als hepatische Schizonten bezeichnet werden. Diese können bis zu mehrere tausend Merozoiten enthalten, die durch Platzen nach 6-15 Tagen in den Blutkreislauf gelangen und dort Erythrozyten befallen (Molineaux, 1988). Die beim Platzen des Hepatozyten freiwerdenden Merozoiten dringen ausschließlich in Erythrozyten ein und setzen hier wiederholte Schizogonien in Gang, welche als „erythrozytäre Schizogonien“ bezeichnet werden.

P. vivax invadiert nur junge Erythrozyten (Retikulozyten), *P. falciparum* ist weniger wählerisch und dringt in Erythrozyten aller Altersklassen ein. Bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* entstehen parallel zur Schizogonie Wartestadien, die sogenannten „Hypnozoiten“, die sich erst nach Monaten oder Jahren weiterentwickeln.

Die hepatische Schizogonie und die ersten Zyklen der intraerythrozytären Vermehrung laufen noch ohne Symptome ab und entsprechen folglich der Inkubationszeit, die im Allgemeinen zwischen 7-30 Tagen beträgt. Dieser Zeitraum kann sich durch die prophylaktische Einnahme von Antimalariamitteln jedoch um Wochen bis Monate verlängern und unterliegt damit großen Schwankungen (Bruce-Chwatt, 1985a).

Um in Erythrozyten eindringen zu können, induziert der Parasit die Bildung einer Vakuole, wobei die Plasmamembran des roten Blutkörperchens übernommen und umgebaut wird (Weatherall, *et al.*, 2002). Rezeptoren für die Invasion der Erythrozyten durch Merozoiten als auch der Leberzellen durch Sporozoiten wurden in den Parasitenorganellen Micronemata

vorgefunden (Adams *et al.*, 1990), auf der Zelloberfläche und in Rhoptrien. Die Verteilung dieser Rezeptoren innerhalb eines Organells könnte einen weiteren Schutzmechanismus des Parasiten vor dem menschlichen Immunsystem darstellen, da die Rezeptorproteine auf diese Weise vor Neutralisation durch spezifische Antikörper bewahrt werden (Weatherall, *et al.*, 2002).

Die dritte ungeschlechtliche Vermehrungsphase, die intraerythrozytäre Schizogonie, ist für die Symptomatik der Malariaerkrankung verantwortlich.

Dabei durchläuft der in die roten Blutkörperchen eingedrungene Malariaparasit verschiedene Entwicklungsstadien, die Ringform, das Trophozoiten-, Schizonten- und schließlich Merozoitenstadium. Die Merozoiten werden mit dem Zerfall der Erythrozyten freigesetzt und befallen sofort neue rote Blutkörperchen. Damit ist der Entwicklungskreislauf abgeschlossen, der bei *P. malariae* 72 Stunden dauert, bei den drei anderen humanpathogenen Malariaparasiten, wie oben erwähnt, 48 Stunden in Anspruch nimmt. Zusätzlich zu den Merozoiten entwickeln sich die Geschlechtsformen der Parasiten, die sogenannten Gametozyten (Trager & Jensen, 1997).

***P. vivax* infection showing tertian periodicity related to the maturation and rupture of erythrocytic schizonts**

***P. malariae* infection showing quartan periodicity**

***P. falciparum* infection showing irregular tertian periodicity and the influence of successful treatment**

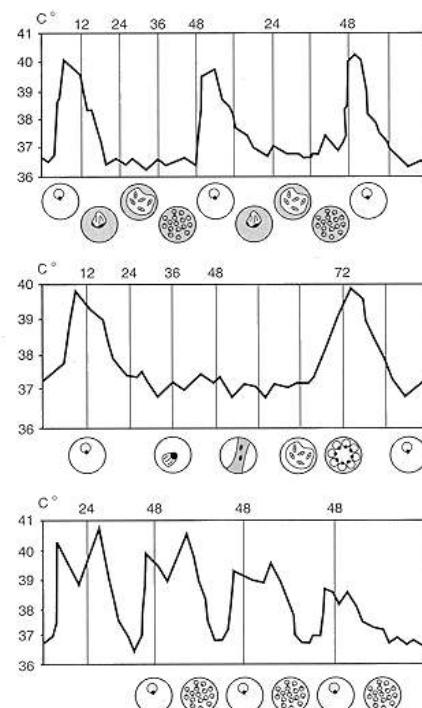


Abbildung 6: Vermehrungszyklus und Temperaturverlauf von Plasmodium-Infektionen (freundlich überlassen von Dorn, A.; La Roche Basel.)

Die *P. vivax*-Infektion zeigt rhythmische Fieberschübe alle 48 Stunden (Tertiana-Rhythmik), verursacht durch die Reifung und Ruptur der erythrozytären Schizonten. Die mittlere Abbildung zeigt die Periodizität bei *P. malariae* mit den wiederkehrenden Fieberschüben alle 72 Stunden (Quartana-Rhythmik). Die untere Abbildung zeigt den Fieberverlauf bei einer *P.*

falciparum-Infektion, der keinen spezifischen Rhythmus aufweist und schließlich den Einfluss einer erfolgreichen Therapie.

Die Gametozyten lassen sich in weibliche Makrogametozyten und männliche Mikrogametozyten unterscheiden. Die Zeit bis zur Reife beträgt ca. 4 Tage (Petmitr *et al.*, 1997). Sie zirkulieren zwischen einem (*P. ovale*) und 22 Tagen (*P. falciparum*) im Blut (Mehlhorn & Walldorf, 1988). In dieser Zeit besteht die Möglichkeit der Aufnahme durch eine weibliche Anophelesmücke während einer Blutmahlzeit. Geschieht dies nicht innerhalb dieses Zeitraumes, sterben die Gametozyten ab (Bruce-Chwatt, 1985a).

In geeigneten Überträgermücken bilden sich, induziert durch die physiologischen Verhältnisse des Mückenmagens, innerhalb von nur ca. zehn Minuten die Gameten. Bei den Mikrogametozyten wird diese Differenzierung als Exflagellation bezeichnet und geht mit einem dramatischen Gestaltwechsel einher: Jeder Mikrogametozyt bildet sehr schnell acht Plasmaprotuberanzen aus, in die je ein Kern einwandert. Mikrogameten schnüren sich darauf hin ab, die die Makrogameten befruchten. Die weiblichen Makrogameten ziehen die männlichen Mikrogameten durch Chemotaxis an (Mehlhorn & Walldorf, 1988).

Die gebildete Zygote reift in den nächsten Stunden zum Ookineten heran und durchläuft einige charakteristische morphologische Veränderungen. Diese Phase entspricht dem geschlechtlichen Teil der Vermehrung (Mehlhorn & Walldorf, 1988).

Der Ookinet penetriert die Epithelzellen des Mückenmagens und etabliert sich zwischen Epithelzellen und Basalmembran (Lucius & Loos-Frank, 1997). Damit beginnt die erste ungeschlechtliche Vermehrung (Lee *et al.*, 1985). Die Oozyste wächst im Verlauf von ca. einer Woche heran und macht vielfache Kernteilungen durch. Auf diese Weise werden etwa tausend Sporozoiten gebildet. In einer infizierten *Anopheles* können mehr als 100 Oocysten auftreten, so dass die Anzahl der Sporozoiten sehr groß sein kann (Lucius & Loos-Frank, 1997). Diese Entwicklung wird durch höhere Temperaturen begünstigt. Die neu gebildeten invasiven Sporozoiten gelangen ca. 14 Tage nach der Blutmahlzeit der Überträgermücke in die Speicheldrüsen und sind nun, bei erneutem Stich der Mücke, für den Menschen infektiös (Mehlhorn & Walldorf, 1988).

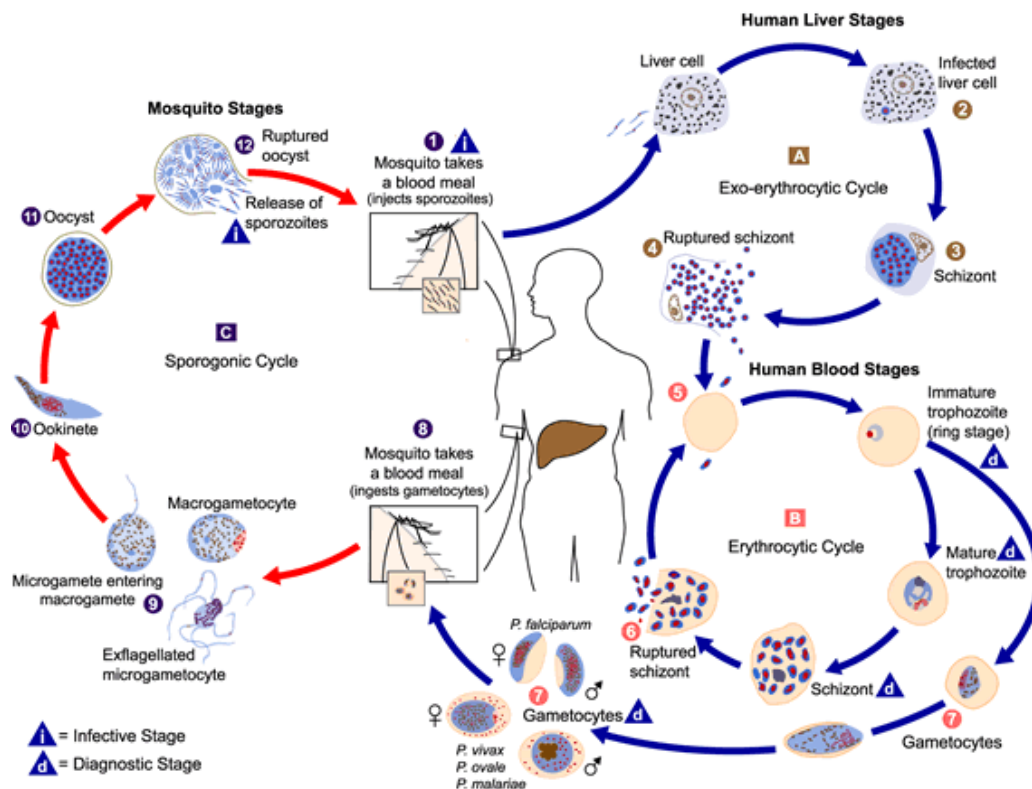


Abb. 7: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *P. falciparum*
http://www.uni-tuebingen.de/modeling/Mod_Malaria_Cycle_de.html

1. Moskito nimmt eine Blutmahlzeit, 2. infizierte Leberzelle, 3. Schizont, 4. geplatzter Schizont, 5. Infektion eines Erythrozyten, 6. zerstörter Erythrozyt gibt Merozoiten frei, 7. Gametozyten, 8. Moskito nimmt über Blutmahlzeit Gametozyten auf, 9. Mikrogametozyt dringt in Makrogametozyt ein, 10. Ookinete, 11. Oocyste, 12. gesprengte Oocyste und Freisetzung von Sporozoiten, die über erneute Blutmahlzeit inokuliert werden.

1.4 Pathologie

1.4.1 Makroskopische und mikroskopische pathologische Anatomie

Verstirbt ein Patient an Malaria, so fallen bei der Obduktion charakteristische Veränderungen der Organsysteme auf. Typische Organveränderungen als Ausdruck einer fatalen Malariaerkrankung sind dabei petechiale Hämorrhagien, Ödeme und Stau der Gehirnkapillaren als Zeichen von Gefäßwandschäden, Hepatosplenomegalie, Lungenödeme, Mikroinfarkte und der Nachweis des Malariapigments Hämozin in mehreren Organen (Peach *et al.*, 2000; Oga *et al.*, 2001; Bradley *et al.*, 1990), welches sich makroskopisch als gelblich-braune bis „schmutzig-graue“ Organverfärbung darstellt (Wichmann *et al.*, 2003; Albert *et al.*, 1995). Das Malariapigment Hämozin ist ein Häm-Polymer, welches beim Abbau von Hämoglobin durch Plasmodien entsteht (Sullivan & Meshnick, 1996). Die Monoquinolinen Antimalariamittel entwickeln ihre pharmakologische Aktivität nach

derzeitiger Auffassung durch eine Hemmung der Hämpolymerisation zu Hämozoin. Es wird vermutet, dass das Malariapigment selbst ein Mediator in der Pathogenese der Erkrankung darstellt (Sullivan & Meshnick, 1996) und darüber hinaus als Indikator für eine Malariaerkrankung gilt.

Auch eine Sequestration infizierter Erythrozyten in Venolen und Kapillaren lässt sich häufig beobachten (Wichmann *et al.*, 2003). Des Weiteren ist die Assoziation einer *P. falciparum* Infektion mit einer Myokarditis nicht unbekannt (Siveke *et al.*, 2001; Mohsen *et al.*, 2001) und kann schließlich eine Todesursache sein (Wichmann *et al.*, 2003). Eindrucksvoll sind auch die pathologischen Veränderungen im Bereich des Gehirns und der Meningen (s. auch Kapitel „Pathophysiologie“). Da der Tod durch zerebrale Malaria sehr plötzlich eintreten kann, treten gelegentlich forensische Fragestellungen auf (Yapo Ette *et al.*, 2002). Die charakteristischen Erscheinungen einer zerebralen Malaria beinhalten dicht gepackte Kapillaren und Venolen mit infizierten sequestrierten Erythrozyten und Hämozoin. Im Gegensatz zu Blutaussstrichen aus peripheren Gefäßen dominieren hier reifere Stadien der intraerythrozytären Vermehrung.

Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten haben die Fähigkeit, durch Vorstülpungen, sogenannten „knobs“ (s. auch S. 8 und Kap. Pathophysiologie), am Gefäßendothel zu haften (Sharma *et al.*, 1991), wodurch regelrechte Erythrozytenthromben entstehen, die zur Verlegung peripherer Gefäße führen. Als Folge sind proximal dieser Thromben in der weißen Substanz petechiale Blutungen zu beobachten. Die Obstruktion der Mikrozirkulation führt zu Hypoxie und metabolischen Störungen, die die Funktion des Gehirns beeinflussen und zu einem Koma führen können (Medana *et al.*, 2001).

Darüber hinaus wurden bei Patienten mit zerebraler Malaria post mortem Störungen der Blut-Hirn-Schranke beobachtet, die ein „Fibrinogen-Leck“ und eine verminderte Expression von Endothel-Zellproteinen wie ZO-I, Vinculin und Occludin beinhalten (Brown *et al.*, 1999). Eine inflammatorische Infiltration der Zelle liegt nur gelegentlich vor.

Auch granulomatöse Läsionen in der weißen Substanz, die aus Mikrogliawucherungen bestehen und Dürck-Granulome genannt werden, sind kein obligater Befund (Boonpucknavig *et al.*, 1990)

Die Störungen in der Blut-Hirn-Schranke spielen nach Medana *et al.* 2001 eine wichtige Rolle für die Pathogenese der zerebralen Malaria. Die Hypothese besagt, dass durch die erhöhte Durchlässigkeit der Schranke auch Malaria-Exoantigene, Immunzellen, Zytokine und andere Proteine Zugang zum Hirnparenchym haben und die Immunfunktionen von Mikroglia und

Astrozyten auf diese Weise erhöhen. Dies könnte zu einer lokalen Produktion von Toxinen führen, die eine zerebrale Dysfunktion verursacht.

Eine weitere charakteristische Veränderung von klinischer Bedeutsamkeit ist die Splenomegalie. Histologisch sind infizierte Erythrozyten in den Sinus und Gefäßen und reichlich Phagozyten mit Malariapigment zu erkennen (Warrell, 1997). Dieser Vorgang ist in ähnlicher Weise auch an anderen Organen der Malaria-Manifestation wie Lunge, Nieren, Leber, Knochenmark und Plazenta zu beobachten.

1.5 Pathophysiologie der Malariaerkrankung

Die Invasion der Merozoiten in Erythrozyten bewirkt vielfältige Veränderungen in den Wirtszellen (Nash, *et al.*, 1992).

Neben dem Verbrauch an zelleigenen Proteinen (darunter vor allem Hämoglobin) und Substraten baut der Parasit die Zelle und ihre Oberfläche völlig um (Bruce-Chwatt, 1985a). Plasmodienspezifische Antigene werden zur Zelloberfläche transportiert (Enderle *et al.*, 1997). Auf der zytoplasmatischen Seite der Wirtsmembran finden sich andere Parasitenproteine, die für die Protrusionen oder „knobs“ der von *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten verantwortlich sind (Sharma, 1991) (s. auch S. 8 und Kap. Pathologie). „Knob“-Proteine können in zwei Klassen eingeteilt werden, einmal in die zytoadhärenten Proteine an der Oberfläche der Knobs wie PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum* infected erythrocyte membrane protein), zum anderen in submembranöse Strukturproteine an der zytoplasmatischen Seite der Knobs, wie KHARP (knob-associated histidine-rich protein) oder PfEMP-2 und -3 (Sharma, 1997).

Die Strukturproteine interagieren mit verschiedenen Wirts- (Spektrin, Aktin) und Parasitenmolekülen (z.B. PfEMP-1), um adhäsive Knobs zu erstellen. Damit stellen Knob-Proteine einen wichtigen Ansatzpunkt zur Entwicklung von Impfstoffen dar, da durch sie ein Teil der Zytoadhäsionsphänomene reguliert wird. Gegen sie spricht die hohe Antigenvariation, die die Entwicklung eines Vakzines beträchtlich erschwert (Sharma 1997). Die Ausbildung der Knobs ermöglicht es dem Parasiten, die Strombahn der Milz, in der infizierte Erythrozyten abgebaut werden, zu umgehen. Erythrozyten, die Knobs ausgebildet haben, bleiben in den Gefäßen anderer Organe hängen. Dieser Vorgang wird als „Sequestration“ bezeichnet.

Eine der gefürchtetsten Komplikationen der Malariaerkrankung ist die zerebrale Malaria. Es existieren mehrere Hypothesen zur Pathogenese:

Zum einen wird vermutet, dass die zerebrale Malaria aus der Bindung von Parasiten-infizierten Erythrozyten an Kapillar-Endothelzellen des Gehirns resultiert. Dies führt zu erniedrigtem Sauerstoffangebot in dem entsprechenden Gebiet und somit zu zerebraler Enzephalopathie (Aikawa *et al.*, 1990; Berendt *et al.*, 1994). Diese Zytoadhärenz innerhalb des Gehirns scheint auf dem Vorliegen gewisser Liganden, wie „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1), „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und E-Selectin (Ockenhouse *et al.*, 1992), als auch Mannose-bindende Proteine (MBP) zu beruhen (Mazier, 2000) deren Expression durch TNF α stimuliert und durch die Transkriptionsfaktorfamilie NF κ B reguliert wird. Auf endothelialer Seite scheinen die infizierten Erythrozyten auch an das CD36-Leukozyten-Antigen zu binden, das neben Endothelzellen des Gehirns auch Makrophagen und Monozyten exprimieren (Barnwell *et al.*, 1989).

Eine zweite Hypothese besagt, dass die zerebrale Malaria auf eine durch TNF α stimulierte Überproduktion von NO („Nitric oxid“) zurückzuführen ist (Clark & Rockett, 1994). NO, auch bekannt als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987), ist ein potenter Vasodilatator. Diese Vasodilatation, die sich auch in den Gefäßen des Gehirns ereignen kann, könnte als Ursache für den steigenden intrakraniellen Druck gesehen werden, der mit zerebraler Malaria einhergeht (Newton *et al.*, 1991). Darüber hinaus fungiert NO auch als Neurotransmitter, so dass ein Überangebot von NO das zerebrale Gleichgewicht stören, zu fehlerhafter Neurotransmission führen und das ebenfalls für zerebrale Malaria charakteristische reversible Koma verursachen kann (Clark & Rockett, 1994). Sowohl die NO-Produktion als auch die Adhäsion-Expression können von dem proinflammatorischen Zytokin TNF α stimuliert werden (Tachado *et al.*, 1996).

Überhöhte NO-Produktion bei Malaria wurde ebenfalls für eine Immunsuppression verantwortlich gemacht (Rockett *et al.*, 1994).

Ein weiteres Phänomen, das mit zerebraler Malaria in Verbindung gebracht wird, ist das sogenannte „Rosettenphänomen“. Dabei binden infizierte Erythrozyten an uninfizierte rote Blutkörperchen (David, 1988; Somner *et al.*, 2000). Man vermutet, dass die Rosettenbildung durch Verlangsamung des Blutstroms die Bindung an Endothelzellen unterstützt und so die Sequestrierung fördert (White & Ho., 1992). Die Konsequenz einer solchen Mikroobstruktion stellen Hypoxie und Laktatazidose dar (Pasvol *et al.*, 1992).

Es ist bereits bekannt, dass die Induktion dieser inflammatorischen Prozesse von Plasmodien, ähnlich den bakteriellen Endotoxinen, hervorgerufen werden kann.

Schofield und Hackett konnten 1993 zeigen, dass im Serum vieler an Malaria tropica erkrankter Patienten hohe TNF α -Spiegel vorlagen, wobei die Schwere der Erkrankung mit der Höhe des Serumspiegels korrelierte (Berendt *et al.*, 1994).

Auch im Tierversuch mit Mäusen konnte diese TNF α -Dysregulation nachgewiesen werden (Clark *et al.*, 1989). Durch Applikation von Antikörpern gegen TNF α wurden letale Verläufe weitgehend verhindert, wobei der Grad der Parasitämie unverändert blieb (Grau *et al.*, 1987). Als Stimulus für die erhöhte Zytokinfreisetzung konnten GPIs, sowohl in proteingebundener als auch in freier Form, identifiziert werden (Schofield & Hackett, 1993; Tachado *et al.*, 1997; Vijaykumar *et al.*, 2001).

Eine weitere wichtige Patientengruppe der Malaria stellen schwangere Frauen dar, da die Folgen der Malaria tropica nicht nur für die Betroffene selbst, sondern auch für das noch ungeborene Kind fatal sind.

Dabei scheint die Eigenschaft der Parasiten entscheidend, in die kindlichen Blutgefäße der Plazenta über infizierte Erythrozyten eindringen zu können. Diese Sequestration ist eine Folge der Bindung von exprimierten Parasiten-Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche der Erythrozyten an bestimmte Rezeptoren der Plazenta wie Chondroitin Sulfat A (CSA) (Fried & Duffy, 1996) und Hyaluronsäure (Menendez, 1995). Diese Adhäsion und Sequestration erleichtert Vermehrung und Wachstum der Parasiten, da sie auf diese Weise dem Abbauweg in der Milz entgehen können (Rowe & Kyes, 2004).

Für den Wirt bedeutet dies die Entwicklung einer inflammatorischen Immunantwort (Suguitan *et al.*, 2003) und die Ablagerung von fibrinoidem Material (Walter *et al.*, 1982). Dies reduziert den Blutfluss in der Plazenta (Dorman *et al.*, 2003), was fetales Mangelwachstum, niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit mit sich bringt (Menendez *et al.*, 2000). Während einer Schwangerschaft entwickeln erkrankte Frauen Antikörper, die die Bindung von infizierten Erythrozyten an CSA-Rezeptoren inhibieren, so dass ein Schutzmechanismus gegen die gravierenden Folgen der Infektion bei zukünftigen Schwangerschaften besteht (Ricke *et al.*, 2000; O'Neil-Dunne *et al.*, 2001; Duffy & Fried, 2003a).

Neuere Studien geben Hinweise darauf, dass die parasitären Liganden, die zur Bindung an diesen Rezeptor führen, aus der Familie der „*Plasmodium falciparum* variant surface antigen“ Proteine stammen, die von sogenannten „var-Genen“ kodiert werden (Rowe & Kyes, 2004). Auch in der Malariaerkrankung nicht schwangerer Patienten wird die Adhäsion von infizierten Erythrozyten an Wirtszellen wie Endothel oder uninfizierte rote Blutkörperchen von der Familie der PfEMP-1 Proteine bewirkt (Baruch *et al.*, 1997; Rowe *et al.*, 1997).

PfEMP-Moleküle setzen sich aus tandemartig arrangierten Cystein- reichen Regionen zusammen, welche auch „Duffy Binding-like“ (DBL) genannt werden (Rowe & Kyes, 2004). Jeder Parasit trägt ca. 50-60 var-Gene, welche diese variablen Proteine kodieren. Auf einem infizierten Erythrozyten wird jeweils nur eine Variante des Proteins exprimiert (Chen *et al.*, 1998). Der Wechsel der möglichen Varianten ist mitunter verantwortlich für die Variabilität der Antigene der Malariaerkrankung (Papakrivos *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1995).

1.6 Immunologie

Es gibt mehrere Arten der Immunität der Malariaerkrankung: Eine Form reduziert die Häufigkeit der Todesfälle an Malaria, eine weitere dagegen setzt die Intensität klinischer Symptome trotz Infektion herab. Sie wird als antitoxische Immunität bezeichnet (Sinton & Shute, 1938). Die Fähigkeit von Einwohnern malariaendemischer Gebiete, eine persistierende Parasitämie ohne Fieberschübe zu tolerieren, wird der antitoxischen Immunität zugerechnet (Cox *et al.*, 1994; Rogier *et al.*, 1996). Eine dritte Art der Immunität richtet sich direkt gegen die Parasiten und reduziert somit die Anzahl an Plasmodien im Wirtsorganismus.

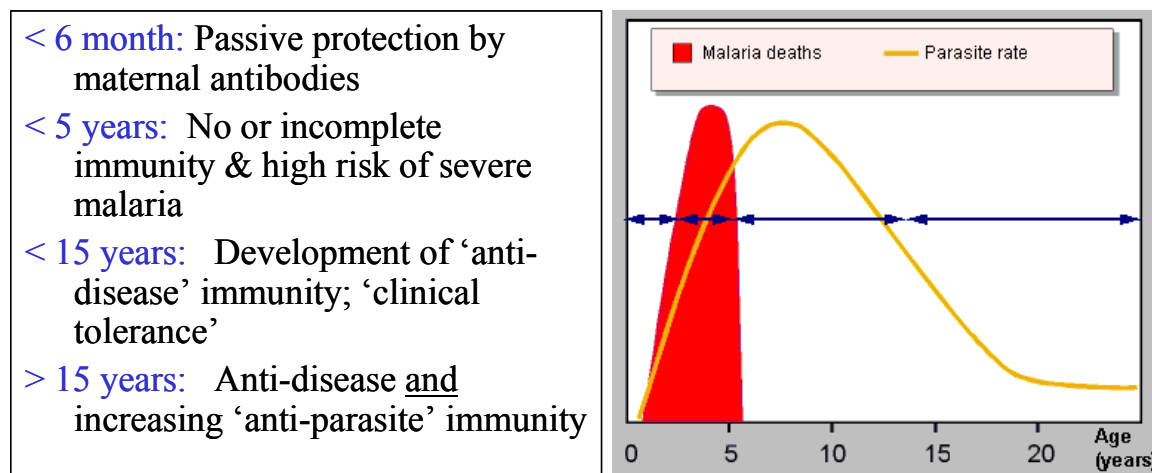


Abbildung 8: Immunität gegen Malaria (freundlich überlassen von Dorn, A.; La Roche, Basel)

Eine Voraussetzung für die Entwicklung der Immunität stellt eine lange Periode permanenter Infektion dar. Diese Immunität ist nicht andauernd und kein „Wegweiser“ für eine Impfstoff-Entwicklung. Kinder unter 6 Monaten werden passiv durch maternale Antikörper geschützt. Kinder unter 5 Jahren haben keine oder nur eine inkomplette Immunität und daher eine hohe Gefahr schwerwiegender Krankheitsverläufe. Jugendliche unter 15 Jahren entwickeln eine Immunität und beginnende klinische Toleranz. Über 15 Jahren zeigt sich eine steigende antiparasitäre Immunität.

Im Falle der *Malaria tropica* ist es möglich, dass bereits ein oder zwei durchgemachte Infektionen vor lebensbedrohlichen Komplikationen schützen können (Gupta *et al.*, 1999). Klinische Immunität gegen weniger schwere Komplikationen lässt sich dagegen erst nach häufigeren Infektionen erlangen (Ciuca *et al.*, 1934; Trape & Rogier, 1996) (siehe Abb. 8). Effektive antiparasitäre Immunität wird erst nach sehr häufigen Infektionen erlangt, die in relativ kurzen Abständen stattfinden (MacDonald, 1957; Jarolim *et al.*, 1991) (siehe Abb. 8). Darüber hinaus existieren Formen der nicht-protektiven Immunität des Wirtes: Der Wirtsorganismus bildet Antikörper gegen Antigene der sexuellen Formen der Parasiten, Gametozyten und Gameten. Diese Antikörper bewirken eventuell einen Effekt auf die Transmission in bestimmten endemischen Gebieten, beeinflussen die Verfassung des Wirtes jedoch kaum (Carter & Mendis, 2002).

Angriffspunkte der Immunabwehr sind dabei vor allem die freien Plasmodienstadien: Sporozoiten, Merozoiten und Gametozyten. Sporozoiten und Merozoiten befinden sich jedoch nur relativ kurze Zeit in der Blutbahn und befallen schnell Erythrozyten. Während der intrazellulären Lokalisation sind diese Parasitenstadien vor einem Angriff des Immunsystems relativ gut geschützt (Bradley *et al.*, 1990). Es werden vor allem Antikörper der Klassen IgG, IgM und IgA gebildet (Jhaveri *et al.*, 1997). Diesen Status, der einen relativen Schutz vor Infektionen bietet, nennt man auch Prä- oder Infektionsimmunität (Bruce-Chwatt, 1985b). Interessanterweise korreliert der Antikörper-Titer jedoch nicht mit dem Grad der Teilimmunität, was einen Hinweis auf die wichtige Beteiligung von T-Zellen liefert (Hill, 1992).

Das Erreichen einer schützenden Immunität gegen die krankheitsverursachenden asexuellen Stadien der Parasiten ist ein komplexer Prozess. Dies liegt darin begründet, dass sich dieser Schutz zum einen meist sehr spezifisch gegen eine bestimmte Parasiten-Spezies, zum anderen sogar gegen einen bestimmten Stamm, richtet (Jeffrey, 1966; Mendis *et al.*, 1991). Somit muss der Wirtsorganismus zuerst eine Vielzahl von Antikörpern bilden, die sich gegen ein breites Spektrum verschiedener Varianten von Antigenen unterschiedlicher Parasitenstämme und -spezies richtet, um gegen eine Folgeinfektion in einem bestimmten endemischen Gebiet einen gewissen Schutz zu erhalten (Carter & Mendis, 2002).

Da sich nicht nur die Antigenvarietät unterschiedlicher Stämme unterscheidet, sondern die Parasiten in unterschiedlichen Stadien ihres Lebenszyklus ebenfalls eine Variation an Antigenen bilden, muss der Wirt gegen jede Antigenvariante eine spezifische Abwehr bilden (Mendis *et al.*, 1991). Dieser Prozess kann Monate bis Jahre dauern.

Dadurch erklärt sich, warum Kinder kaum eine effiziente Immunität zeigen und meist an sehr schweren, komplizierten Formen der Malaria erkranken, während Erwachsene eine Toleranz gegenüber einer Infektion besitzen (Baird, 1995; Baird *et al.*, 1991).

Eine in Papua Neuguinea durchgeführte Studie belegte zum ersten Mal, dass die Präsenz von Antikörpern gegen GPIs direkt mit der *P. falciparum*-Parasitämie assoziiert ist (Boutlis *et al.*, 2002). Es wurde eine Gruppe Kinder und Erwachsene untersucht, die in einem Malaria-Endemiegebiet leben. Die Studie erbrachte Hinweise darauf, dass *P. falciparum* sowohl die Produktion gegen GPI gerichteter IgG- als auch IgM-Antikörper induzieren kann und dass die IgG Antwort im Erwachsenenalter länger persistiert. Die Prävalenz und Intensität der Antikörper-Antwort stiegen mit dem Alter und konnte bei Kindern in der Altersgruppe zwischen einem bis vier Jahren mit hoher Parasitämie als am geringsten eingestuft werden. Unter Kindern dieser Altersgruppe, die eine Toleranz gegen die Parasitämie während der Studie aufwiesen, zeigte nur ein geringer Prozentsatz (8,3%) eine IgG-Antwort. Eine IgM-Immunantwort war nicht nachweisbar (Boutlis *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass Anti-GPI-Antikörper nicht die einzigen Mediatoren einer Malaria-Toleranz sind, vor allem bei Kindern unter fünf Jahren. Säuglinge sind durch diaplazentare Antikörper, Antikörper aus der Muttermilch und noch vorhandenes fetales Hämoglobin (HbF) für die ersten Lebensmonate weitgehend geschützt (Bruce-Chwatt, 1952; Pasvol *et al.*, 1976).

Neben Kindern stellen splenektomierte Patienten eine weitere gefährdete Patientengruppe dar, da der Abbau infizierter Erythrozyten im Körper vor allem in der Milz erfolgt (Bradley *et al.*, 1990).

Redmond stellte 1941 die Hypothese auf, dass ein Intervall von wenigen Monaten ohne Infektion ausreichend scheint, den Schutz der erworbenen Immunität wieder zu verlieren. Es wurden bereits mehrere Fälle schwer erkrankter Studenten beobachtet, die nach längerem Aufenthalt in nicht Malaria-endemischen wieder in Malaria-gefährdete Gebiete heimgekehrt waren.

Neben der Ausbildung einer Immunität der Malaria, gibt es einige Enzymdefekte, die dem Organismus einen gewissen Schutz vor einer Infektion verleihen:

Dazu zählt der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel (G6PD), ursprünglich auch als Favismus bekannt, der sowohl homo- als auch heterozygot vorliegen kann. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass die Einnahme verschiedener Medikamente, darunter bestimmte Antimalariamittel wie Chinin, Primaquin, Mepacrin oder 4-Aminochinolon bei Patienten mit G6PD zu massiver Hämolyse führen kann.

Der Malariaschutz dieses Enzymmangels in Erythrozyten für eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* wurde bereits in mehreren Fall-Kontrollstudien in Afrika und Südostasien beobachtet (Luzzatto, 1979; Greene, 1993); sie kann bis zu 50%igen Schutz vor schwerer Malaria tropica bieten (Gilles *et al.*, 1967; Ruwende *et al.*, 1995).

Einige Studien belegten eine Schutzwirkung für sowohl homo- als auch heterozygote Individuen (Kruatrachue *et al.*, 1962; Kar *et al.*, 1992; Ruwende *et al.*, 1995), während andere lediglich auf einen Schutz für heterozygote Frauen hinwiesen (Bienzle *et al.*, 1972).

Cappadoro *et al.* stellten 1998 ein Modell für die Resistenzentwicklung in Individuen mit G6PD-Mangel auf, welches verdeutlicht, dass sowohl homo- als auch heterozygote Organismen einen gewissen Schutz besitzen. Die Invasion des Parasiten, sowohl in Erythrozyten mit als auch ohne Mangel an G6PD, läuft in beiden Fällen ähnlich ab. Demzufolge scheint der G6PD-Mangel keinen Einfluss auf diesen Prozess zu haben. Während des Ringstadiums der intraerythrozytären Entwicklung hat der Parasit im Vergleich zur Wirtszelle sehr wenig G6PD. Somit liegt in G6PD-defizienten Erythrozyten insgesamt sehr wenig Enzym vor. Dies ist mit einer Depletion von Glutathion (GSH) assoziiert, welche die defiziente, infizierte Zelle sehr verwundbar macht, selbst, wenn kein oxidativer Stress vorliegt. Die beschädigten Zellen werden anschließend phagozytiert (Cappadoro *et al.*, 1998). Ein weiterer Resistenz-verleihender Faktor ist in bestimmten Blutgruppen-Antigenen zu sehen, dem Duffy Locus. Der Duffy Locus kodiert einen Chemokin-Rezeptor und wird durch drei Allele charakterisiert: FY*A, FY*B, und FY*O (Hamblin & Di Rienzo, 2000).

Darüber hinaus ist das Duffy Antigen ein essentieller Rezeptor für Merozoiten von *P. vivax*, um Erythrozyten zu infizieren (Miller *et al.*, 1976; Mason *et al.*, 1977; Horuk *et al.*, 1993). Die Häufigkeit des FY*O-Allels (Duffy negativ), welches mit dem Fehlen des Fy-Antigens auf Erythrozyten korrespondiert, ist in Afrika südlich der Sahara sehr häufig, wird außerhalb dieses Kontinents jedoch sehr selten beobachtet. Die Häufigkeit der Duffy Negativität beginnt nun in Papua Neu-Guinea anzusteigen, in einem für *P. vivax* hoch endemischen Gebiet (Zimmermann *et al.*, 1999). Damit liegt die Vermutung nahe, dass bei Vorhandensein des FY*O-Allels die betreffenden Individuen einen Selektionsvorteil haben. Tatsächlich wurde ermittelt, dass Individuen, die homozygot für das FY*O-Allel sind, eine komplette Resistenz gegen *Plasmodium vivax* aufweisen (Hamblin & Di Rienzo, 2000).

Auch einige Erythropathien verleihen offenbar eine gewisse Resistenz gegenüber Plasmodien. Im Gegensatz zu Thalassämien oder dem G6PD-Mangel, die beide einen Schutz von ca. 50% vor einer Infektion bieten, das Todesrisiko jedoch nicht reduzieren, gibt es Mutationen in humanen Genen, die in mindestens 90% der Fälle vor tödlichen Komplikationen schützen.

Daher sind diese Erkrankungen vor allem in Malaria-endemischen Gebieten, wie in Schwarzafrika, Südostasien und im Mittelmeerraum typisch.

Eine der bekanntesten Mutationen, die zu einem solchen Schutz führt, ist die Sichelzellenanämie, die sowohl in heterozygoter als auch homozygoter Form vorliegen kann. Da die Krankheit in homozygoter Form bereits im Kindesalter in der Vielzahl der Fälle zum Tode führt, genießen heterozygote Genträger einen Selektionsvorteil in Malariagebieten. Bei dieser Erythropathie ist die β -Kette des Hämoglobins durch Punktmutation verändert. In Position 6 wird die physiologisch vorkommende Aminosäure Glutaminsäure durch die Aminosäure Valin ersetzt (Livingstone, 1967) was ein infolge Konformationsänderung verändertes Hämoglobin S bewirkt. Unter *in vitro* Bedingungen verhält sich das veränderte Protein ähnlich dem physiologischen, und es konnte keine Inhibition des Parasitenwachstums nachgewiesen werden. Unter desoxygenierten Bedingungen jedoch, welche direkt das physikalische Verhalten des HbS beeinflussen, werden die Parasiten schwer geschädigt. Es konnte gezeigt werden, dass desoxygenierte rote Blutkörperchen gänzlich mit HbS-Aggregaten gefüllt sind und nur wenig Platz für die Entwicklung der Parasiten lassen (Stetson, 1966). Das komplette Verschwinden von Parasiten in Kulturen mit Sichelzellanämie lässt einen lytischen Prozess vermuten. Dieser könnte seine Ursache im Platzen der fehlgeformten Erythrozyten und der darauf folgenden Freisetzung lytischer Enzyme haben. Dies scheint jedoch nur ein Grund für den Tod des Parasiten zu sein. Eine weitere Hypothese ist in diesem Kontext der Abbau fehlgeformter, infizierter Erythrozyten in der Milz (Friedman, 1978).

Auch für Hämoglobin C ist ein gewisser Schutz bekannt. Die Mutation in dem für Hämoglobin C kodierenden Gen führt an Position 6 der Beta-Kette zum Austausch der physiologisch vorkommenden Aminosäure Glutamat durch Lysin. Auch dieser Defekt kann homo- oder heterozygot vorliegen. Anders als bei der Sichelzellenanämie ist ein bis zu 90%iger Schutz vor Infektion jedoch mit Homozygotie für das betroffene Allel verbunden (Modiano *et al.*, 2001).

Das Vorliegen von Hämoglobin E wird ebenfalls vor allem in Gebieten beobachtet, die für Malaria endemisch sind. Hier liegt die Mutation an Position 26 der β -Kette von Hämoglobin A. Es erfolgt ebenfalls ein Austausch von Glutamat durch Lysin (Livingstone, 1967; Livingstone, 1971). Obwohl keine Schutzfunktion des Hämoglobin E gegen *P. falciparum* Infektionen bekannt ist, scheint ein Schutz gegen *P. vivax* Malaria vorhanden zu sein (Ray *et al.*, 1964).

Auch für bestimmte Thalassämien (alpha+ Thalassämien) konnte die Reduktion des Infektionsrisikos um ca. 50% belegt werden (Allen *et al.*, 1997).

Einen Hinweis auf die schützende Wirkung dieser Krankheit lieferte die Epidemiologie dieses Gendefektes. In Europa kann die weiteste Verbreitung im Mittelmeerraum beobachtet werden (Flint *et al.*, 1993; Haldane, 1948). Darüber hinaus weisen die Thalassämien eine große Häufigkeit in den Bevölkerungen Afrikas, Zentralasiens, Indiens, Südostasiens (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Livingstone, 1967) und anderen für Malaria bekannte Länder auf.

Thalassämien sind bestimmte Anämien, die ihre Ursache in Mutationen des Hämoglobinkodierenden Gens haben. Diese Mutationen verursachen den Verlust entweder einer alpha- oder einer beta-Kette dieses Moleküls (Higgs, 1993; Thein, 1993; Weatherall *et al.*, 2001). Viele unterschiedliche Mutationen in den Genen für die Alpha- und Betahämoglobinketten sind bekannt (Flint *et al.*, 1993).

1.7 Klinik der Malariaerkrankung (eine Zusammenfassung)

Nach einer Inkubationszeit von ca. 7-15 Tagen bei *Plasmodium falciparum*, 12-18 Tagen bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* und ca. 18-40 Tagen bei *Plasmodium malariae* beginnt die Symptomatik der Malariaerkrankung häufig mit Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Zeichen einer gastrointestinalen Infektion wie Diarrhöen und allgemeinem Krankheitsgefühl. Da die Beschwerden häufig einem Virusinfekt ähneln, ist die Gefahr der Fehlinterpretation der Symptomatik groß.

Die periodischen, fieberhaften Temperaturen sind gerade für die gefährlichste Art, die Malaria tropica, kein diagnostisches Kriterium, da es nur selten zum Auftreten eines rhythmischen „Wechselfiebers“ kommt, als welches die Malaria bereits seit dem Altertum bekannt ist. Nach einem noch milde verlaufenden Prodromalstadium von einigen Tagen setzen bei der durch *Plasmodium falciparum* verursachten Form der Malaria heftiger Schüttelfrost und rascher Anstieg der Körpertemperatur, bis hin zu 42°C, ein. Es können ebenfalls Hepatomegalie, Splenomegalie, Thrombopenie und eine Anämie, besonders in den ersten Tagen, auftreten.

Gefürchtete Komplikationen stellen das akute Nierenversagen, pulmonale Verlaufsformen, Kreislaufkollaps, hämolytische Anämie und disseminierte intravasale Koagulopathien, ebenso wie die zerebrale Malaria, mit dem Auftreten von zerebralen Krampfanfällen, Bewusstseinstörungen, bis hin zum Koma, dar.

Von einer komplizierten Malaria spricht man bei Vorliegen von mindestens einem der folgenden Befunde: bei zentralnervösen Symptomen, schwerer Anämie, Niereninsuffizienz, respiratorischer Insuffizienz, Hypoglykämie, Schock, Spontanblutungen etc. (Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, 2002; Robert-Koch-Institut, Merkblätter für Ärzte 2006).

Die Malaria tertiana wird durch *P. vivax* oder *P. ovale* verursacht und ist charakterisiert durch die Rhythmisierung der Fieberanfälle alle 48 Stunden. Die Erkrankung beginnt plötzlich mit Fieber und uncharakteristischen Beschwerden, bis sich die periodischen Fieberschwankungen einstellen. Typischerweise kommt es in den frühen Nachmittagsstunden zu Schüttelfrost, wobei im Verlauf die Körpertemperatur häufig auf Werte um 40°C ansteigt. Nach drei bis vierstündiger Dauer fällt die Temperatur schnell unter starken Schweißausbrüchen auf Normwerte ab. Tödliche Verläufe existieren bei dieser Form nur sehr selten.

Die Bildung von Ruheformen, sogenannten Hypnozoiten aus Sporozoiten in der Leberzelle, kann bei *P. vivax* Rezidive bis zu 2 Jahre, bei *P. ovale* bis zu 5 Jahre nach der Infektion bewirken.

Die Malaria quartana wird durch *P. malariae* hervorgerufen und ist die seltenste der Malariaarten. Die Symptomatik wird charakterisiert durch das Fieber im 72-Stunden-Rhythmus. Rückfälle können bis zu 40 Jahre nach der Infektion auftreten.

Ein Erklärungsversuch bietet die Bildung von Leber-„Hypnozoiten“, die durch unbekanntem Stimulus reaktiviert werden und Merozoiten freisetzen. Eine zweite Hypothese beschreibt das Verbleiben von Merozoiten in der Blutbahn selbst, die nach Jahrzehnten reaktiviert werden können.

1.8 Diagnostik der Malariaerkrankung

Grundsätzlich sollte eine Malariadiagnostik bei jedem Patienten mit Fieber nach einem Tropenaufenthalt durchgeführt werden. Sie sollte unabhängig davon erfolgen, ob ein monosymptomatisches oder ein Fieber mit Begleitsymptomen vorliegt. Etwa 90% der Tropicafälle manifestieren sich innerhalb von vier Wochen nach Rückkehr aus dem Malariagebiet. Tropicafälle, die nach einer Latenz von mehr als drei Monaten auftreten, sind selten. Dies trifft jedoch für Malaria tertiana und quartana nicht zu. Hier ist mit wesentlich längeren Inkubationszeiten zu rechnen (Monate, in seltenen Fällen auch Jahre).

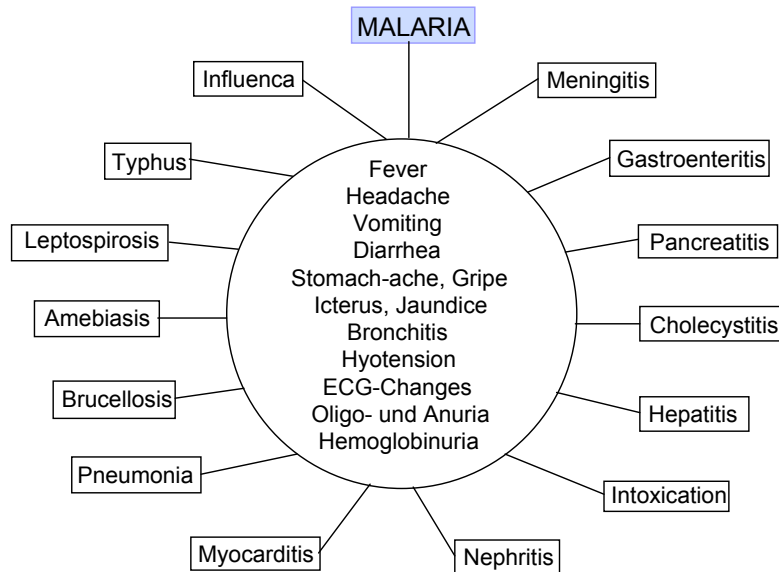


Abbildung 9: Symptome und Differentialdiagnostik der Malaria (freundlich überlassen von Dorn, A.; La Roche, Basel)

Übersicht möglicher Differentialdiagnosen bei Malaria-Symptomatik

Zur Basisdiagnostik zählen vor allem der sogenannte „Dicke Tropfen“ und ein dünner, herkömmlicher Blutausschlag (WHO, 2006). Beide Methoden zählen heute zum „Goldstandard“.

Das Prinzip des „dicken Tropfens“ basiert auf der Verwendung größerer Volumina und somit erhöhter Wahrscheinlichkeit des Auffindens von Parasiten. Die Erythrozyten werden durch Wasser in der Färbelösung hämolysiert. Parasiten werden somit durch die Anreicherung leichter unter dem Mikroskop (z.B. mit Öl-Immersionssprinzip) erkennbar. Der dicke Tropfen entsteht durch Aufbringen eines Tropfens Kapillar- oder antikoagulierten Venenblutes auf einen Objektträger und Verreiben der Probe.

Dem Trocknungsvorgang schließt sich direkt die Färbung mit Giemsa-Lösung an, ohne vorher eine Fixierung durchzuführen. Dadurch werden die korpuskulären Blutbestandteile lysiert, so dass die Parasiten leichter aufzufinden sind. Folglich erleichtert sich zwar die Diagnostik der Erkrankung, aber die Bestimmung der Spezies, die ebenfalls eine wichtige Rolle zur Therapieentscheidung spielt, wird durch die Lyse der Erythrozyten erschwert.

Daneben besteht die Möglichkeit, einen regulären dünnen Blutausschlag durchzuführen, der sich in der Herstellung vor allem durch die Fixierung des Ausstrichs (z.B. mit Methanol) vom dicken Tropfen unterscheidet. Hier werden die intraerythrozytären Parasiten durch Anfärbung mit Giemsa-Lösung sichtbar gemacht, was eine Zuordnung zu einer Plasmodien-Spezies entscheidend erleichtert.

Für die Bestimmung der Plasmodien-Spezies ist die Morphologie der befallenen Erythrozyten von großer Bedeutung. Die sogenannte „Schüffner-Tüpfelung“, eine feine rosafarbene Punktierung, verbunden mit dem Blasserwerden der Erythrozyten, ist beispielsweise charakteristisch für eine Malaria tertiana (Roche Lexikon der Medizin, 5. Auflage 2003). Dagegen stellen sich von *Plasmodium falciparum* infizierte rote Blutkörperchen weder vergrößert noch getüpfelt dar. Gelegentlich fallen bei kräftiger Färbung große Flecken von unregelmäßigem Umriss, die sogenannte „Maurer Fleckung“ (Roche Lexikon der Medizin, 5. Auflage, 2003), auf.

Eine Speziesdifferenzierung sollte in jedem Fall erfolgen, da die Therapie der verschiedenen Malariaformen unterschiedlich ist.

Neben diesen beiden herkömmlichen, bei einem erfahrenen Untersucher sehr zuverlässigen und kostengünstigen Verfahren (WHO, 2006), wurde eine Reihe weiterer Methoden zur Diagnostik entwickelt:

Dazu zählen sogenannte „Malaria-Schnelltests“ (z.B. ICT Malaria P.F.®-Test, OptiMal®-Test), die unter anderem auf dem immunochromatographischen Nachweis von *P.falciparum*-histidine rich protein 2 (PfHRP-2) oder parasitenspezifischer Laktatdehydrogenase (pLDH) beruhen. Diese Schnelltests haben jedoch eine geringere Zuverlässigkeit als die eben aufgeführten Verfahren, da sie sowohl bei Patienten mit hoher als auch bei zu geringer Parasitämie negativ ausfallen können (WHO, 2006). Darüber hinaus kann ein positiver Rheuma-Faktor-Titer zu falsch positiven Ergebnissen führen. Allerdings birgt auch die Sichtung der Blutausstriche durch einen ungeübten Untersucher ein ähnlich hohes Risiko für Fehlinterpretationen.

Die QBC-Methode (quantitative buffy coat) wurde ursprünglich zur Bestimmung der korpuskulären Blutbestandteile entwickelt. Sie bedient sich des Prinzips der Anreicherung der Parasiten unter dem „Buffy coat“ durch Zentrifugation in speziellen Kapillarröhrchen und Anfärbung der Parasiten-DNA mit Acridin-Orange. Die dafür erforderliche Spezialausrüstung ist jedoch lediglich in Speziallaboratorien vorhanden.

Ein weiteres, nicht überall verfügbares Diagnostikum stellt der Nachweis amplifizierter Plasmodien-DNA mittels PCR dar. Der Vorteil dieser Methode besteht in der sicheren Speziesdifferenzierung bei geringer Plasmodiendichte, dem sicheren Ausschluss einer Infektion und dem Ausschluss oder der Sicherung einer Resistenz.

Heute gilt als gesichert, dass einige Chloroquin-Resistenzen auf einer Punktmutation in zwei Genen, *pfert* und *pfmdr 1*, beruhen, welche die Transmembranproteine PfCRT und Pgh 1

kodieren (Djimde *et al.*, 2001). Diese Mutation kann folglich als Marker für das Vorliegen einer Chloroquin-Resistenz fungieren, die sich mittels PCR nachweisen lässt.

Serologische Untersuchungen, wie beispielsweise Immunfluoreszenztest oder ELISAs, sind nicht nur sehr kostenaufwändig, sondern auch im Anfangsstadium der Infektion wenig aussagekräftig, da Antikörper erst zwischen 6-10 Tagen *post infectionem* nachweisbar sind.

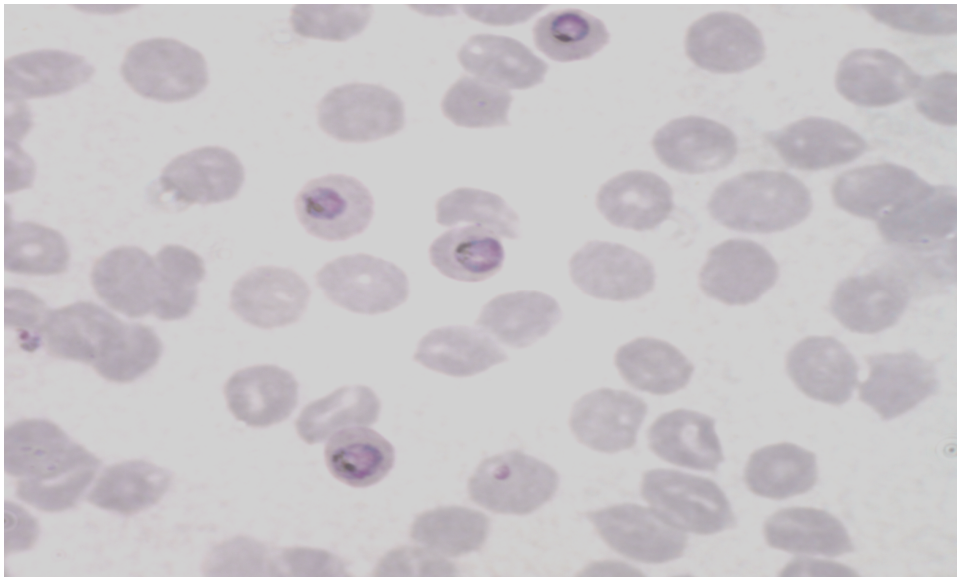


Abb. 10: Blutausstrich (Santos de Macedo, AG Parasitologie, Marburg)
Die Abbildung zeigt mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten. Die Parasiten liegen im Ringstadium vor.

1.9 Therapie und Prophylaxe der Malariaerkrankung

1.9.1 Therapie

Aufgrund der herausragenden Bedeutung der Malaria während der vergangenen 3000 Jahre besitzen wir heute verhältnismäßig gute Kenntnisse früherer Behandlungsmethoden. Zu den ältesten Überlieferungen gehören die Babylonischen Keilschriften. In ihnen wird das Fieber als Fluch der Gottheit, die als geflügelter Fieberdämon dargestellt wird, beschrieben. Im indischen Atharvaveda (entstanden 1200 bis ~600 v. Chr.) wird Takman, der Unhold des Fiebers, genannt und in Zaubersprüchen besungen. Im chinesischen Kulturkreis vermochte sich ein Therapeutikum durchzusetzen, dessen Wiederentdeckung 1971 gelang: Qinghaosu, das man aus *Artemisia annua* gewinnt und das bereits vor 1600 Jahren in China als Antimalariamittel angewendet wurde.

Die Neuzeit der Malariatherapie beginnt in der Mitte des 17. Jahrhunderts mit der Einführung des Chinins in Europa. Chinin wurde in Form der pulverisierten Rinde des Chinarindenbaums, *Chinchona succirubra*, verabreicht. In der Sprache der Ketchua-Indianer war dies die „gute Rinde“, quina quina. Im Jahre 1820 gelang es den französischen Chemikern Pelletier und Caventou, Chinin aus pulverisierter Chinarinde zu isolieren. Bis zur vollen Synthese dieses Alkaloids vergingen aber noch über 100 Jahre. 1931 gelang es dem Chemiker P. Rabe Dihydrochinin zu synthetisieren und 1945 erreichte R. B. Woodward auch die Totalsynthese. Rabes Arbeiten ebneten den Weg für Medizinalchemiker, die Chinin-Struktur systematisch zu modifizieren und nach einfacheren chemischen Derivaten zu suchen. Ausgehend vom Chinin wurde bei Bayer 1926 mit Plasmochin das erste synthetische Antimalariamittel entwickelt. Bis in die 1970er Jahre lief die Entwicklung neuer Antimalariamittel auf Hochtouren, weniger aus humanitären Gründen, sondern wegen dringenden Bedarfs für kämpfende Soldaten in Malariagebieten (2. Weltkrieg, Koreakrieg, Vietnamkrieg). Meilensteine des Erfolgs dieser Forschung sind die Einführung wichtiger Antimalariasubstanzen wie Pamaquin (1932), Quinacrin (1933), Chloroquin (1945), Amodiaquin (1945), Primaquin (1950) und schließlich Mefloquin (1984).

Um eine sinnvolle Therapie gegen Malaria einzuleiten, sollte zuvor eine Einordnung in eine Therapiegruppe erfolgen. Die Wahl des Medikamentes richtet sich unter anderem nach dem Erreger, nach dem Infektionsgebiet, dem Vorliegen von Resistenzen, nach einer eventuell durchgeführten Chemoprophylaxe, nach dem Schweregrad der Erkrankung (kompliziert oder unkompliziert) und natürlich nach dem Alter, Allergien, Medikamentenunverträglichkeiten und dem eventuellen Vorliegen einer Schwangerschaft.

Die Medikamente haben jeweils andere Stadien des Entwicklungszyklus der Parasiten zum Ziel (Tracey & Webster, 1996), die meisten wirken jedoch auf das intraerythrozytäre Stadium. Folglich lassen sich Antimalariamittel je nach ihrem Wirkungsmechanismus in unterschiedliche Klassen einteilen.

1. „Gewebschizontozide“, gegen gewebständige Parasiten, z.B. in der Leber
2. „Blutschizontozide“, gegen das „Blutstadium“ der Parasiten
3. „Gametozide“, gegen Gametozyten

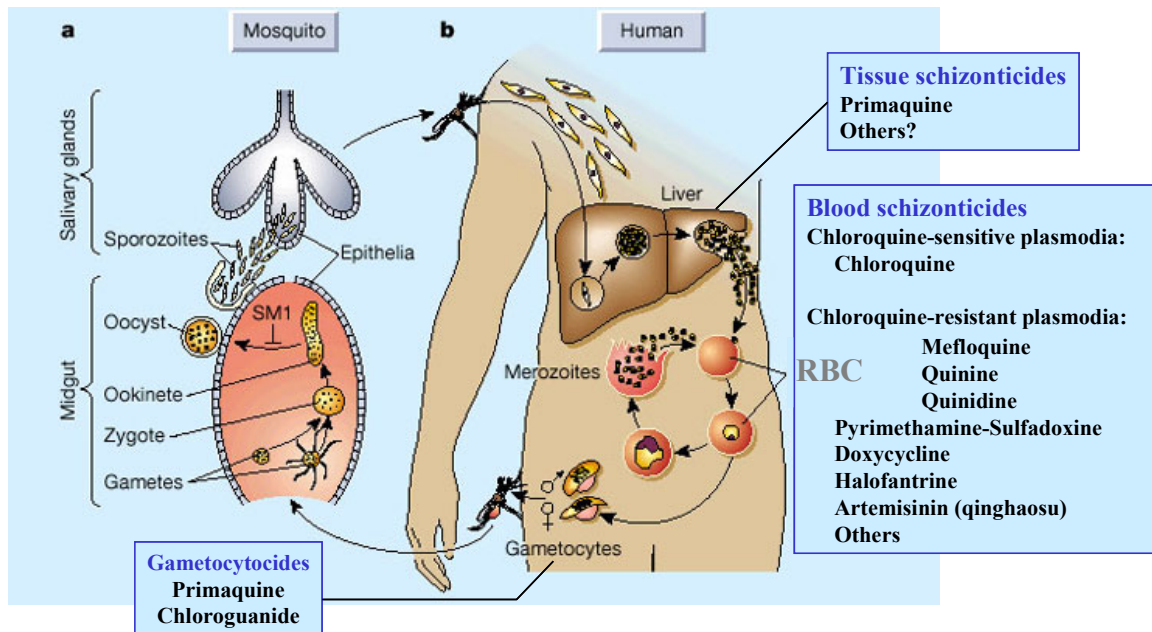


Abbildung 11: Lebenszyklus des Malariaparasiten und Behandlungsmöglichkeiten (Miller *et al.*, 2002 ; modifiziert von Dorn, A.; La Roche, Basel)

Die erste Klasse beinhaltet das 8-Aminoquinolin Primaquin und weitere Medikamente zweiter Klasse mit eventueller Wirksamkeit gegen Blutschizonten. Die zweite Klasse umfasst Medikamente wie Chloroquin (bei sensitiven Plasmodien), Mefloquin, Chinin, Chinidin, Pyrimethamin-Sulfadoxin, Doxycyclin, Halofantrin, Artemisinin und andere (bei Chloroquin-resistenten Plasmodien) und richtet sich gegen das „Blutstadium“ der Parasiten. Medikamente dritter Klasse wie Primaquin und Chloroguanid zeigen Wirksamkeit gegen Gametozyten.

Die meisten Medikamente gegen Malaria wirken gegen das Blutstadium der Parasiten und gehören somit zur zweiten Klasse. Eine der am häufigsten genutzten Stoffgruppen ist die der Folat-Antagonisten, gegen welche jedoch Resistenzen bereits weit verbreitet sind (Plowe *et al.*, 1998). Zu den Folat-Antagonisten der Gruppe eins zählen Sulfonamide und Sulfone. Sie verhindern die Formation von Dihydropteroat aus Hydroxymethyldihydropterin. Der Gruppe zwei gehören Pyrimethamin, Biguanide und Quinazoline an, die die Dehydrofolatreduktase der Parasiten inhibieren und somit die Synthese von Purin-Nukleotiden hemmen (Olliaro, 2001).

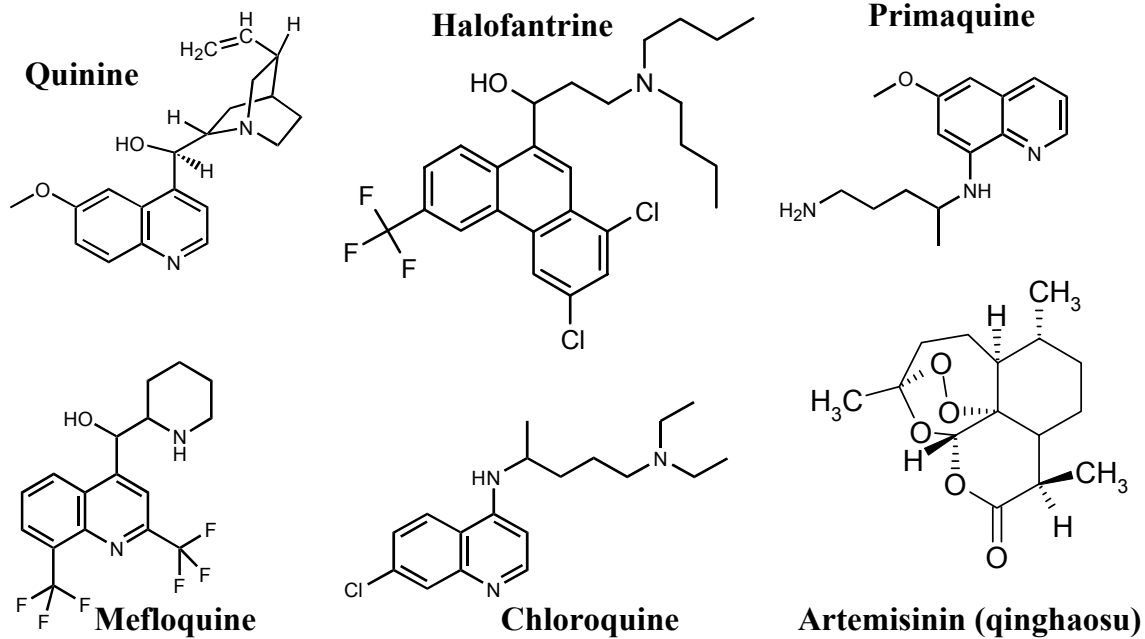


Abbildung 12: Strukturen wichtiger Antimalariamedikamente
(Ridley, R.; freundlich überlassen von Dorn, A.; La Roche, Basel)

Die Resistenzen der Gruppe zwei lassen sich auf Mutationen des kodierenden Gens zurückführen, welche zu Substitutionen in der Aminosäuresequenz führen (Olliaro, 2001). Atovaquon, das sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie in Kombination mit Proguanil genutzt wird, beeinflusst mitochondriale Funktionen. Der genaue Wirkungsmechanismus von Atovaquon als auch die synergistische Wirkung mit Proguanil ist heute noch ungeklärt. Ebenfalls zur großen zweiten Klasse der Medikamente gehört die Stoffgruppe der Quinoline. Sie ist eine der am häufigsten genutzten Medikamente zur Therapie der Malaria. Zur Gruppe eins dieser Medikamente zählen die 4-Aminoquinoline Chloroquin und Amodiaquin, während bekannte Vertreter der Gruppe zwei die 4-Quinolinemethanole Chinin, Mefloquin und Halofantrin darstellen (Olliaro, 2001). Obwohl diese Medikamente seit Jahren im Handel sind und viele Hypothesen über den Wirkungsmechanismus existieren, ist der Mechanismus bis heute unklar (O'Neill *et al.*, 1998; Basco *et al.*, 1994).

Zur Therapie der Malaria tertiana ist Chloroquin Mittel der Wahl, da Chloroquin-resistente *Plasmodium vivax* Erreger nur sporadisch in einigen Ländern Südostasiens und Ozeaniens vorkommen (Robert-Koch-Institut, 2006).

Chloroquin zeigt jedoch, wie alle 4-Aminoquinoline, keine Wirksamkeit gegen die leberständigen Hypnozoiten, die sowohl von *Plasmodium vivax* als auch von *Plasmodium ovale* gebildet werden können. Daher sollte bei Malaria tertiana eine Abschlussbehandlung

mit dem 8-Aminoquinolin Primaquin erfolgen (nach vorherigem Ausschluss eines Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangels). Dieses Medikament stellt den wichtigsten Vertreter der Stoffklasse ein mit Wirksamkeit gegen gewebständige Parasiten dar. Die Therapie der Malaria quartana sieht ebenfalls die Verabreichung von Chloroquin vor. Da *Plasmodium malariae* keine Hypnozoiten ausbilden kann, ist hier die anschließende Gabe von Primaquin nicht erforderlich.

Der Erreger der gefährlichsten Art der Malaria, *Plasmodium falciparum*, weist in fast allen tropischen Ländern bereits Resistenzen gegen Chloroquin oder Sulfadoxin-Pyrimethamin auf (Ridley, 2002). Mittel der Wahl bei unkompliziertem Verlauf der Infektion stellen Mefloquin, Atovaquon plus Proguanil oder Artemether plus Lumefantrin dar. Die WHO empfiehlt auch bei unkomplizierter Malaria bereits Kombinationstherapien mit zwei oder mehr Schizontoziden (WHO, 2007).

Bei komplizierter Malaria tropica sollte unter intensivmedizinischen Bedingungen eine parenterale Chinin-Gabe in Kombination mit Doxycyclin erfolgen (Robert-Koch-Institut, 2006), beziehungsweise Chinin in Kombination mit Artemether oder Artemisinin (WHO, 2006). Intravenöse Chininpräparate sind zwar in Deutschland nicht zugelassen, sind aber in infektiologischen und tropenmedizinischen Spezialzentren verfügbar.

Neben den Resistenzen stellen die teilweise nicht unerheblichen Nebenwirkungen der Antimalariamittel ein großes Problem dar. So zeigt beispielsweise Chinin besonders bei intravenöser Verabreichung ein hohes kardioarrhythmisches Potential. Auch die fixe Kombination Artemether/Lumefantrin ist bei Herzerkrankungen kontraindiziert.

Chloroquin kann in seltenen Fällen eine Augenerkrankung mit Netzhautschäden verursachen, deshalb sollten bei regelmäßiger Anwendung augenärztliche Kontrollen erfolgen.

Die Kombination von Chloroquin und Proguanil zeigt zwar eine bessere Wirkung in Gebieten mit partieller Chloroquinresistenz, durch die herabgesetzte Compliance aufgrund von mangelhafter Verträglichkeit ist die Wirkung dennoch schlechter als bei anderen Mitteln.

Mefloquin kann sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe von Malaria tropica angewendet werden, zeigt jedoch häufig Nebenwirkungen im psychovegetativen Bereich.

Wegen ernstzunehmender Nebenwirkungen, wie etwa dem Auftreten eines Stevens-Johnson-Syndroms in 1:10.000 Fällen, ist die Kombination Sulfadoxin/Pyrimethamin in Deutschland nicht mehr zugelassen, kommt jedoch in Afrika noch zum Einsatz.

Unter anderem hat auch der inadäquate Gebrauch von Antimalariamitteln in den letzten Jahrzehnten, vor allem die Verabreichung von Monotherapien, zu der heutigen Situation der Mehrfachresistenzen geführt. Aus diesem Grunde empfiehlt die WHO heute in

allen Ländern mit bekannten Resistenzen, Kombinationstherapien, bevorzugt mit Artemisinin-Derivaten als wichtigem Bestandteil gegen Falciparum-Malaria, einzuleiten. Diese Therapie ist in Drittweltländern jedoch zu teuer, da Artemisinin nicht synthetisch herzustellen ist und seine Derivate nicht einfach zu synthetisieren sind.

Der genaue Wirkmechanismus der Artemisinin-Derivate ist zur Zeit noch nicht bekannt. Nach einer Hypothese würden Fe^{2+} Ionen aus dem Hämoglobinabbau die Spaltung der Peroxid-Brücke des Artemisinin-Moleküls katalysieren und zur Bildung hochreaktiver, freier Radikale führen. (Ridley, 2003). Diese Radikale binden an Proteine und Lipide und inhibieren den Stoffwechsel des Parasiten und bewirken so das Absterben des Erregers (Meshnick *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 2001).

Während des Wachstums in den Erythrozyten baut der Parasit bis zu 80% des menschlichen Hämoglobins in der Nahrungsvakuole, einer „Zell-Organelle“ ab. Dabei wird zunächst das Globin durch sogenannte „Aspartische Proteasen“ vom Häm abgespalten und Häm freigesetzt. Das Fe^{2+} des Häms wird zu sehr reaktivem, für den Parasiten toxischen Fe^{3+} oxidiert. Die Entgiftung der Hämgruppe mit Fe^{3+} erfolgt durch seine Polymerisation zu Hämozoin (Ridley, 2003). Cystein-Proteasen und weitere Endo- und Exopeptidasen zerlegen die Globinfragmente in kleinere Peptide und Aminosäuren, die der Parasit für seinen Metabolismus benötigt (Ridley, 1997).

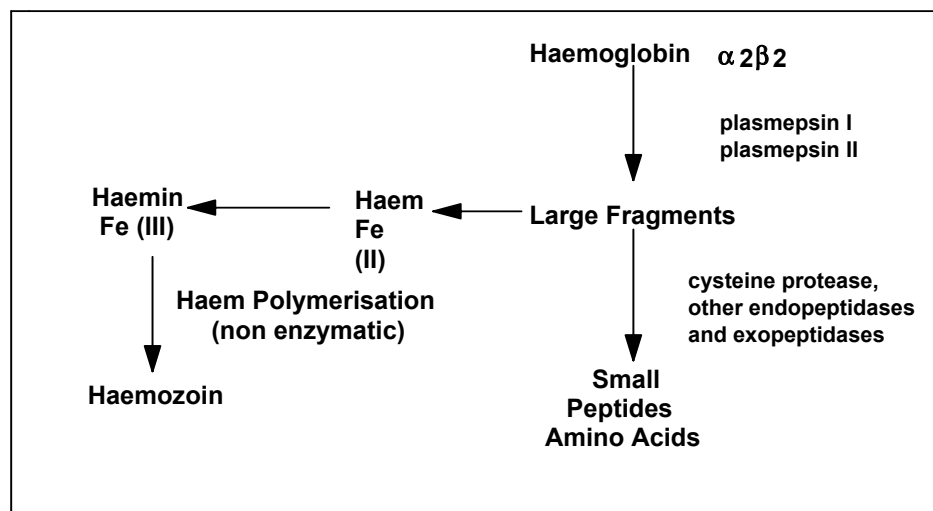


Abbildung 13: Hypothese zum Abbau des Hämoglobins durch den Malariaparasiten (Olliaro, 2001; modifiziert von Dorn, A; La Roche Basel.)

Hämoglobin ($\alpha_2\beta_2$) wird durch Plasmepsin in große Fragmente „zerlegt“. Durch weiteren Abbau durch Proteasen und Peptidasen entstehen kleinere Peptide und Aminosäuren. Das freiwerdende Häm wird zu Hämin oxidiert und dieses in einer nicht-enzymatischen Reaktion zu „Hämozoin“, dem „Malariapigment“, polymerisiert.

Die 4-Aminoquinoline (wie Chloroquin oder Mefloquin) hemmen vermutlich die Polymerisation des Häms zu Hämозoin und wirken deshalb toxisch auf den Parasiten. Nach einer zweiten Hypothese inhibiert Artemisinin irreversibel ein Enzym des parasitären Mechanismus, eine Calcium-abhängige ATPase (PfATP6) (Krishna *et al.* 2004), welche der des menschlichen Organismus im Sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) sehr ähnlich ist (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Dennoch wird bei Applikation einer Artemisininindosis, die 50 Mal ausreichen würde, um PfATP zu inhibieren, die des humanen SERCA nicht beeinflusst (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Bisher ist dennoch noch nicht bewiesen, dass aktiviertes Artemisinin im Parasiten in den entsprechenden Hemmkonzentrationen an PfATP6 bindet. Das Bestreben der WHO ist es nun, den Zugang zu dieser Medikamentengruppe zu erleichtern.

Die Chemotherapie der Malaria hat sehr von der Entwicklung der Medikamentengruppe der Artemisinine profitiert, da sie schnell die Parasitenlast des Organismus verringern, gute Verträglichkeit zeigen und darüber hinaus sehr gute therapeutische Erfolge aufweisen (White *et al.*, 1997). Obwohl ein Artemisinin-resistenter Stamm von *P. yoelii* isoliert werden konnte, wurde bisher von keiner klinisch relevanten Artemisinin-Resistenz bei humanen Malaria-Parasiten berichtet (White *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000).

Ein großer Nachteil dieser Stoffklasse besteht allerdings in der schlechten Bioverfügbarkeit und der eingeschränkten Pharmakokinetik (White *et al.*, 1999; Ridley, 2002).

„Medicines for Malaria Venture“ (MMV), eine gemeinnützige Organisation, die zur Erforschung und Entwicklung neuer Antimalariamedikamente gegründet wurde, unterstützt ein Projekt, das die Entwicklung eines neuen Peroxid-Antimalariamittels zum Ziel hat. Es wird eine einfach und billig zu synthetisierende Substanz mit hoher oraler Aktivität, guter Bioverfügbarkeit und ohne neurotoxische Eigenschaften angestrebt. Obwohl die derzeit erhältlichen Artemisinin-Derivate sehr schnell wirken, ist ihre Halbwertszeit begrenzt, was zu Recrudescenz führt. Die neu-entwickelte Substanz OZ277, ein Trioxolan, zeigte sich in ersten Tests den derzeitigen Artemisinin-Derivaten deutlich überlegen und zeichnet sich durch gute Potenz, Pharmakokinetik und geringe Toxizität aus (Maerki *et al.*, 2006). Erste Studien am Menschen in Großbritannien haben die gute Verträglichkeit belegt (Vennerstrom *et al.*, 2004).

1.9.2 Prophylaxe

Die Prophylaxe der Malariaerkrankung gliedert sich in eine Expositionsprophylaxe zur Vermeidung von Insektenstichen und eine Chemoprophylaxe als medikamentöse Vorbeugung.

Die Vermeidung von Insektenstichen umfasst zum Teil sehr einfache und kostengünstige Verfahren, wie die Anwendung von Moskitonetzen, Einreiben unbedeckter Hautstellen mit mückenabweisenden Mitteln, sogenannten Repellentien, Tragen von hautbedeckender Kleidung und Aufenthalt in moskitosicheren Räumen mit Klimaanlage und Fliegengitter (Robert-Koch-Institut, 2006; WHO 2007).

Da die Anophelesmücke nachtaktiv ist (mit Beginn der Dämmerung), stellt bereits der Aufenthalt in Räumen ab diesem Tagesabschnitt eine sinnvolle Expositionsprophylaxe dar. Einen zusätzlichen Schutz bietet die Kombination mehrerer Verfahren, wie die Imprägnierung von Moskitonetzen und Kleidungsstücken oder sogar die Behandlung imprägnierter Kleidung mit einem zusätzlichen Repellent. Eine weitere sinnvolle Ergänzung bietet die Verwendung von Insektiziden in Aerosolen, Verdampfern und Räucherspiralen (WHO, 2004; Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, 2004; Robert-Koch-Institut, 2006; AWMF 2004).

Die medikamentöse Prophylaxe gegen die Malariaerkrankung ist erschwert durch die Verbreitung von Resistenzen, die je nach Region unterschiedlich sind.

Eine besondere Rolle spielt hier die Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegen Chloroquin, die vor allem in Asien, im Amazonasbecken und in Afrika, besonders südlich der Sahara, vorkommt. Die Chemoprophylaxe bietet keinen absoluten Schutz vor Malaria, erhöht jedoch die Sicherheit vor Infektion entscheidend. Die Auswahl des Medikamentes muss individuell anhand des Reiseziels, Reiseart, Reisedauer und des Nebenwirkungsprofils, bzw. relevanter Vorerkrankungen des Patienten getroffen werden. Wird keine Prophylaxe durchgeführt, sollte ein Reservemedikament als sogenanntes „Stand-by-Mittel“ verfügbar sein, welches im Falle von malariaverdächtigen Symptomen und nicht erreichbarer ärztlicher Hilfe als Notfallmedikament eingenommen werden kann.

Zur Chemoprophylaxe der Malaria eignen sich in geringerer Dosierung die meisten auch therapeutisch wirksamen Antimalariamittel; Doxycyclin allein stellt jedoch ein lediglich zur Prophylaxe geeignetes Medikament dar und kann vorbeugend alternativ zu Mefloquin oder Atovaquon und Proguanil eingesetzt werden (Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, 2004).

1.10 Glykosylphosphatidylinositole

Glykosylphosphatidylinositole (GPIs) sind komplexe Glykolipide, die bei allen Eukaryonten vorkommen. Die erste Charakterisierung gelang bei dem Protozoon *Trypanosoma brucei brucei* (Ferguson, 1985; Ferguson, 1988). GPIs wurden sowohl in freier als auch in proteingebundener Form beschrieben (Gerold *et al.*, 1994; 1996; Kinoshita *et al.*, 1997; Striepen *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 2000; Zinecker *et al.*, 2001). Als freie GPIs stellen sie Stoffwechselprodukte dar und erfüllen zahlreiche Funktionen.

Eine wichtige Aufgabe besteht in der Verankerung von Proteinen in der Zellmembran von Eukaryonten (Kinoshita & Inoue, 2000). Vor allem für Protozoen stellt die Proteinverankerung über GPIs die wichtigste Funktion dar. Zahlreiche Oberflächenproteine sind über GPIs in der Membran verankert (VSG bei *T. brucei*; MSP bei *P. falciparum*; SAG1 bei *T. gondii*).

Auch bei Säugern werden wichtige Proteine über GPIs an der Zelloberfläche verankert: Dazu zählen unter anderem die Alkalische Phosphatase in Hepatozyten (Kihn *et al.*, 1990), die Acetylcholinesterase der Erythrozyten (Hooper, 1997), Adhäsionsmoleküle wie NCAM oder der Decay Accelerating Factor (DAF) (Field & Menon, 2002). Die Funktionen dieser GPI-verankerten Proteine sind jedoch sehr vielfältig: Dazu gehören beispielsweise hydrolytische Enzyme, Adhäsionsproteine, Komplement-regulierende Proteine, Rezeptoren, Antigene und Prionproteine als verursachendes Agens der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) des Tieres und der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK) des Menschen (Varki *et al.*, Essentials of Glycobiology, 1999).

Die Synthese von Proteinen geschieht durch Translation an Ribosomen der Zelle, wobei der genetische Code zunächst in mRNA und schließlich in eine Aminosäuresequenz übersetzt wird. Die meisten der gebildeten Proteine werden anschließend cotranslational oder posttranslational modifiziert, um ihre endgültige Struktur und somit ihren Funktionszustand zu erreichen (Gowda *et al.*, 1997). Häufige Modifikationen entstehen durch Fettsäuren, Phosphate, Isoprenoide, Diacylglycerole, Glykane oder Kombinationen dieser Moleküle. Diese posttranslationale Veränderung ist sowohl für die Funktion des resultierenden Proteins als auch für den Transport des Moleküls von großer Bedeutung (Clayton *et al.*, 1995).

Beispiele für Glykanmodifikationen von Proteinen sind N-Glykosylierung und O-Glykosylierung. Dabei handelt es sich um die Übertragung von Oligosaccharidketten auf bestimmte Aminosäuren. Die Bindung der N-Glykane erfolgt über das Stickstoffatom der

Aminosäure Asparagin in der Seitenkette. Dies ist nur möglich, wenn sich Asparagin innerhalb einer bestimmten Aminosäuresequenz befindet (Asp-X-Ser/Thr).

O-Glykane sind Oligosaccharidketten, die über eine Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin oder Threonin an das Protein gebunden werden.

Auch die bereits erwähnte Bindung von GPIs an Protein stellt eine Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation dar (Ferguson *et al.*, 1985; Ferguson, 1999).

GPIs werden im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, auf den Carboxyl-Terminus eines eine GPI-Bindungsstelle tragenden Proteins übertragen und anschließend zur Zellmembran transportiert (Kinoshita & Inoue, 2000). Die Struktur des GPI-Ankers kann je nach Zelle und Spezies variieren. Es wird angenommen, dass GPI-bindende Proteine, die aus einer Zelle stammen, identische oder ähnliche Anker tragen (Field & Menon, 2002).

Das Fehlen von GPIs ist extrem selten und wurde noch nie in einem neugeborenen Säuger beobachtet, was auf die enorme Wichtigkeit und hohe Anzahl an GPI-gebundenen Proteinen schließen lässt (Field & Menon, 2002).

Medizinisch von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH), die durch einen Defekt von GPI-gebundenen Proteinen an der Zelloberfläche von Eukaryonten, verursacht wird (Tomita, 1999).

Zu den betroffenen Proteinen zählen DAF oder CD59, die bei Defekt des GPI-Ankers ihrer Funktion, dem Schutz vor komplementvermittelter Lyse der Zelle, nicht mehr nachgehen können (Rosse, 1990; Boccuni *et al.*, 2000). Die Ursache des Defekts ist im ersten Schritt der GPI-Synthese zu finden, die Bildung von GlcNAc-PI ist gestört (Takahashi *et al.*, 1993).

Mutationen in einem an diesem Schritt beteiligten Gen, PIG-A, konnten bei allen betroffenen Patienten nachgewiesen werden (Miyata *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1995).

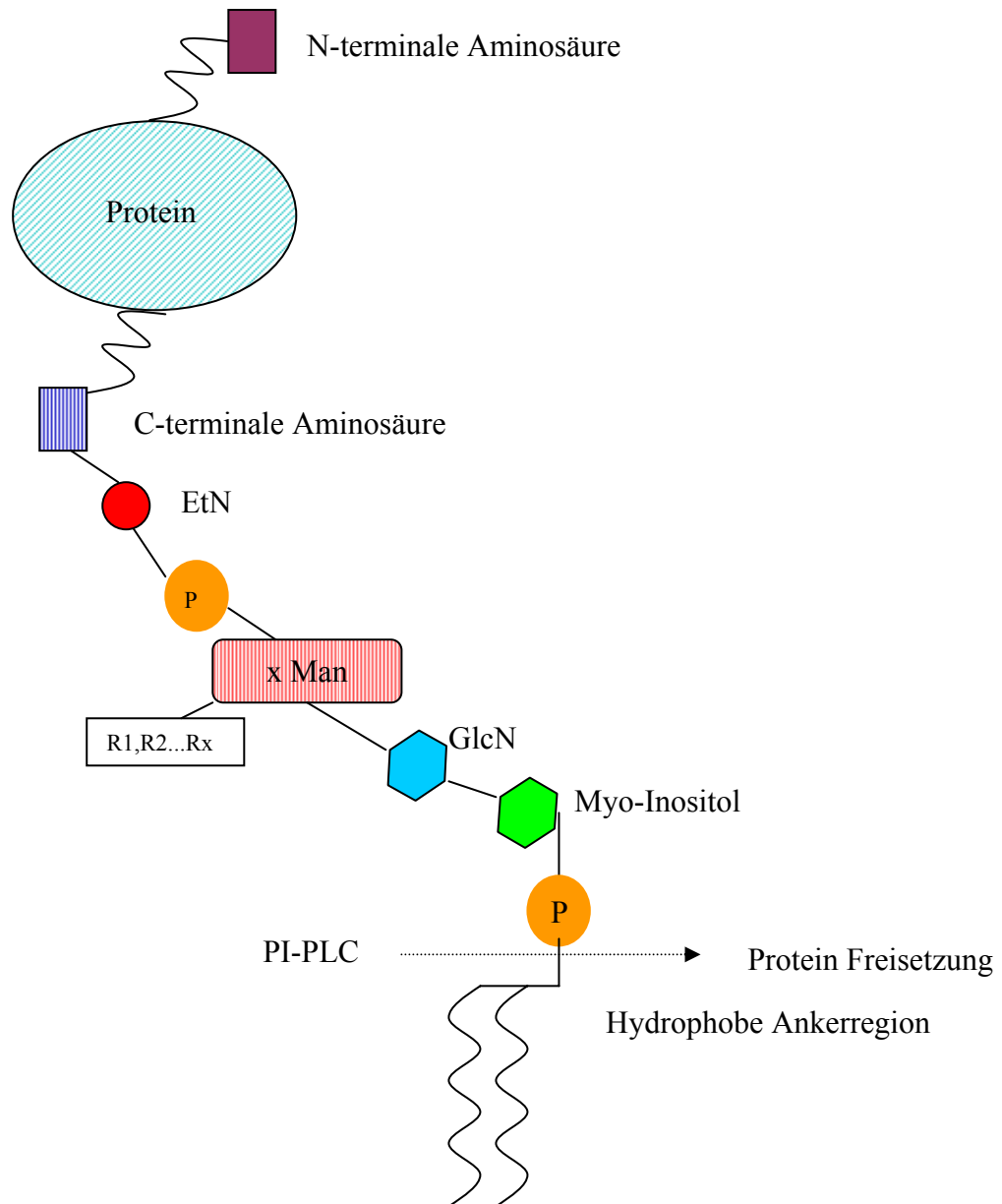


Abbildung 14: Die GPI-Verankerung von Ektoproteinen an der Plasmamembran
(schematische Wiedergabe nach Ikezawa, 1997; 1999)

EtN: Ethanolamin, P: Phosphat, Man: Mannose; GlcN: Glucosamin, *myo*-Ino: *Myo*-Inositol, Hydrophobe Region des Ankers: Monoacylglycerol, Diacylglycerol (Diacyl- oder 1-Alkyl-2-Acylglycerol) und Ceramid

PI-PLC: Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C

1.10.1 Struktur und Vorkommen der GPIs

Die ersten Daten, die auf die Existenz von Protein-Lipid-Ankern hinweisen, stammen aus dem Jahr 1963, in dem es gelang, Alkalische Phosphatase von Säugerzellen durch Behandlung mit bakterieller Phospholipase C zu lösen (Varki *et al.*, *Essentials of Glycobiology*, 1999). Mitte der 70er Jahre konnten Ikezawa und Low die Struktur dieser

Anker spezifizieren, indem sie Moleküle mittels Phosphatidylinositol-Phospholipase C lösen und somit Phosphatidylinositol als Bestandteil der Anker vermuteten.

Später konnte gezeigt werden, dass auch das Oberflächenprotein Variant surface protein (VSG) von *Trypanosoma brucei* durch Behandlung mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) von der Zelloberfläche gelöst werden (Doering *et al.*, 1989) und in eine wasserlösliche Form überführt werden konnte. Daraus schloss man auch hier auf eine Membranverankerung durch Phosphatidylinositol (Low, 1987; Doering & Schekman, 1996; Ferguson, 1999) und entwickelte die erste Struktur eines GPI-Ankers für Proteine (Ferguson & Cross, 1984; Ferguson *et al.*, 1985; Zitzmann *et al.*, 2000).

Der GPI-Anker ist ein komplexes Glykolipid. Der Ethanolaminphosphatteil geht über die erste Aminogruppe mit dem Carboxyl-Terminus des Proteins eine Peptidbindung ein. Eine Phosphodiesterbindung bindet das Äthanolaminphosphat auf der anderen Seite mit einer α -1,2 gebundenen Mannose, einem Teil einer Trimannosylglykanstruktur (Varki *et al.*, Essentials of Glycobiology, 1999). Dieser Teil des Ankers stellt eine evolutionär hochkonservierte Struktur, bestehend aus drei α -gebundenen Mannosen, dar (Mannose- α 1,2-Mannose- α 1,6-Mannose- α 1,4-GlcNH₂), die an ein nicht-acetyliertes Glucosamin gebunden sind. An das Glucosamin schließt sich Phosphatidylinositol an, das den Lipidanteil gebunden trägt (McConville & Ferguson, 1993).

Sowohl der Glykan- als auch der Lipidteil zeigen große Variationen. Die an das Inositolphosphat gebundenen Fettsäuren können gesättigte oder ungesättigte Diacylglycerole, Alkylacylglycerole, Monoalkylglycerole oder Ceramide sein (Varki *et al.*, Essentials of Glycobiology, 1999). Ebenfalls existieren Modifikationen am Inositolring, beispielsweise Acylierungen an Position C2, wodurch die Spaltung durch PI-PLC verhindert wird (McConville & Ferguson, 1993).

Dieses Basismodell kann jedoch von unterschiedlichen Organismen in verschiedenster Art und Weise modifiziert werden, wodurch sich die spezies- und zellspezifischen Unterschiede ergeben (Field & Menon, 1992).

1.10.2 GPIs bei *Plasmodium falciparum*

Für *Plasmodium falciparum* sind sowohl freie GPIs, als auch proteingebundene GPI-Membrananker beschrieben und charakterisiert worden (Gerold *et al.*, 1994, 1996b). Zu den wichtigsten GPI-verankerten Proteinen bei *Plasmodium* zählen das Merozoiten Oberflächen Protein (MSP 1 und MSP 2) (Holder & Freeman, 1981; Holder *et al.*, 1985) und das

Zircumsporozoiten-Protein (circumsporozoite protein), welches die Sporozoiten bedeckt (Nussenzweig & Nussenzweig, 1985). Diese Glykolipide spielen in der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle als Malaria-Toxine. Zudem werden die Proteine MSP-1 und MSP-2 als wichtige Vakzin-Kandidaten betrachtet (Holder & Freeman, 1981)

Bei den asexuellen Stadien der Parasiten sind acht unterschiedliche GPIs analysiert worden, Pfgl α , Pfgl β , Pfgl γ , Pfgl δ , Pfgl ϵ , Pfgl ζ , Pfgl η und Pfgl θ (Gerold *et al.*, 1994).

Folgende Strukturen wurden beschrieben:

Pfgl α : EtN-P- Man α 1,2-Man α 1,2-Man α 1,6Man α 1,4-GlcN-(acyl)PI

Pfgl β : EtN-P-Man α 1,2-Man α 1,6-Man α 1,4-GlcN-(acyl)PI

Pfgl γ : Man α 1,2- Man α 1,2-Man α 1,6-Man α 1,4-GlcN-(acyl)PI

Pfgl δ : Man α 1,2-Man α 1,6-Man α 1,4-GlcN-(acyl)PI

Pfgl ϵ : Man α 1,6- Man α 1,4-GlcN-(acyl)PI

Pfgl ζ : GlcN-PI

Pfgl η : Man α 1,4-GlcN-(acyl)PI

Pfgl θ : GlcN-(acyl)

Pfgl α trägt einen vierten α 1,2 gebundenen Mannoserest, der den evolutionär konservierten Trimannosylrest modifiziert (Gerold *et al.*, 1994).

Pfgl β dagegen zeigt die ursprüngliche, konservierte Struktur, bestehend aus drei Mannosen und Glucosamin. Alle weiteren GPIs werden als Biosyntheseintermediate der potentiellen Membranankervorläufer interpretiert (s. Abb. 15)

Außer Pfgl ζ zeigen alle GPIs, die bei *Plasmodium falciparum* charakterisiert wurden, eine zusätzliche Ester-gebundene Fettsäure am Inositolring und somit eine hydrophobe Modifikation (Schmidt, *et al.*, 1998; Englund *et al.*, 1993).

Es wurde vermutet, dass besonders diese hydrophoben Elemente für die Pathologie der schweren Malaria verantwortlich sein könnten (Gerold *et al.*, 1994). Dagegen zeigen auch GPIs anderer Protozoen vergleichbare Phänomene, tragen jedoch keine hydrophobe Modifikation am Inositolring.

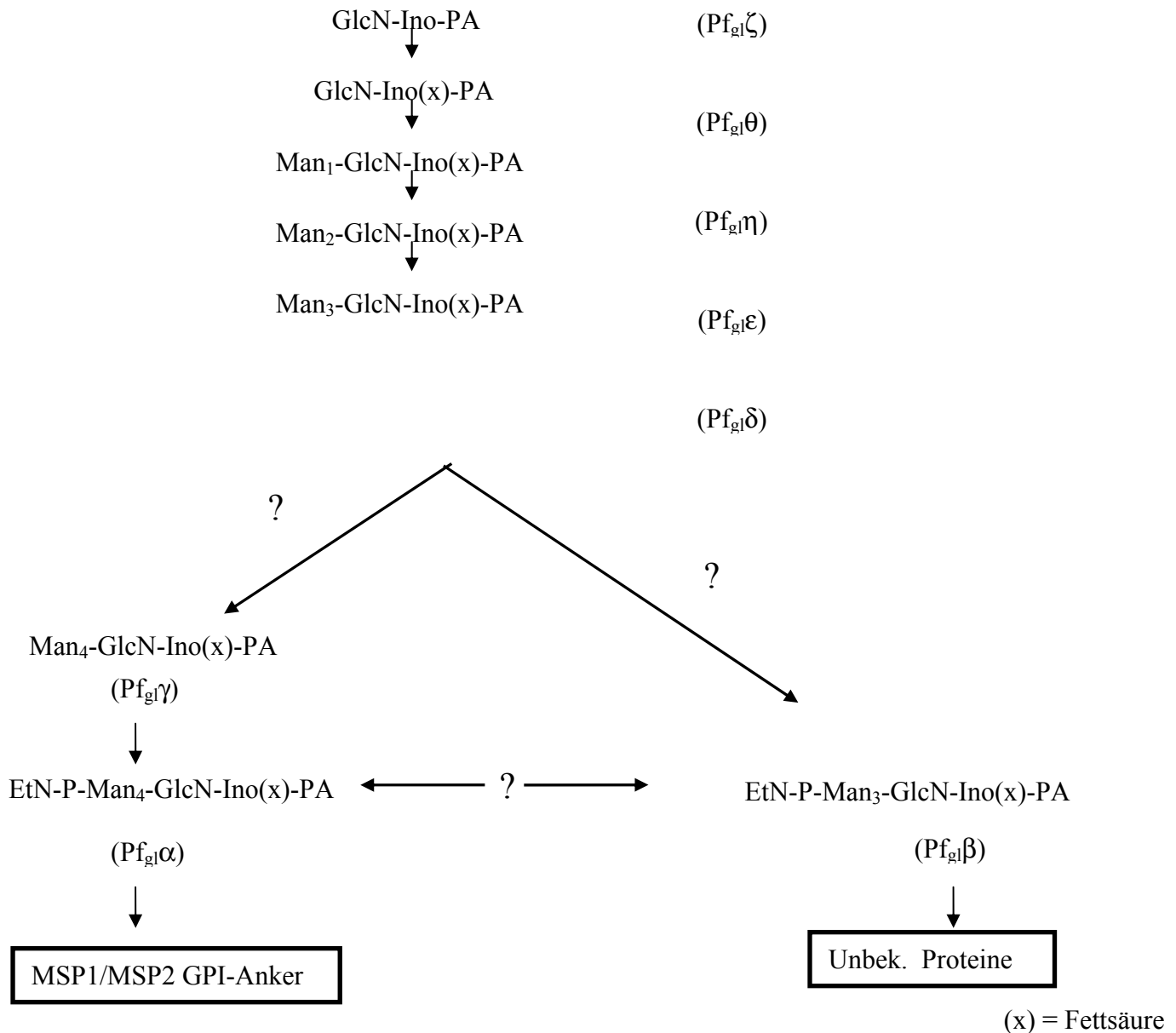


Abb. 15: Hypothetischer Biosyntheseweg der GPIs von *P. falciparum* (Gerold, 1995)

Darstellung des möglichen Biosyntheseweges der *P. falciparum*-GPIs.

Die Biosynthese der GPIs in asexuellen intraerythrozytären Stadien der Plasmodien führt zu zwei möglichen GPI-Anker-Vorstufen (PfgI α und PfgI β): Ethanolaminphosphat-6Manα1,2-Manα1,6-Manα1,4-GlcN-PI, entspricht PfgI β und Ethanolaminphosphat-6(α1,2-Man)Manα1,2-Manα1,6-Manα1,4-GlcN-PI, entspricht PfgI α. Die Glykanstruktur variiert somit lediglich in der Anzahl der Mannosereste (Gerold *et al.*, 1994). Es wurde jedoch bisher lediglich PfgI α als Anker für MSP-1 und MSP-2 nachgewiesen. (Gerold *et al.*, 1996b). Beide Proteine werden nur von reifen Parasiten synthetisiert (Schmidt *et al.*, 1998).

Dagegen werden Proteine, die an Pfgl β oder an beide Anker gebunden sind, vor allem im Trophoziten-Stadium gebildet. Proteine, die an Pfgl β verankert sind, wurden, obwohl vorhanden, bisher nicht beschrieben.

Beide Anker werden folglich in unterschiedlichen Stadien der asexuellen, intraerythrozytären Entwicklung synthetisiert (Schmidt *et al.*, 1998). Die GPI-Biosynthese der Plasmodien steigt in der Entwicklung von Ringstadien bis zum reifen Schizontenstadium im Gegensatz zur Proteinbiosynthese kontinuierlich an (Holder & Freeman, 1982).

Die Struktur der als Toxine fungierenden GPIs konnte näher beschrieben werden: In *Plasmodium* fehlt eine Modifikation der Mannose 2 und 3, während in Säugerzellen und Hefe EtNP Seitenketten beschrieben sind (Gerold *et al.*, 1996b).

Der bereits erwähnte vierte Mannoserest kommt in den meisten GPI-Ankern von *Plasmodium* vor, dagegen nur sehr selten in Säugerzellen.

Neben den Strukturen der GPIs in *Plasmodium falciparum* und der Erkenntnis der Wichtigkeit dieser Glykolipide für die Pathogenese der Malaria, verstärkten sich auch die Bestrebungen, die Gene der GPI-Biosynthese dieses Parasiten zu entschlüsseln.

Im ersten Schritt der Synthese, der den Transfer von GlcNAc von UDP-GlcNAc auf PI umfasst, spielen in Säugerzellen mindestens 6 Proteine eine Rolle (Hong *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 1996). PIG-A könnte, entsprechend dem Homologen in Hefe, die Aufgabe der Bindung des Substrates UDP-GlcNAc zufallen.

Das GPI1 Gen in *Plasmodium falciparum* hat die Fähigkeit gezeigt, einen GPI1 defekten Hefestamm zu komplementieren (Shams-Eldin *et al.*, 2002).

Mit Ausnahme eines Fragmentes von PIG-C, konnten keine weiteren Homologen zu Genen gefunden werden, die bei Säugern im ersten Syntheseschritt eine Rolle spielen (PIG-H, PIG-P, DPM2), (Delorenzi *et al.*, 2002).

Der folgende Schritt der Deacetylierung zu GlcN-PI findet wie bei Säugern an der zytoplasmatischen Seite des ER statt. Das katalysierende Enzym, N-Acetylglucosaminylphosphatidylinositolde-N-Acetylase wird bei Säugern von dem Gen PIG-L kodiert. Die erste homologe Sequenz zu humanem PIG-L konnte in *Plasmodium berghei* identifiziert werden (Delorenzi *et al.*, 2002).

Die drei Mannosereste im Glykankern der GPIs sind über α -1,4- α -1,6- α -1,2-Brücken verbunden. Die vierte Mannose wird in α -1,2-Bindung dem dritten Mannoserest angeschlossen. Mannose-1 und Mannose-3 Transferasen werden in *Plasmodium* von PIG-B und PIG-M kodiert (Delorenzi *et al.*, 2002). Ein PIG-B Gen war für den menschlichen Organismus als kodierendes Gen für die Mannose-3-Transferase bereits einige Zeit bekannt

(Takahashi *et al.*, 1996). Für die Mannose-1- und Mannose-4 Transferasen konnten PIG-M und Smp3 (in Hefe) charakterisiert werden (Grimme *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2001).

Während PIG-M und PIG-B von *Plasmodium* den entsprechenden humanen Genen stark ähneln, lässt sich für Smp3 kein homologes erkennen, was unter anderem auch auf noch bestehenden Lücken in der *P. falciparum* Genom Sequenz zurückzuführen sein kann (Delorenzi *et al.*, 2002).

Der folgende Schritt der Biosynthese, die Addition von EtNP-Gruppen fordert im Säugerorganismus drei Enzyme: PIG-N/MCD4 (EtNP-Addition an Man1), GPI7 (Man2) und PIG-O/GPI13 (Man3) (Benachour *et al.*, 1999; Flury *et al.*, 2000; Gaynor *et al.*, 1999). In *Plasmodium falciparum* ist lediglich ein terminales Äthanolaminphosphat, welches als Brücke zu dem folgenden Protein fungiert, präsent. Entsprechend den Erwartungen, konnte nur ein Gen identifiziert werden, welches zur PIG-O Subfamilie gehört (Delorenzi *et al.*, 2002).

Die Transamidation, die kovalente Bindung an das Protein, fordert mindestens zwei Proteine, GAA-1 und GPI8 (Benghezal *et al.*, 1996; Hamburger *et al.*, 1995), welche in Säugerzellen einen Komplex bilden (Ohishi *et al.*, 1996). Für beide Proteine konnte ein Homologes in *Plasmodium falciparum* identifiziert werden. GPI8 stellt wahrscheinlich die katalytische Einheit dar, da es mit Substratproteinen assoziiert (Spurway *et al.*, 2001). Das Gen GAA-1 in *Plasmodium falciparum* zeigt drei Introns und kodiert für 700 Aminosäuren. Das GAA-1 Protein wird vermutlich zur korrekten Lokalisation von GPI8 benötigt und ist sehr hydrophob (Delorenzi *et al.*, 2002).

Zwei weitere Komponenten des Transamidasekomplexes konnten im Menschen und in Hefe identifiziert werden: PIG-S/GPI17 und PIG-T/GPI16 (Ohishi *et al.*, 1996).

Die Sequenz von PIG-T ist hoch konserviert. Eine ähnliche Region konnte zwar in *Plasmodium falciparum*, *P. knowlesi* und *P. yoelii* identifiziert werden, die untereinander hochkonserviert sind, die Ähnlichkeit zu den anderen Sequenzen ist jedoch zu gering, um sie sicher als PIG-T ausmachen zu können (Delorenzi *et al.*, 2002).

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist die Charakterisierung von DPM1. DPM1 stellt die Dol-P-Man-Synthase dar, die die Produktion von Dol-P-Man katalysiert (Orlean *et al.*, 1988). Das Protein wurde bereits für viele Spezies gut charakterisiert und auch eine Sequenz mit großer Ähnlichkeit in *Plasmodium falciparum* identifiziert. Das Gen scheint keine Introns zu besitzen, zeigt jedoch zwei AUG Codons (Delorenzi *et al.*, 2002).

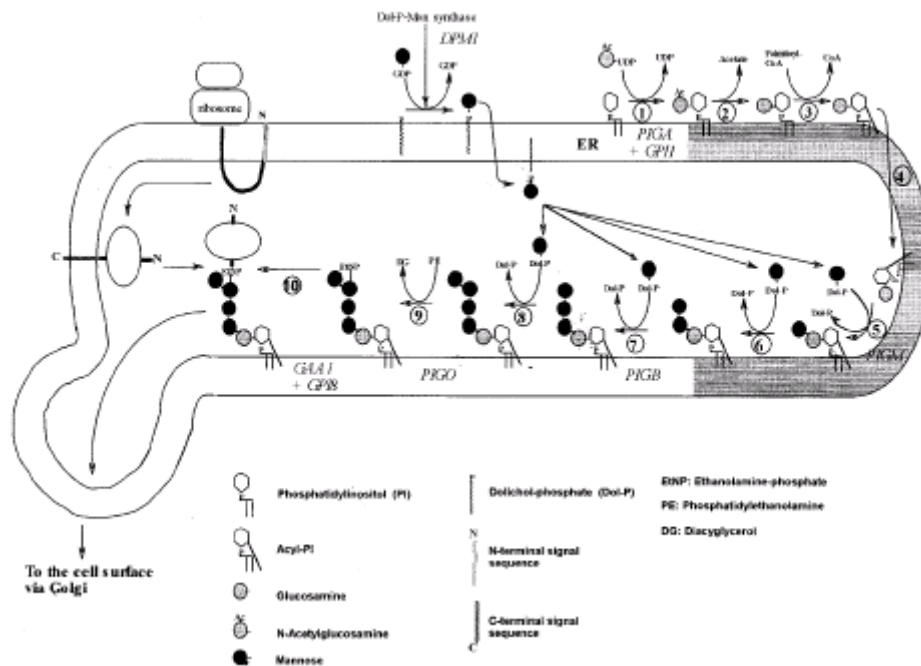


Abbildung 16: Möglicher GPI-Biosyntheseweg im ER von *Plasmodium falciparum* (Delorenzi *et al.*, 2002; mit freundlicher Genehmigung von Kinoshita und Inoue, 2000) In Schritt 1 wird N-Acetylglucosamin auf Phosphatidylinositol übertragen. Die folgenden Syntheseschritte beinhalten die Deacetylierung (2), Übertragung eines Lipidrestes auf den Inositolring (3) und die Addition von Mannose (5-8). Es folgt die Anheftung eines Ethanolamins an die dritte Mannose, um die Brückenfunktion zwischen GPI und Protein wahrzunehmen (9). Schritt 10 zeigt die Transamidation, die kovalente Bindung des GPI-Ankers an das Protein. Schließlich wird das Endprodukt über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

1.10.3 Biosynthese der GPIs

Der erste Schritt in der Biosynthese der GPIs besteht in der Übertragung von N-Acetylglucosamin von UDP-N-Acetylglucosamin als Donor auf Inositolphosphat, wodurch GlcNAc-PI entsteht (Masterson *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990; Stevens & Raetz, 1991; Kinoshita *et al.*, 1997). Dieser Schritt findet an der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums statt (Field & Menon, 1992). An dieser Reaktion sind mindestens sechs Proteine beteiligt, die einen Enzymkomplex bilden (Watanabe *et al.*, 2000; Shams-Eldin *et al.*, 2002).

Die zweite Reaktion besteht in einer de-N-Acetylierung (Doering *et al.*, 1989; Kinoshita & Inoue, 2000), wodurch GlcN-PI entsteht. Dieser Schritt wird von dem Enzym GlcNAc-PI de-N-Acetylase katalysiert. Ein erster Mannoserest wird daraufhin von Dolichol-Phosphat-

Mannose (Dol-P-Man) auf GlcN an Position 4 übertragen (Kinoshita & Inoue, 2000), zwei weitere Mannosereste des Donors Dol-P-Man folgen (Menon *et al.*, 1990). Schließlich wird das Ethanolaminphosphat, das die Bindungsstelle zwischen Protein und GPI darstellt, von Phosphatidylethanolamin auf die dritte Mannose an Position 6 übertragen (Menon *et al.*, 1993; Kinoshita & Inoue, 2000).

Da die Biosynthese des GlcN-PI an der zytoplasmatischen Seite des ER stattfindet (Vidugiriene & Menon, 1993; 1994), die Übertragung auf ein Protein jedoch im Lumen (McConville & Menon, 2000; Varki *et al.*, Essentials of Glycobiology, 1999; Murakami *et al.* 2003), muss ein Transport des GPI-Anker-Vorläufers an die luminaire Seite erfolgen. Der genaue Übertragungsweg ist bis heute ungeklärt, man vermutet das Vorliegen eines Transportproteins, einer „Flipase“, die den Transport garantiert (Menon & Vidugiriene, 1994; Kinoshita & Inoue, 2000; Vishwakarma & Menon, 2005). Die Übertragung des neu synthetisierten Proteins auf den GPI-Vorläufer im Lumen des ER findet durch eine Transamidase-ähnliche Reaktion statt (Field & Menon, 1992). Es werden solche Proteine an GPI gebunden, die an ihrem Carboxylterminus eine GPI-Bindungsstelle tragen. Diese ca. 20 Aminosäuren lange, hydrophobe Sequenz wird bei Bindung der beiden Partner abgespalten (Bangs *et al.*, 1985; Ferguson, 1999; Kinoshita & Inoue, 2000) und der neue Carboxylterminus bindet an Äthanolamin. Nach der Bindung wird die Acylgruppe des Inositols in den meisten Säugerzellen eliminiert (Chen *et al.*, 1998).

Dieser Syntheseweg variiert unter unterschiedlichen Organismen sehr. Dadurch wird die Hoffnung geweckt, bestimmte, erregerspezifische Syntheseprodukte als Ziel einer möglichen Chemotherapie nutzen zu können (Kinoshita & Inoue, 2000).

Ein Beispiel für die unterschiedliche Synthese stellt das Vorhandensein von vier Mannoseresten in *S. cerevisiae*, im Gegensatz zu drei Mannoseresten in Säugerzellen, dar (Kinoshita & Inoue, 2000). Darüber hinaus geht in Säugerzellen der Übertragung der Mannosereste zwei und drei die transiente Anheftung von Äthanolaminphosphat an den ersten Mannoserest voraus (Hong *et al.*, 1999).

Ein weiteres Beispiel ist das unterschiedliche Ausgangsprodukt vor der Mannoseanheftung in *T. brucei* und Säugerzellen. Während dieses Protozoon keine Acylierung vor Übertragung der Mannose benötigt, stellt dies einen essentiellen Schritt bei den Mammalia dar.

Bei *Plasmodium falciparum* dagegen wird eine Fettsäure an den Inositolrest gebunden, bevor die Übertragung der Mannosereste auf das deacylierte Glucosamin erfolgen kann (Gerold *et al.*, 1994). Bei *T. brucei* finden Acylierung und Deacylierung des Inositols parallel zu den Mannosylierungsschritten, frühestens nach der Übertragung des ersten Mannoserestes, statt

(Smith *et al.*, 1999). Diese hydrophobe Modifikation verhindert ebenfalls eine Spaltung durch das Enzym PI-PLC.

Um weitere Untersuchungen mit GPIs durchführen zu können, versuchen derzeit F. Seeberger und B. Fraser-Reid, GPIs auf chemischem Wege zu synthetisieren. Diese Vollsynthese ist bereits für einen GPI-Anker von *T. cruzi* gelungen (Ali *et al.*, 2005). Falls auch chemisch synthetisierte GPIs in der Lage wären, die Signalkaskade mit Induktion von TNF etc. zu bewerkstelligen, ließe sich somit belegen, dass GPI-Moleküle allein ohne weitere Zellkomponenten diese Kaskade stimulieren können (Lu *et al.*, 2004).

1.10.4 Funktion und Bedeutung der GPIs

Die schweren Auswirkungen der Malaria lassen sich auf eine übersteigerte systemische oder organ-spezifische inflammatorische Kaskade zurückführen, die von einem Toxin der Parasiten hervorgerufen wird. Dieses Toxin induziert die Expression von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interleukin 1 (IL-1) in Makrophagen und kann das Gefäßendothel direkt aktivieren (Schofield & Hackett, 1993). TNF α und IL-1 spielen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen, der Regulation der Körpertemperatur und können Fieber induzieren. Sowohl das Toxin des Parasiten als auch die Zytokine sind in der Lage, direkt die Expression anderer proinflammatorischer Mediatoren zu aktivieren. Dazu zählt auch die NO-Synthase in Makrophagen und Endothelzellen (Tachado *et al.*, 1996).

Studien belegen, dass parasitäres GPI als das dominante Malariatoxin fungiert (Schofield & Hackett, 1993; Schofield & Tachado, 1996; Tachado *et al.*, 1996; Tachado *et al.*, 1997; Tachado & Schofield, 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass GPI-Anker von Protozoen zwei Abschnitte (den Glykan-Anker und Inositolphospholipid) tragen, die anschließend unterschiedliche Komponenten der Entzündungskaskade aktivieren (Tachado *et al.*, 1996; Schofield *et al.*, 1996; Magez *et al.*, 1998; Tachado *et al.*, 1997). Untersuchungen an Makrophagen belegen, dass die Zuckerkomponenten verschiedener parasitärer GPIs jedoch ausreichen, um Protein-Tyrosin-Kinasen zu aktivieren (Tachado *et al.*, 1997). Eine weitere Studie zeigte, dass ausschließlich die GPI-verankerten Antigene nach Bindung mit Antikörpern eine Signaltransduktion auslösen können (Schofield *et al.*, 1994; Tachado *et al.*, 1999).

GPIs von Plasmodien können Makrophagen durch Phosphorylierung zur Aktivierung einer Tyrosinkinase und einer calciumunabhängigen Proteinkinase C stimulieren und auf diese Weise zur Produktion von TNF α , IL-1 und NO führen (Tachado *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2000). Auch GPIs eines anderen Apicomplexa-Parasiten, *Toxoplasma gondii*, stimulieren eine ähnliche Kaskade (Debierre-Grockiego *et al.*, 2003). Besonders GPI-verankerte Proteine in lipidreichen Mikrodomänen der Zellmembran, sogenannte „rafts“, haben die Fähigkeit, diese Signaltransduktionsprozesse von Proteinkinasen der src-Familie zu aktivieren (Kasahara & Sanai, 2000).

Der am Ende der Kaskade wichtige Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine Rolle für die Induktion der TNF α -Synthese (Liu *et al.*, 2000), da das Gen, welches für TNF α kodiert, einen Promoter mit NF- κ B-Bindungsstelle trägt.

Neben TNF und Adhäsinen stehen auch IL-1 und die NO-Synthase unter der regulatorischen Kontrolle der Transkriptionsfaktor-Familie NF- κ B/c-rel (Baeuerle, 1991; Grilli *et al.*, 1993). GPI-Toxin von Plasmodien aktiviert Endothelzellen durch Tyrosinkinase Signal-Transduktion, führt somit zur NF- κ B/c-rel Aktivierung und zur Expression von Adhäsinen wie ICAM-1, VCAM und E-Selectin (Vijaykumar *et al.*, 2001). Diese Kaskade spielt neben der gesteigerten NO-Produktion eine wichtige Rolle in der Ätiologie der zerebralen Malaria und wird durch LPS, IL-1 und TNF α stimuliert (Schofield *et al.*, 1996). Die strukturverwandten Glykolipide Dipalmitoyl-PI und iM4 GPII von *Leishmania* zeigen keine Induktion der ICAM-Expression. Dies könnte zum einen durch die unterschiedliche Position eines Mannoserestes in einer Seitenkette des Glykankerns oder auch durch das Vorhandensein eines Alkylacylglycerolrestes erklärt werden (Schofield *et al.*, 1996).

Als GPI-erkennende Rezeptoren auf den Makrophagen haben sich vor kurzem Toll-like-Rezeptoren herausgestellt. Toll-like Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung von mikrobiologischen Komponenten wie bakteriellen Glykolipiden (LPS von Gram negativen Bakterien) (Hoshino *et al.*, 1999), Peptidoglykan von Gram positiven Bakterien (Lien *et al.*, 1999) und Lipopeptiden von verschiedenen Bakterienspezies, darunter *Mycobacterium tuberculosis* (Brightbill *et al.*, 1999), *Mycoplasma fermentas*, *Treponema pallidum* und *Borrelia burgdorferi* (Lien *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2000).

Durch die Erkennung von Pathogenen können TLR die Produktion von Zytokinen wie IL-12 und IL-18 induzieren (Abbas *et al.*, 1996) und auf diese Weise naive T-Zellen zur Differenzierung zu T-Helferzellen (T_H1) stimulieren.

Es konnte gezeigt werden, dass TLR der Klasse 2 vor allem GPI-Anker von *Trypanosoma cruzi* und Glykolipide von Treponemen erkennen und für die Aktivierung zahlreicher

Makrophagen-Funktionen wie die Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 verantwortlich sind (Campos *et al.*, 2001). Auch GPI von *P. falciparum* wird zum größten Teil von TLR der Klasse 2 erkannt, zu einem kleineren Anteil auch von TLR der Klasse 4 (Krishnegowda *et al.*, 2005). Die Potenz der Aktivierung von Makrophagen und die Menge an inflammatorischen Zytokinen sind bei GPIs von *T. cruzi* allerdings ca. 10 mal stärker als bei GPIs von *P. falciparum* (Almeida & Gazzinelli, 2001; Gowda, 2002).

Neben GPIs kann auch (CpG) DNA, sowohl bakteriellen Ursprungs, als auch von Protozoen (*T. cruzi*, *T. brucei*, *Babesia bovis*) TLR aktivieren und über diesen Weg Makrophagen stimulieren (Gazzinelli *et al.*, 2004), so dass die Rolle der GPIs als alleinige Signalinduktoren neu überdacht werden muss.

Neben diesen wichtigen Funktionen in der Signaltransduktion und Makrophagenstimulierung sind GPIs bereits viel früher für ihre Fähigkeit, Membranproteine stabil zu verankern bekannt gewesen (McConville & Ferguson, 1993).

Es sind bereits viele GPI-verankerte Proteine in zahlreichen Organismen beschrieben (s. Kapitel Glykosylphosphatidylinositole). Ein Beispiel mit medizinischer Relevanz ist das „variable Oberflächenantigen“ (VSG) von *Trypanosoma brucei*. Die GPI-Verankerung bietet dem Parasiten den Vorteil, sein Oberflächenprotein sehr dicht packen zu können (Ferguson, 1999) und somit das Eindringen von Makromolekülen des Komplementsystems in die Zellmembran zu verhindern (Ferguson, 2000). Es stellt somit einen Schutzmechanismus des Erregers dar, der noch durch die „Schutzwallbildung“ ergänzt wird, die durch die eigentliche Struktur der GPIs entsteht (Homans *et al.*, 1989).

Darüber hinaus scheint das Vorhandensein einer GPI-Sequenz für den Protein-Transport von Bedeutung. Es zeigte sich, dass GPI-verankerte Proteine zur apikalen Zelloberfläche in polarisierten Epithelzellen (Madin Darby Canine Cells) transportiert werden (Lisanti *et al.*, 1990). Des Weiteren weisen GPIs insulinmimetische Wirkung durch Regulation des Glucose-Haushaltes in Adipozyten (Schofield & Hackett, 1993) und Hepatozyten (Misek & Saltiel, 1992) (beide Zellarten von Ratten) durch Glucoseoxidation und Lipogenese auf, so dass auf diese Weise eine häufig vorliegende Hypoglykämie bei schwerer Malaria erklärt werden kann. Auch im Tierversuch konnten Hypoglykämien nach Applikation von GPIs aus *Plasmodium falciparum* registriert werden (Schofield & Hackett, 1993; Schofield *et al.*, 1993).

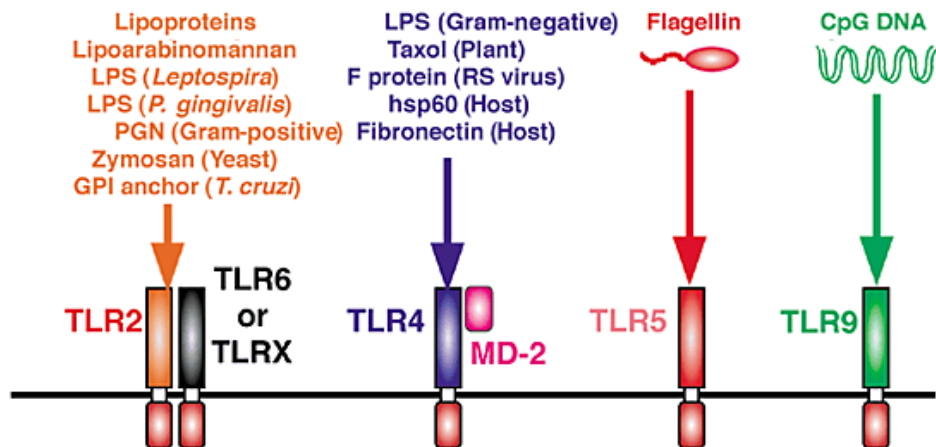


Abbildung 17: TLRs und ihre Liganden (Akira *et al.*, 2001).

Bestimmte Pathogen-assoziierte Produkte und Moleküle des Wirtes nutzen die TLR-Familie zur Signaltransduktion. TLR2 erkennt eine Vielfalt an mikrobiellen Produkten.

TLR4 ist für die Signalweitergabe von LPS aus Gram-negativen Bakterien mit Ausnahme von *Leptospira* und *P. gingivalis*, welche von TLR2 erkannt werden, essentiell.

TLR4 erkennt nicht nur virale oder pflanzliche, sondern auch endogene Wirtsprodukte wie hsp60 und Fibronectinfragmente. Verglichen mit TLR2 und TLR4 ist die Signalerkennung von TLR 5 und TLR9 sehr begrenzt, aber essentiell für Flagellin und CpG DNA.

1.11 Dol-P-Man

Dolichol-Phosphat-Mannose fungiert als Donor der Mannosen während der GPI-Biosynthese, aber auch bei der N-Glykosylierung und O-Mannosylierung von Proteinen (Colussi *et al.*, 1997).

Dol-P-Man wird durch einen Transfer von GDP-Man auf das Polyisoprenoid Dol-P an der zytoplasmatischen Seite des ER (Clarke *et al.*, 1989; Abeijon & Hirschberg, 1992) gebildet (Kornfeld & Kornfeld, 1985; Tanner & Lehle, 1987; Herscovics & Orlean, 1993). Dieser Syntheseschritt wird durch die Dol-P-Man-Synthase katalysiert, deren Aktivität lediglich im ER nachgewiesen werden konnte (Czichi & Lennarz, 1977).

Die Dol-P-Man erfordernden Syntheseschritte der Glykosylierung scheinen jedoch an der lumenalen Seite des ER stattzufinden (Abeijon & Hirschberg, 1992). Folglich wird Dol-P-Man über einen noch unidentifizierten Mechanismus an die lumenale Seite des ER gebracht.

Man vermutet das Vorhandensein einer Flipase, die für diesen Schritt verantwortlich ist (Abeijon & Hirschberg, 1992; Rush & Waechter, 1995; Vishwakarma & Menon, 2005).

Die bekannten Dol-P-Man Synthase Sequenzen lassen sich in zwei Klassen unterteilen.

DPM1-Proteine der ersten Klasse weisen eine COOH-hydrophobe Domäne auf und liegen in Organismen wie *S. cerevisiae* (Orlean *et al.*, 1988), *Ustilago maydis* (Zimmerman *et al.*, 1996), *Leishmania mexicana* (Ilgoutz *et al.*, 1999) und *Trypanosoma brucei* (Mazhari-Tabrizi *et al.*, 1996) vor. Sie fungieren eigenständig als Dol-P-Man-Synthase, bestehen lediglich aus einer Einheit, DPM1 (Orlean *et al.*, 1988; Mazhari-Tabrizi *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1996) und können in *E. coli* als funktionierende Enzyme exprimiert werden.

Temperatursensitive *dpm1*-Mangelmutanten werden in den Synthesewegen der N-Glykosylierung, O-Mannosylierung und der Synthese der GPI-Anker blockiert (Orlean *et al.*, 1990). Die humane DPM1 Komponente dagegen kann nicht in *E. coli* exprimiert werden (Maeda *et al.*, 1998).

Die zweite Gruppe wird durch das Fehlen einer hydrophoben Domäne charakterisiert und enthält die Dol-P-Man Synthase des Menschen, jene von *S. pombe* und *Caenorhabditis briggsiae* (Colussi *et al.*, 1997). Innerhalb einer Gruppe zeigt sich eine Aminosäureidentität von 60-70%, während beide Gruppen im Vergleich miteinander lediglich eine Ähnlichkeit von 30-40% aufweisen (Maeda *et al.*, 1998).

Darüber hinaus wurden mehrere Untereinheiten der humanen Dol-P-Man-Synthase identifiziert. Neben der bereits bekannten Dol-P-Man-Synthase 1, der man jegliche Aktivität zusprach, konnte eine regulatorische Untereinheit DPM2 charakterisiert werden. Sie ist ein hydrophobes, aus 84 Aminosäuren bestehendes Protein (Maeda *et al.*, 1998). Das Dpm2 Protein enthält zwei Transmembrandomänen und wird ebenfalls im ER gebildet. Die Funktion des Dpm2-Proteins wurde in der korrekten, festen Lokalisierung und der Garantierung einer gewissen Stabilität der katalytischen DPM1 Untereinheit gesehen, der eine Transmembrandomäne fehlt (Tomita *et al.*, 1998). DPM2 stärkt die Bindung des Substrates Dol-P an das Enzym und bindet selbst an Dolichol-Phosphat (Maeda *et al.*, 1998). Die DPM-Synthase-Aktivität erweist sich in Anwesenheit von DPM2 ebenfalls ca. 10 Mal höher, ist jedoch für die Enzymaktivität nicht essentiell (Maeda *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2000). Heute wird vermutet, dass die Funktion von DPM2 über die Stabilisierung des DPM-Komplexes hinausgeht und zusätzlich in der Bereitstellung von Lipidsubstraten liegen könnte (Ashida *et al.*, 2006).

2000 postulierten Maeda *et al.* eine dritte Untereinheit des humanen DPM-Synthase-Komplexes, DPM3. Dieses Protein besteht aus 92 Aminosäuren und ist mit DPM1 über die hydrophile C-terminale Domäne, mit DPM2 über den hydrophoben N-Terminus verbunden (Maeda *et al.*, 2000). DPM3 trägt zwei Transmembrandomänen und stellte sich, unabhängig von DPM2, als ER-Protein dar, obwohl das Protein keine offensichtliche ER-

Lokalisationssequenz trägt (Maeda *et al.*, 2000). Trotz der Verankerung von DPM1 über die Transmembrandomänen von DPM3 scheinen diese nicht essentiell für die Funktion des DPM-Synthasekomplexes zu sein (Ashida *et al.*, 2006).

Die Funktion von DPM3 wird in der Stabilisierung von DPM1 gesehen, während DPM3 selbst von DPM2 stabilisiert wird (Maeda *et al.*, 2000). 2006 konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von DPM3 für die Aktivität des DPM-Synthasekomplexes essentiell ist. Fehlt DPM3 in Zellen, wird DPM1 von dem Proteasom degradiert (Ashida *et al.*, 2006).

Neben der Entdeckung eines humanen DPM-Synthasekomplexes, bestehend aus DPM1, DPM2 und DPM3, konnte auch für *S. pombe* ein Multienzymkomplex postuliert werden. Die Untereinheit SpDPM3 erwies sich dabei als kompatibel zum humanen System, während SpDPM2 keine Kompatibilität mit dem menschlichen Multienzymkomplex zeigt (Maeda *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu Mensch und *S. pombe* weist *S. cerevisiae* lediglich ein Enzym, aus einer Komponente bestehend, auf. Es ist bis heute nicht geklärt, warum zwei Hefen unterschiedliche Arten eines solch bedeutenden Enzyms besitzen.

Auf Grund der essentiellen Unterschiede zwischen beiden Gruppen und der Tatsache, dass einige Protozoen im Gegensatz zur humanen DPM-Synthase der Klasse eins angehören und somit essentielle Proteine darstellen, die selektiv inhibiert werden können, ist dieses Enzym als möglicher Ansatzpunkt einer Chemotherapie ins Gespräch gekommen (Colussi *et al.*, 1997).

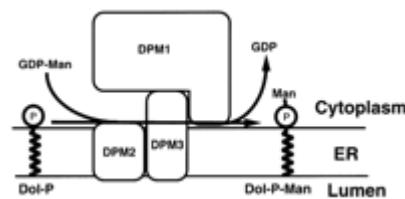


Abbildung 18: Schematische Darstellung der humanen DPM-Synthase (Maeda *et al.*, 2000):

Die hydrophobe DPM2 Untereinheit assoziiert mit dem N-Terminus der hydrophoben Einheit von DPM3. Die hydrophile Einheit von DPM3 assoziiert mit der katalytischen Einheit DPM1, welche ebenfalls hydrophil ist.

1.12 Angeborene Defekte der Glykosylierung (Congenital disorders of Glycosylation, CDG)

Die "Angeborenen Defekte der Glykosylierung" (CDGs) stellen eine Gruppe von schnell wachsenden multisystemischen Erberkrankungen dar, die durch Mutationen in Genen

verursacht werden, die für die Biosynthese von Glykoproteinen benötigt werden (Thiel, 2003).

Typ I dieser Erkrankungen beinhaltet solche, die die Biosynthese von Dolichol -verbundenen Oligosacchariden im Zytosol oder dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) beeinflussen, genauso wie Defekte, die den Transfer von Oligosacchariden auf Glykoproteine behindern (Schwarz *et al.*, 2004). Typ II der CDGs umfasst alle Defekte, die die Elongation von N-verbundenen Oligosacchariden im ER oder Golgi betreffen (Schwarz *et al.*, 2004).

Es sind bereits die Typen I a-g und II a bekannt. Es ist zu erwarten, dass noch weitere hinzukommen (Arbeitsgemeinschaft der medizinisch wissenschaftlichen Fachgesellschaften, 2000). Die Einordnung in eine Übergruppe erfolgt mit I und II, die kleinen Buchstaben bezeichnen jeweils die entsprechenden Enzymdefekte. Je nach Enzymdefekt können sich typische Stigmata der Erkrankung zeigen. Da es Multisystemerkrankungen sind, weisen sie jedoch ein unterschiedliches Symptomspektrum auf.

Die meisten der Erkrankungen äußern sich in schwerer psychomotorischer und mentaler Retardierung, peripherer Neuropathie, Koagulopathie und Retinitis pigmentosa (Freeze, 1998; Krasnewich & Gahl, 1997; Jaeken *et al.*, 1991).

Viele Subtypen der Erkrankung wurden bereits beschrieben, basierend auf der isoelektrischen Fokussierung des Transferrins und der klinischen Symptome. Transferrin wird als Markermolekül zur Diagnostik genutzt, da es ein wichtiges Serumprotein darstellt und als solches leicht zu detektieren ist (Kim *et al.*, 2000). Während bei Gesunden lediglich Tetrasialotransferrin aufzufinden ist, weisen Proben von erkrankten Patienten zusätzlich Di- und Asialotransferrin auf. Ebenso sind bei den meisten CDG-Typen das Antithrombin III, Faktor IX und XI in ihrer Aktivität deutlich erniedrigt (AWMF, 2000).

Eine Erkrankung vom Typ der CDGs kann vermutet werden, wenn der Patient beispielsweise an Hypotonien, ungewöhnlicher Fettverteilung, Optikusatrophy, Hypoglykämie, mentaler und psychomotorischer Retardierung oder Enteropathie mit Proteinverlust leidet (Greenwood Genetic Center, 2004).

Die mit 70% häufigste CDG, die CDG I a, die auf dem Enzymdefekt der Phosphomannomutase 2 beruht, zeichnet sich bereits im Säuglingsalter durch eine typische Symptomtrias aus: Strabismus internus, inverse Mamillen und supragluteale Fettpolster (AWMF 2000). Der Strabismus bleibt häufig konstant, die unregelmäßigen Fettdepots und die inversen Mamillen verlieren sich meist im Laufe des Alters. Die Kinder sind häufig mittelgradig statomotorisch retardiert und erlernen das Laufen nicht. Weitere charakteristische Symptome sind Perikardergüsse, Hepatopathie, Hypogonadismus, Retinitis pigmentosa,

Koma und Krampfanfälle. Oft zeigt sich in der Bildgebung eine ausgeprägte Kleinhirnhypoplasie (AWMF 2000).

Eine für diese Arbeit besonders interessante Klasse der CDGs stellt der Typ I e dar. Hier zeigt sich ein Defekt der Dol-P-Man-Synthase. Mutationen in der katalytischen Untereinheit DPM1 verursachen wahrscheinlich eine gestörte Glykosylierung (Kim *et al.*, 2000). Der Verlust der DPM-Synthase-Aktivität kann seine Ursache in Mutationen verschiedener Genprodukte haben (Tomita *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Ware & Lehrman., 1996). DPM1 wird auf Chromosom 20q13 codiert (Maeda *et al.*, 2000). Bei vier Patienten, die aus drei Familien stammen, ist eine Punktmutation in Codon 92 von DPM1 verantwortlich für die Substitution von Arginin anstelle von Glycin (García-Silva *et al.*, 2004). Es wird ein dolichol-gebundenes Oligosaccharid mit nur 5 Mannoseresten statt der physiologischen 9 Mannosereste produziert. Die betroffenen Patienten weisen fast keine psychomotorische Entwicklung, epileptische Anfälle und Hypotonie auf (Kim *et al.*, 2000). Ein neuer Patient mit mildereren Symptomen wurde 2004 von García-Silva *et al.* beschrieben. Eine homozygote Mutation in Exon 9 des DPM1 Genes führte zu zerebellärer Dysfunktion jedoch ohne zerebelläre Atrophie, zu Optikusatrophie, Entwicklungsverzögerung und Mikrozephalus (García-Silva *et al.*, 2004).

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Dolichol-Phosphat-Mannose fungiert als Donor der Mannosen des GPI-Gerüsts, aber auch der N-Glykosylierung und O-Mannosylierung von Proteinen. Die Bildung von Dol-P-Man aus GDP-Mannose und Dolichol-Phosphat wird von der Dol-P-Man-Synthase katalysiert, deren Aktivität im ER nachgewiesen werden konnte.

Es ist bekannt, dass sich die Dol-P-Man-Synthase-Sequenzen in zwei Gruppen unterteilen lassen. DPM1-Proteine der ersten Klasse liegen in Organismen wie *S. cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Leishmania mexicana* und *Trypanosoma brucei* vor. Sie bestehen nur aus einer Einheit, weisen eine COOH-hydrophobe Transmembrandomäne auf, fungieren selbst als DPM1-Synthase und können in *E. coli* exprimiert werden.

Die zweite Klasse ist durch das Fehlen einer hydrophoben C-terminalen Domäne charakterisiert und beinhaltet die humane Dol-P-Man-Synthase, die Synthase von *S. pombe*, *T. reesei* und *Caenorhabditis briggsiae*. Für die Dol-P-Man-Synthase des Menschen konnten bereits drei Untereinheiten charakterisiert werden: Diese Untereinheiten haben neben der katalytischen auch regulatorische und stabilisierende Funktionen. Die volle Enzymaktivität kann demnach nur bei Vorliegen aller drei Untereinheiten erreicht werden. Somit ist eine Expression dieser Enzyme in *E. coli* oder Organismen, die eine Dol-P-Man-Synthase erster Gruppe aufweisen, nicht möglich.

Da die Zuordnung der Dol-P-Man-Synthase von *P. falciparum* zu einer dieser beiden Klassen bisher nicht erfolgen konnte, war das Ziel dieser Arbeit die Expression und Charakterisierung der Dol-P-Man-Synthase dieses Parasiten. *Plasmodium* ist evolutionär den Kinetoplastiden und Schizosaccharomyces näher, so dass man erwarten würde, die Dol-P-Man-Synthase dieses Protozoons in eine Klasse mit Hefen und Pilzen einordnen zu können.

Würde sich herausstellen, dass sich die Dol-P-Man-Synthase von *P. falciparum* von dem humanen Enzym in wichtigen Punkten unterscheidet, würde sich somit ein neues Wirkstoff-Ziel („Target“) zu einer Antimalariatherapie eröffnen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten Mutanten von *P. falciparum* erstellt werden, um einen Beitrag zu der Einordnung von *P. falciparum* zu einer Dol-P-Man-Synthase-Gruppe zu leisten. Zu Beginn der Arbeit war lediglich eine PfDPM1 Untereinheit bekannt. Die zu erstellenden Konstrukte sollten jeweils das PfDPM1-Gen als auch eine bestimmte Markierungssequenz beinhalten, mit deren Hilfe das Protein nach Expression in *P. falciparum* näher untersucht werden sollte.

Erste Anhaltspunkte bietet das Fehlen einer hydrophoben C-terminalen Domäne und legt somit die Vermutung nahe, die Dol-P-Man-Synthase dieses Protozoons der zweiten Gruppe zuzuordnen. Somit sollte nach weiteren Untereinheiten, Homologen zu den humanen Komponenten der DPM-Synthase, gefahndet werden. In der Datenbank des *Plasmodium falciparum* Genom-Projektes existieren jedoch keine Sequenzen, die eine Ähnlichkeit zu den humanen Einheiten aufweisen.

Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor ist die Tatsache, dass DPM1 von *Plasmodium* eine *S. pombe*-Mutante, jedoch nicht die Mauszell-Linie Thy1-E komplementierte. Da PfDPM1, genauso wie humane DPM1-Synthase, nicht in *E. coli* exprimiert werden konnte, sollten neue Expressionsmöglichkeiten in *Plasmodium* selbst geprüft werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Geräte

| | |
|--|---------------------------|
| Analysewaage Mettler | Mettler, Rabenau-Londorf |
| Brutschrank mit CO ₂ -Regelung | Heraeus, Hanau |
| DNA Thermal Cycler TM | Perkin Elmer, Weiterstadt |
| DNA Thermal Cycler Primus 96 ^{plus} | MWG Biotech, Ebersberg |
| DNA-Sequencer ABI Prism TM 377 | Perkin Elmer, Weiterstadt |
| Elektroporationsküvetten (0,4 mm) | BioRad, München |
| Feinwaage Mettler PM 460 | Mettler, Rabenau-Londorf |
| Filmentwickler Optimax® 2010 | PROTEC, Oberstenfeld |
| Gel-Doc 2000 | Bio Rad, München |
| Gelelektrophoresekammer | von Kreutz, Reiskirchen |
| Heizblock | von Kreutz, Reiskirchen |
| Heizofen | Heraeus, Hanau |
| Land Camera Polaroid MP-4 | Bachofer, Reutlingen |
| Mikroskop, Typ Laborlux S | Leitz, Wetzlar |
| Modular Incubatro Chamber | |
| Billups-Rothenberg | Del Mar, CA, USA |
| Neubauer Zählkammer | Brand, Wertheim |
| Petrischalen (94/16 mm) | Greiner, Frickenhausen |
| Petrischalen (150/20 mm) | Nunc, Karlsruhe |
| PH-Meter, Typ CG 832 | Schott, Hofheim |
| Pipetten | Gilson, Bad Camberg |
| Polaroid Filme, Typ 667 | Polaroid, USA |
| Spannungsquelle (Power Supply, E834) | von Kreutz, Reiskirchen |
| Spectrometer (Milton Roy, S-3000) | Fischer, Frankfurt |
| Steril-Arbeitsbank Hera-Safe | Heraeus, Hanau |
| Steril-Arbeitsbank (Laminarflow) | Prettl, Bempflingen |
| Ultrazentrifuge L7-55 | Beckmann, München |
| UV-Kontaktlampe Chroma 41 | Vetter, Wiesloch |

| | |
|---------------------------|------------------------|
| Zellkulturflaschen | Greiner, Frickenhausen |
| Zentrifuge, Typ Biofuge A | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge, Typ Minifuge | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge 5417-R | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge, Typ J2-21 | Beckmann, München |

3.1.2 Chemikalien, Enzyme und „Kits“

Falls nicht anders angegeben, wurden für die Enzym-Reaktionen die entsprechenden Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Das in den Versuchen verwendete Wasser war deionisiert und wurde über eine Millipore-Filteranlage gewonnen.

| | |
|---------------------------------|---|
| Agar | Serva, Heidelberg |
| Agarose | Biozym, Hess. Oldendorf |
| Alkalische Phosphatase | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Ampicillin | Sigma, Deisenhofen |
| APS | Amersham Buchler, Braunschweig |
| Blasticidin S HCl | Calbiochem, Darmstadt |
| CDP-Star™ | Roche Diagnostics, Mannheim |
| DNA-Längenstandard (Marker) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| DNA-modifizierende Enzyme | Roche oder New England Biolabs, Schwalbach |
| DIG Easy Hyb | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Ethidiumbromid | Sigma, Deisenhofen |
| Glykogen | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Hot Wax™ Mg ²⁺ Beads | Invitrogen, Karlsruhe |
| Neomycin | Sigma, Deisenhofen |
| Nitrozellulose-Filter | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Nukleosidtriphosphat | Promega, Heidelberg |
| Nylonmembranen | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Restriktionsendonukleasen | Roche oder New England Biolabs, Schwalbach |
| Röntgenfilme | Fuji, Kodak |
| Tetrazyklin | Sigma, Deisenhofen |

„Kits“:

- ABI PRISM™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems)
- AdvanTage™ PCR Cloning Kit (Clontech)
- DIG DNA labeling and Detection Kit (Roche)
- E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab)
- Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene)
- HotMaster™ Taq DNA Polymerase (Eppendorf)
- Hyperfilm™ (Amersham, Biosciences)
- pcDNA™ 3.1/V5-His-TOPO® Cloning Kit (Invitrogen)
- PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)
- pMAL™ Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Qiagen Mini, Medi, Maxi Kit (Qiagen)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- Strep-tag® (Iba)
- Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce)
- Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)
- TA Cloning® Kit (Invitrogen)
- TripleMaster™ PCR System (Eppendorf)
- ZAP Express™ Predigested Vector Kit (Stratagene)

3.1.3 Bakterien, Hefen, Plasmide, Parasiten und Oligonukleotide**3.1.3.1 Bakterien: *E. coli* Stämme**

- E. coli* K12, XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac,
[F' proAB, lac^qZ, ΔM15, Tn10 (Tet^r)]

Dieser Stamm wurde zur Vermehrung von Plasmiden in *E. coli* verwendet.

-One shot TOP10F' Chemically Competent *E. coli*: F'[lacI^qTn10(Tet^R)] mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

Dieser Stamm diente der Vermehrung von PCR-Produkten in *E. coli*

3.1.3.2 Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*)

-YPH499a: ura3-52, lys2-101^{ochre}, trp1-63, his3-200, leu2-1

3.1.3.3 Parasiten

-*Plasmodium falciparum*, Stamm FCBR, wurde in Bogotá (Kolumbien) isoliert und der Arbeitsgruppe Parasitologie von den Behringwerken Marburg zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zu dem Stamm 3D7 ist der Stamm FCBR nicht in der Lage, Gametozyten zu bilden, so dass keine Experimente in Anopheles-Mücken durchgeführt werden können.

-*Plasmodium falciparum*, Stamm 3D7, geht aus dem Stamm NF54 hervor, der in den Niederlanden bei einem Patienten mit Flughafen-Malaria isoliert werden konnte. Dieser Patient hatte die Niederlande nie verlassen. Der Stamm 3D7 wurde auch für das „Malaria Genome Project“ genutzt.

3.1.4 Vektoren

3.1.4.1 Der pGTPneo46-Vektor

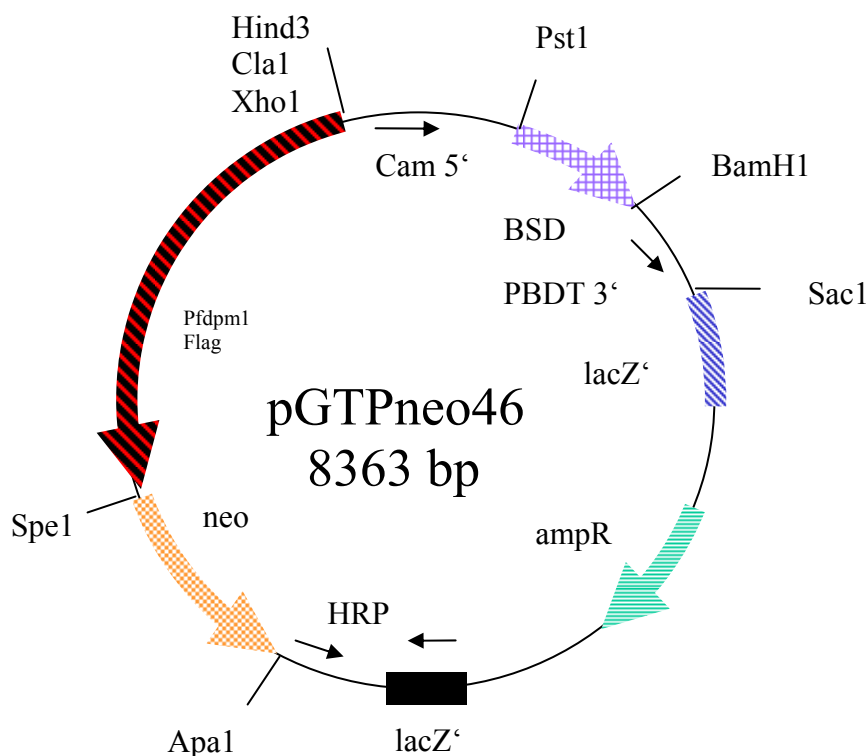


Abb. 19: Schematische Darstellung des Plasmides pGTPneo46

Das 8363 bp große Plasmid pGTPneo46 wurde für das Projekt zur Expression eines Gst und Flag markierten PfDPM1-Gens in *Plasmodium falciparum* verwendet und freundlicherweise von Prof. John E. Hyde zur Verfügung gestellt.

Das Plasmid enthält drei Resistenzgene: 1.: Ein Blastocidin-Resistenzgen (bsd), das Blastocidin S Deaminase-Gen von *Aspergillus*; es steht unter der Kontrolle eines *P. falciparum* Calmodulin-Promoters (5' Cam) und kann somit bereits nach Aufnahme eines freien Plasmides exprimiert werden. 2.: Das Neomycin Phosphotransferase II (neo)-Gen: es kann nur exprimiert werden, wenn eine homologe Rekombination des zu untersuchenden Gens in *Plasmodium* stattfindet und die ganze Kasette unter der Kontrolle eines endogenen *Plasmodium*-Promoters steht. Das Neomycin-Resistenzgen verleiht Resistenz gegen mehrere Antibiotika, wie Kanamycin, G418 und Neomycin selbst. 3.: Ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Dem Blastocidin-Resistenzgen folgt eine Transkription-Terminationssequenz des dhfr-ts Gens (Dehydrofolatreduktase Gens) von *Plasmodium berghei* (3'PbDT).

Die 3' untranslatierte Sequenz des hrp 2 Gens (3'hrp2) von *P. falciparum* wurde hinter das Stop-Codon des Neo-Gens positioniert, um ein endogenes Transkriptions-Terminations-Signal zu erhalten.

3.1.4.2 Der pCR® 2.1 TOPO-Vektor

Die Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang wurde in den pCR® TOPO-Vektor, 3,9 kb durchgeführt.

Auf Grund seines T-Überhanges wird die Insertion des PCR-Produktes entscheidend erleichtert. Der TOPO-Vektor trägt zur späteren Selektion eine Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen. Darüber hinaus erlaubt der lacPromoter die Expression des lacZ α Fragmentes. Das lacZ α -Fragment kodiert die ersten 146 Aminosäuren der β -Galaktosidase. Komplementierung in trans mit dem Ω -Fragment ergibt die Aktivierung der β -Galaktosidase für ein „Blau-Weiß-Screening“ der Klone auf Agar. Klone mit einem Insert sind weiß, solche ohne Insert sind blau gefärbt.

Der pUC Origin erlaubt hohe Replikationsraten in *E. coli*. Die M13 „forward und reverse Site“ bindet an spezifische Oligonukleotide und ermöglicht die Sequenzierung des Inserts.

Die T7-Promoter und Primer Sequenz erlaubt ebenfalls eine Sequenzierung des PCR-Produktes, aber auch die *in vitro* Transkription von Antisense RNS.

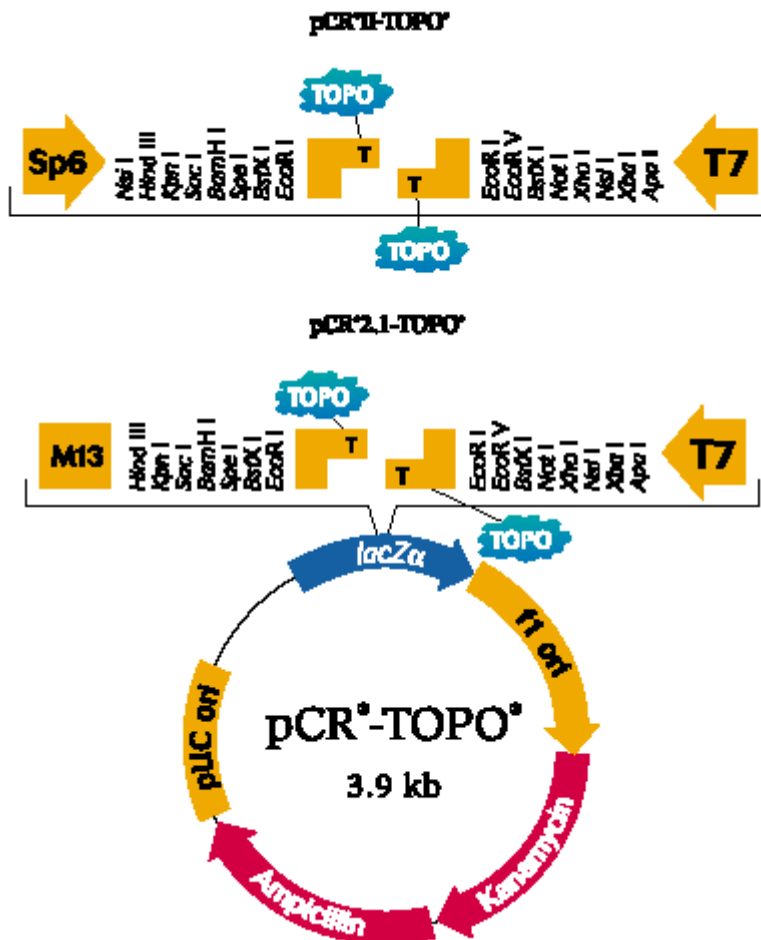


Abb. 20: Schematische Abbildung des pCR TOPO-Vektors, 3,9 kb (Invitrogen)

Dieser Vektor wurde für die Ligation von PCR-Produkten mit A-Überhang in das Plasmid genutzt. Auf Grund des vorliegenden T-Überhangs wird dieser Vorgang erleichtert. Darüber hinaus vereinfacht das lacZα-Gen das Screening der Klone durch mögliche Blau-Weiß-Selektion.

3.1.4.3 Der pcDNA3.1D/V5-His-TOPO®-Vektor

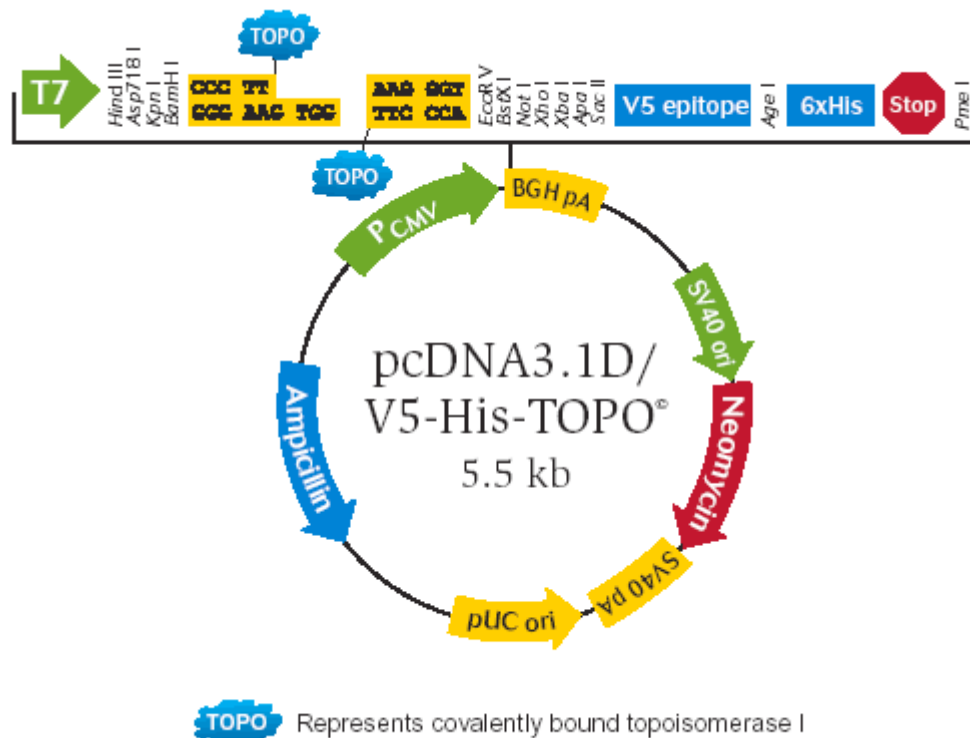


Abb. 21: Schematische Darstellung des pcDNA3.1D/V5-His-TOPO®-Vektors (Invitrogen)

Dieser Expressions-Vektor wurde zur Transformation des PfDPM1strep-Konstruktes eingesetzt. Der Vektor wurde auf Grund seiner Schnittstellen, seiner Größe und einfacher Handhabung ausgewählt, mit dem Restriktionsenzym *Hind* III behandelt und linearisiert. Im Anschluss daran konnte das PfDPM1Strep-Konstrukt eingefügt werden.

Der Vektor trägt den humanen Cytomegalievirus (CMV) Promoter, um eine hohe Expression in Säugerzellen zu gewährleisten. Darüber hinaus bindet das C-terminale V5-His-Epitop mit einem Anti-V5-Antikörper zur Detektion von rekombinantem Protein. Zur Selektion gewünschter Klone trägt das Plasmid eine Ampicillin- und eine Neomycin-Resistenz.

3.1.4.4 Der pRS426-Vektor

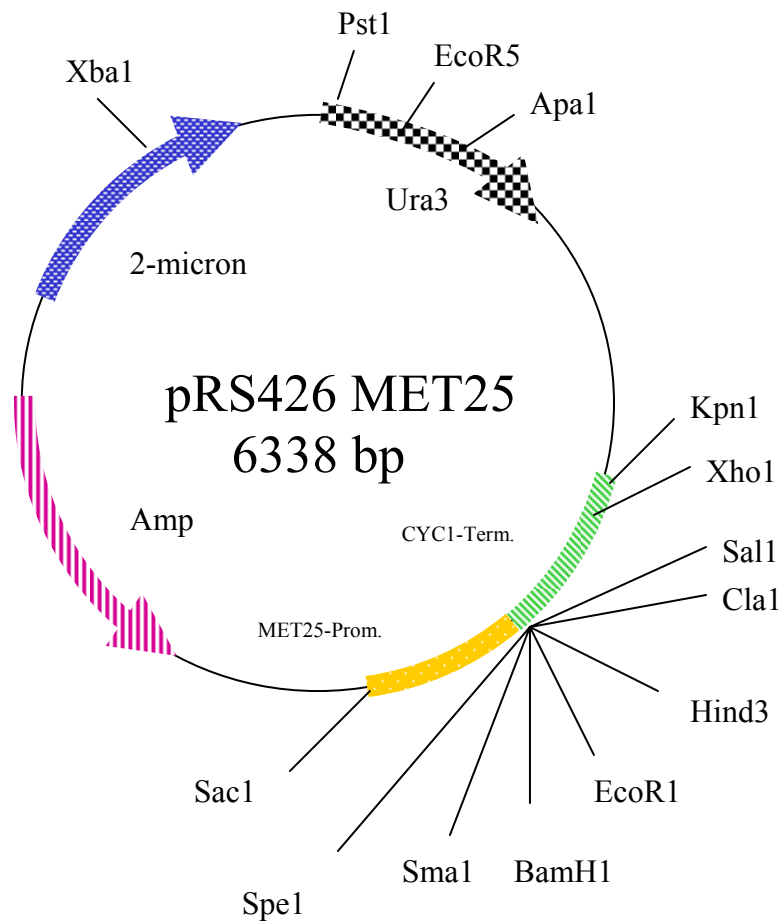


Abb. 22: Schematische Darstellung des pRS426 MET25-Vektors

Das 6338 bp große *E. coli/S. cerevisiae* Shuttleplasmid wurde zur Realisation der Expression des mit Flag und Gst modifizierten DPM1-Gens von *Saccharomyces cerevisiae* genutzt.

Das Plasmid besitzt u.a. das URA3-Gen (codiert das Enzym Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase) als Selektionsmarker in Hefe, ein Amp^r-Gen als Selektionsmarker in *E. coli*, sowie einen Methionin-Promoter vor dem „Polylinker“. Die autonome Replikation in Hefe wird durch die 2-micron Sequenz gewährleistet (Mumberg *et al.*, 1995).

3.1.4.5 Der pMAL-c2E Vektor

pMAL-c2E Polylinker:

```

          Sac I                               Ava I
5' ...TCG AGC TCG AAC AAC AAC AAT AAC AAT AAC AAC CTC GGG
                                     GAT GAC GAT GAC AAG GTA CCG GAA TTC GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC TTG... /lacZα
          Kpn I       EcoRI       BamHI       XbaI       SalI       PstI       Hind III
Asp Asp Asp Asp Lys

```

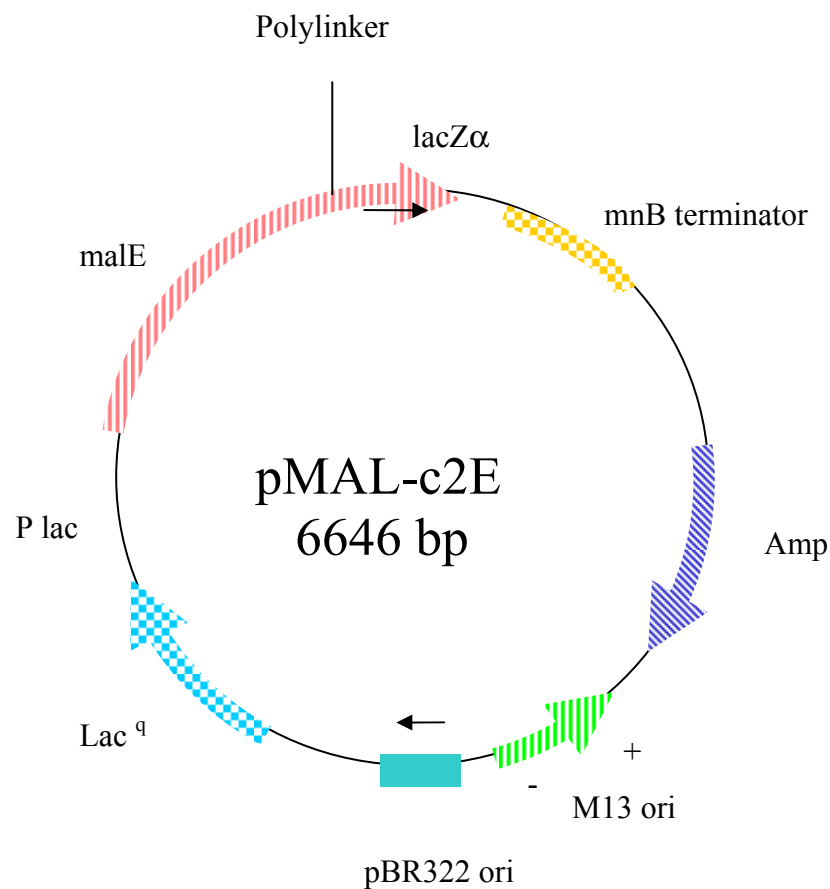


Abb. 23: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pMAL-c2E (NEB, modifiziert)

Dieser Vektor wurde als Zwischenstufe zur Klonierung des Blastocidin-Resistenzgens genutzt, welches unter der Kontrolle des vorgeschalteten 5' CAM-Promoters stand.

Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Sac* I geöffnet und die Blastocidin-Resistenz-Kassette inseriert. Das Blastocidin-Resistenzgen konnte nun mit *Pst* I

und *Bam* HI „ausgeschnitten“ und gegen das PfDPM1strep-Gen ausgetauscht werden, da diese Schnittstellen durch Verdau mit *Hind* III und *Sac* I entfernt wurden.

Der Vektor pMAL-c2E wurde so konstruiert, dass die Insertion eines Gens die Expression des lacZ α -Gens unterbricht und somit ein Blau-Weiß-Screening ermöglicht.

Der Vektor enthält ebenfalls eine M13-Sequenz zum Start der DNA-Replikation. Diese Sequenz ermöglicht ebenso die Produktion von Einzelstrang-DNA zur Sequenzierung.

3.1.5 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden in einer Polymerase-Kettenreaktionen oder zur DNA-Sequenzierung verwendet. Die Oligonukleotide wurden nach eigenen Vorgaben von der Firma MWG-Biotech-AG (Ebersberg) hergestellt.

-PfDPM1strep Sense 5':-GGG CTG CAG ATG GTT ATT CGA TTT TTC CTG TTT GTC ATT ACA CTC-3'

-PfDPM1Strep Antisense 5':-CCC GGA TCC **CTT CTC GAA CTG CGG GTG GGA CCA** TAT TGA CCA GAA TAA CTT GAA AAG ACC TGA TAA GTA TTG TAA AAT ATC TGT AGT TTC-3'

Der Primer PfDPM1strep Sense besitzt eine 45 bp lange Sequenz und trägt sowohl die kodierte Strep-Tag-Sequenz als auch die unterstrichene Restriktionsschnittstelle für *Pst* I.

Der Primer diente der Amplifikation des PfDPM1-Gens aus genomischer DNA von *Plasmodium falciparum* mit der Polymerase-Kettenreaktion.

Die Sequenz des PfDPM1strep Antisense Primers trägt eine 90 bp lange Sequenz und enthält, wie der Sense-Primer, die kodierte Strep-Tag-Sequenz und die unterstrichene Schnittstelle für *Bam* HI.

Die Basenfolge, die für die Aminosäuresequenz des Strep-Tag-Proteins kodiert, ist fett gedruckt.

-PfDPM1strepmut Sense: 5'-GAT AAT AGT CAA GAT GGT ACG GCG GAC GTG TAC AAA AAG-3'

-PfDPM1strepmut Antisense: 5'-CTT TTT GTA CAC CGC CGT ACC ATC TTG TTG ACT ATT ATC-3'

Die beiden Oligonukleotide von jeweils 39 bp dienen der Beseitigung der *Pst* I-Schnittstelle an Position 213 im PfDPM1-Gen durch „Site Mutagenesis“.

-PfDPM1strepSeq1: 5'-GAA CCA AGG TGG AAT ATC AGG ATG GTC ATT-3'

-PfDPM1strepSeq2: 5'-GAT CCT TTT GTT GGT GAT AAA AGG ATA TAA TAA TAA GAG A-3'

Die Oligonukleotide ermöglichen die Sequenzierung und Kontrolle des Konstruktes.

-PfDPM1hind3 Sense: 5'-ACT CTA GAA AAG CTT ATG GTT ATT CGA TTT TTC CTG TT-3'

-PfDPM1hind3 Sense reverse: 5'-AAC AGG AAA AAT CGA ATA ACC ATA AGC TTT TCT AGA GT-3'

-PfDPM1spe1 Antisense: 5'-TTC TGG TCA ATA ACT AGT CTC GAG TCA TGT A-3'

-PfDPM1spe1 Antisense reverse: 5'-TAC ATG ACT CGA GAC TAG TTA TTG ACC AGA A-3'

Die Oligonukleotide PfDPM1hind3 Sense und PfDPM1spe1 Antisense dienen der Amplifikation des PfDPM1 Gens mit entsprechenden Schnittstellen aus genomischer *P. falciparum*-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion. Die Schnittstellen sind unterstrichen. Die Primer PfDPM1hind3 Sense reverse und PfDPM1spe1 Antisense reverse wurden zur anschließenden Sequenzierung und Kontrolle des amplifizierten Gens eingesetzt.

-flaggst(ATG)spe1 Sense: 5'-CCC TTG GGA CTA GTA TGG ACT ACA AGG ACG ATG ACA AGT CCC CT-3'

-flaggst(ATG)spe1 Antisense: 5'-AGG GGA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAT ACT AGT CCC AAG GG-3'

Diese Oligonukleotide wurden zur Amplifikation der GST/FLAG-Sequenz verwendet, die der Modifikation des PfDPM1 Gens diene. Gegen beide Proteine sind Antikörper vorhanden und bieten ein gut etabliertes System.

-ScDPM1flagEcoR1 Sense: 5'-GGG GAA TTC ATG AGC ATC GAA TAC TCT GTT ATC G-3'

-ScDPM1flagSal1 Antisense: 5'-GGG GTC GAC TTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA
GTC AAA GAC CAA ATG GTA TAG CTG GTA GCA AAC G-3'

Die Primer ScDPM1flagEcoR1 Sense und ScDPM1flagSal1 Antisense dienen der Amplifikation des mit GST und FLAG markierten ScDPM1-Gens zur Durchführung eines Projektes zur Untersuchung des DPM1-Gens in *S. cerevisiae*. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

-flaggstATGSal1 Sense: 5'-CCC TTG GGG TCG ACA TGG ACT ACA AGG ACG ATG
ACA AGT CCC CT-3'

flaggstATGSal1 Antisense: 5'-AGG GGA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAT
GTC GAC CCC AAG GG-3'

Die Primer wurden in einem zweiten Projekt der ScDPM1-Expression mit modifizierten Schnittstellen verwendet.

-Met (5'): 5'-CCT TCG TGT AAT ACA GGG-3'

-Term (3'): 5'-CGT GAC ATA ACT AAT TAC-3'

Die Oligonukleotide Met und Term dienen der Sequenzierung des ScDPM1flag-Gens in dem Vektor pRS426.

3.1.6 Puffer, Lösungen und Nährmedien

3.1.6.1 Lösungen

-Äthanol/NH₄-Acetat (89/11):

| | |
|-------------------------|----------------|
| Äthanol | 99,6 % absolut |
| NH ₄ -Acetat | 10 M |

-CsCl-Lösung: 44,5% (W/W):

| | |
|--------|---------|
| CsCl | 44,5 g |
| Wasser | 55,5 ml |

-DEPC/H₂O (mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser):

| | |
|---------------|-----------------|
| DEPC | Endkonz.: 0,1 % |
| Autoklavieren | |

-CsCl/EDTA-Lösung:

| | |
|--------|--------------|
| CsCl | 96 g |
| EDTA | 2 ml (0,5 M) |
| DEPC | 100 ml |
| Wasser | ad 100 ml |

-Te/Li-Acetat:

| | |
|-----------|--------|
| TE Puffer | 1 x |
| Li-Acetat | 100 mM |

3.1.6.2 Puffer

-SM-Puffer :

| | |
|-------------------|--------|
| NaCl | 100 mM |
| MgSO ₄ | 20 mM |
| Tris/HCl (pH 7,5) | 50 mM |
| Gelatine | 0,01 % |

-TBF I :

| | |
|-------------------|------------|
| Kaliumacetat | 30 mM |
| KCl | 100 mM |
| CaCl ₂ | 10 mM |
| Glycerin | 15 % (V/V) |
| MnCl ₂ | 50 mM |

Mit Wasser auf 1000ml auffüllen und autoklavieren.

MnCl₂ separat autoklavieren und steril zugeben.

-TBF II:

| | |
|-------------------|------------|
| Na-MOPS | 10 mM |
| CaCl ₂ | 75 mM |
| KCl | 10 mM |
| Glycerin | 15 % (V/V) |

-TAE Puffer (50x), pH 8,0:

| | |
|-----------|------------|
| Tris Base | 2 M |
| Eisessig | 57 ml |
| EDTA | 50 mM |
| Wasser | ad 1000 ml |

-TE Puffer, pH 8,0:

| | |
|----------|-------|
| Tris/HCl | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

-PBS, pH 7,2:

| | |
|----------------------------------|------------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,15 g |
| KCl | 0,20 g |
| NaCl | 8,00 g |
| Wasser | ad 1000 ml |

-PBS def., pH 7,2:

| | |
|---------------------------------------|------------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,15 g |
| KCl | 0,2 g |
| NaCl | 8,0 g |
| MgCl ₂ , 6H ₂ O | 0,1 g |
| CaCl ₂ | 0,1 g |
| Wasser | ad 1000 ml |

-SSC (*Saline Sodium Citrat Puffer, 20x*) pH 7,0:

| | |
|---------------|-------|
| NaCl | 3 M |
| Natriumcitrat | 0,3 M |

-STE Puffer (*10x*):

| | |
|----------|----------------|
| NaCl | 1 M |
| Tris/HCl | 100 mM, pH 8,0 |
| EDTA | 10 mM |

-Indikationspuffer (*10x, für DNA-Gelelektrophorese*):

| | |
|----------------|--------|
| Bromphenolblau | 0,25 % |
| Xylencyanol FF | 0,25 % |
| Tris/HCl | 10 mM |
| EDTA | 15 mM |
| Glycerin | 50 % |

-Saponin-Lysispuffer:

| | |
|---------|-------------------|
| Saponin | 0,015 % (150mg/l) |
| SSC | 1 x |

-Lysispuffer für die DNA-Isolation:

| | |
|------|--------|
| EDTA | 100 mM |
| SDS | 2 % |

3.1.6.3 Nährmedien für Bakterien, Hefen und *P. falciparum*

3.1.6.3.1 Nährmedien für Bakterien und Hefen

-LB-Medium, pH 7,5 (*für Bakterien*):

| | |
|-------------------------|------|
| Trypton | 10g |
| Hefeextrakt | 10g |
| NaCl | 5g |
| MgCl ₂ (1 M) | 1 ml |
| MgSO ₄ (1 M) | 1 ml |

Wasser ad 1000 ml
Für festes Medium 15g Agar zugeben

-YPD-Medium (Vollmedium für Hefe):

Hefeextrakt 10 g
Pepton 20 g
Wasser ad 900 ml
Glukose 20 g separat in 100 ml Wasser
Autoklavieren und zu Lösung zugeben

-Glukose-Selektivplatten (SD-Platten):

Glukose 20 g
Agar 20 g
Wasser ad 500 ml und autoklavieren

Folgende Lösung separat herstellen, steril filtrieren und zu der Glukose-Lösung geben:

YNB (Yest Nitrogen Base) 0,85 g
NH₄SO₄ 2,5 g

Entsprechende Aminosäure oder Base zugeben und mit Wasser auf 50 ml auffüllen.

-Aminosäuren oder Basen:

Adenin 1,0 ml Stammlösung (2,0 mg/ml)
Uracil 5,0 ml Stammlösung (2,0 mg/ml)
Leucin 1,5 ml Stammlösung (10 mg/ml)
Lysin 1,5 ml Stammlösung (10 mg/ml)
Histidin 1,0 ml Stammlösung (10 mg/ml)
Tryptophan 1,0 ml Stammlösung (10 mg/ml)

Je nach Selektionsbedingungen wurden entsprechende Aminosäuren zugegeben oder weggelassen.

-Galaktose-Selektivplatte (SGR-Platten) 0,5 l:

Galaktose 20 g
Raffinose 10 g
Agar 8,0 g

| | |
|--------|-----------------------------|
| Wasser | ad 450 ml und autoklavieren |
|--------|-----------------------------|

Separat folgende Lösung herstellen, steril filtrieren und zugeben:

| | |
|---------------------------------|--------|
| YNB | 0,85 g |
| NH ₄ SO ₄ | 2,5 g |

Entsprechende Aminosäure zugeben und mit Wasser auf 50 ml auffüllen.

-YPGR-Medium, 1,0 l:

| | |
|-------------|-----------------------------|
| Hefeextrakt | 10 g |
| Pepton | 20 g |
| Wasser | ad 800 ml und autoklavieren |

| | |
|-----------|----------------------------------|
| Galaktose | 40 g |
| Raffinose | 20 g |
| Wasser | ad 200 ml, separat autoklavieren |

Anschließend die Lösungen unter sterilen Bedingungen zusammengeben.

3.1.6.3.2 Medium für die *in-vitro*-Kultivierung von *P. falciparum*

Das zur Kultivierung von *P. falciparum* verwendete Medium ist sehr komplex. Einige der Inhaltsstoffe sind in wässriger Lösung nicht dauerhaft stabil (wie z. B. reduziertes Glutathion). Das frische Plasma ist gegen Lageralterung besonders empfindlich. Daher wurde das Medium als sogenanntes Grundmedium für maximal 4 Wochen im Voraus ohne Zugabe des Plasmas angesetzt und gelagert.

Grundmedium:

| | |
|-------------------------------|------------|
| RPMI (Gibco BRL Powder) | 9,66 g |
| Hepes (free acid, Calbiochem) | 5,53 g |
| Hypoxanthin (Base, Sigma) | 46,5 mg |
| Wasser | ad 1000 ml |
| Steril filtriert | |

Anschließend wurde das Grundmedium bei 4°C gelagert und konnte für 4 Wochen aufbewahrt werden.

Herstellen des Kulturmediums:

Kulturmedium wurde aus dem Grundmedium durch Zugabe der aufgeführten Substanzen hergestellt. Das Kulturmedium wurde ebenfalls bei 4°C gelagert.

Kulturmedium:

Das Grundmedium (930 ml) wurde kurz vor Gebrauch wie folgt ergänzt:

| | |
|-----------------------------------|-------|
| 5% NaHCO ₃ | 40 ml |
| Neomycin-Lösung (10 mg/ml) | 10 ml |
| 10%ige Albumax-Lösung (Gibco BRL) | 50 ml |
| steril filtrieren | |

Erythrozyten für die *P. falciparum*-Kultur

Die Erythrozyten für die Kultur von *P. falciparum* wurden aus sterilen, leukozytenarmen Erythrozytenkonzentraten (Blutbank, Universitäts-Klinikum Marburg) gewonnen, die nicht älter als 10 Tage waren. Das leukozytenarme Blut wurde steril in eine Flasche umgefüllt und bei 4°C gelagert. Dieses Erythrozytenkonzentrat war ca. 4 Wochen für die Plasmodienkultur verwendbar. Aus dem Vorrat wurde jeweils ein Aliquot (ca. 1 ml/10 ml Kultur) für die Kultur entnommen. Das Aliquot wurde abzentrifugiert (800 × g, 5 min, 4°C), mit sterilem PBS aufgenommen und wiederholt abzentrifugiert. Dieser im Folgenden als Waschen bezeichnete Vorgang wurde erneut durchgeführt und das Pellet anschließend im Kulturmedium bei 50 % Hämatokrit aufgenommen. In dieser Form waren die Erythrozyten einige Tage im Kühlschrank haltbar.

3.2 METHODEN

3.2.1 *In-vitro*-Kultivierung von *P. falciparum*

3.2.1.1 Züchtungsbedingungen

Die Kulturen wurden in einem gasdichten Inkubator (Modular Incubator Chamber Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, USA) mit einem Gasgemisch bestehend aus 5 % O₂, 5 % CO₂ und 90 % N₂ (Messer, Griesheim) begast und anschließend im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde in der Regel täglich gewechselt.

3.2.1.2 Kontrolle der Vermehrung der Parasiten

Methanol-Fixierung

Färbelösung: 1/10 mit Giemsa-Puffer verdünnte Giemsa-Lösung (Merck)

Giemsa-Puffer:

3,324 g Na₂HPO₄

1,088 g KH₂PO₄

Wasser ad 2 l.

(Nach dem Autoklavieren für Monate haltbar)

Die Vermehrung der Parasiten wurde anhand von Parasitenkulturausstrichen kontrolliert, die mit einer modifizierten Version der ursprünglichen Giemsa-Färbung angefärbt wurden. Dazu wurde der Ausstrich für einige Minuten in Methanol fixiert und getrocknet. Anschließend wurden die luftgetrockneten Ausstriche für 5-15 min in Färbelösung gefärbt und dann mit Leitungswasser abgespült. Die Ausstriche wurden im Anschluss in Giemsa-Puffer differenziert. Nach dem Lufttrocknen wurde die Parasitämie in den Ausstrichen mikroskopisch nach dem Öl-Immersionssprinzip unter 50-facher Vergrößerung bestimmt.

3.2.1.3 Kryostabilate der Parasiten

(modifiziert nach Trager & Jensen, 1976)

Blutplasma

Kulturmedium (s. 3.1.6.3.2)

Erythrozytensuspension

30 % iges DMSO (verdünnt mit Kulturmedium und steril filtriert)

Für die dauerhafte Lagerung von erythrozytären Stadien des Malariaerregers *P. falciparum* wurden Kryostabilate angelegt. Bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert, können diese Stabilate über Jahre gelagert werden, ohne ihre Lebensfähigkeit zu verlieren.

Kulturen von *P. falciparum*, die sich im Ringstadium befanden (12-22h), wurden zentrifugiert ($800 \times g$, 20°C , 5 min) und der Überstand verworfen. Das Volumen des Sediments wurde bestimmt und ein gleiches Volumen 30 %iges DMSO (verdünnt mit Kulturmedium und steril filtriert) tropfenweise zugegeben. Diese Zellsuspension wurde in 1 ml Portionen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen der Stabilate erfolgte, indem sie von flüssigem Stickstoff direkt in ein auf 37°C beheiztes Wasserbad überführt wurden. Anschließend wurden 5 ml warmes Kulturmedium tropfenweise (auf 15 min verteilt) unter ständigem Schütteln zugegeben. Die Suspension wurde abzentrifugiert ($300 \times g$, 5 min, 20°C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 10 ml Kulturmedium mit 1 ml Erythrozytensuspension in Kultur genommen.

3.2.1.4 Isolieren der Parasiten aus der *in-vitro*-Kultur

(modifiziert nach Goman *et al.*, 1982)

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| <i>PBS</i> | steril filtriert |
| <i>Saponinlösung</i> | 0,015 % Saponin (weiß, rein, Merck) |
| | NaCl 150 mM |
| | Na-Citrat 15 mM |
| | auf pH 7,6 einstellen |

Die Kulturen wurden in Zentrifugenröhrchen umgefüllt, abzentrifugiert ($800 \times g$, 10 min, 4°C) und anschließend zwei Mal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 40 ml Saponinlösung aufgenommen, sofort aufgeschüttelt und dann für 20 min auf Eis inkubiert. Die lysierte Kultur wurde abzentrifugiert ($2800 \times g$, 15 min, 4°C), wobei die freigesetzten Parasiten zuerst sedimentieren konnten. Darüber war ein milchig-weißes Sediment aus Erythrozytenmembranen sichtbar. Diese Membranen wurden zusammen mit dem Überstand dekantiert. Im Anschluss wurden die Parasiten zwei Mal mit PBS gewaschen. Das Sediment bestand aus Parasiten, die noch von der parasitophoren Vakuole umgeben und zu geringen Anteilen mit Erythrozytenmembranen verunreinigt waren.

3.2.1.5 Transfektion von *P. falciparum*

Für eine Transfektion wurden 10 ml Plasmodienkultur verwendet. 10 % der Parasiten befanden sich im Ringstadium. Lag der Anteil der Ringstadien über 20 %, wurde die Kultur mit Sorbitol synchronisiert. Einen Tag vor der Transfektion wies die Kultur dann im Idealfall nur Trophozoiten und Schizonten auf und wurde auf ca. 1 % Ringstadien verdünnt. Am Tag der Transfektion lagen dann 4 % Ringstadien vor. Nachdem die Kultur bei $2300 \times g$ für 5 min zentrifugiert wurde, lagen ca. 0,5 ml PVC vor. Für die Transfektion wurden 250 μ l (etwa die Hälfte des PVC) mit 400 μ l Cytomix und 280 μ g Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm gap) gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 310 V, 950 μ F für 7-10 Sekunden. Der Ansatz wurde sofort in eine Petrischale mit 10 ml Kulturmedium gegeben, welches 3 % Erythrozyten enthielt. Danach wurde die Petrischale in einem gasdichten Inkubator mit einem Gasgemisch (5 % O₂; 5 % CO₂; 90 % N₂) begast und anschließend bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Züchtung und Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.2.1 Anzucht und Stammkonservierung

Mit einer Einzelkolonie der Stammkultur wurden 5 ml YPD-Medium inokuliert und bei 30°C für ca. 2-3 Tage auf dem Schüttler inkubiert. *Saccharomyces cerevisiae* hat eine Verdoppelungszeit von ca. 2-3 Stunden. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) wurde die Zellzahl bestimmt und die Morphologie der Hefezellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Parallel dazu wurde die Zellzahl der Flüssigkultur durch Bestimmung der OD bei 600 nm ermittelt. Dabei entspricht eine OD_{600nm} von 1,5 ca 1×10^8 Zellen pro ml. Mit 4×10^6 Zellen wurde eine 50 ml Kultur angeimpft und für weitere 4-6h inkubiert. Die entsprechende Zellkultur wurde für 10 min, $1800 \times g$, 4°C (Minifuge, Heraeus) zentrifugiert und das Sediment in 4 ml $4 \times$ YPD/87 % Glycerol (1:1; v/v) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2.2 Transformation von Hefezellen in kleinem Maßstab

Durch die Inkubation mit Lithiumacetat werden Hefezellen kompetent, das heißt, sie sind dann in der Lage, fremde DNA aufzunehmen. Die Aufnahme der DNA erfolgt durch einen

Hitzeschock bei 42°C. Die durchschnittliche Transformationsrate bei dieser Methode beträgt ca. $1-5 \times 10^4$ Zellen pro eingesetzten Plasmid. Eine Hefekultur des entsprechenden Stammes wurde bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Diese Kultur wurde auf eine Zellzahl von 1×10^7 /ml eingestellt und 2-3 h bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei $1800 \times g$ (Minifuge, Heraeus) und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml H₂O bidest resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Suspension wurde 1 min bei $15000 \times g$ und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5-1 ml TE/Lithiumacetat (0,1 M LiAc in $1 \times TE$) gelöst, so dass man eine Endkonzentration von 2×10^9 Zellen pro ml erhielt. Für den Transformationsansatz wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

- 50 µl kompetente Hefezellen
- 300 µl $1 \times TE/LiAc/PEG-4000$ (40 %)
- 5 µl denaturierte Lachssperma-DNA (10 µg/µl)

Der Ansatz wurde nach dem Mischen für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Hitzeschock für 15 min bei 42°C durchgeführt und die Probe sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde im Anschluss 1 min bei $1500 \times g$ (Biofuge A) und RT zentrifugiert und das Pellet in 400 µl TE-Puffer resuspendiert. Je 200 µl wurden auf der jeweiligen Selektivplatte ausgestrichen.

3.2.3 Transformation von Bakterien mit Plasmiden und Plasmidisolierung

3.2.3.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

(nach Mandel & Higa, 1970)

Die Herstellung von transformationskompetenten Bakterien erfolgte nach der CaCl₂-Methode (Mandel & Higa, 1970). Durch die Behandlung der *E. coli*-Zellen mit CaCl₂ wird die Zellwand durchlässig, so dass die Bakterien Plasmide aufnehmen können. Eine Übernachtskultur wurde durch Animpfen von 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie einer Stammplatte hergestellt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Mit 100 µl dieser Kultur wurden 50 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 min mit $1200 \times g$, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml TBF I-Puffer (eisgekühlt) resuspendiert und für 10 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine erneute Zentrifugation (4°C, 5 min, $600 \times g$), im Anschluss wurde

das Pellet in 3 ml TBF II gelöst. Diese transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3.2 Durchführung der Transformation

Durch einen kurzen Hitzeschock werden transformationskompetente *E. coli*-Zellen veranlasst, Plasmid-DNA aufzunehmen. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 1-10 μl der entsprechenden DNA-Lösung (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 μl der transformationskompetenten Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock in einem Wasserbad bei 42°C für 60 s, gefolgt von einer sofortigen Abkühlung auf Eis für 2 min. Danach wurden 200 μl LB-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 μl bis 200 μl auf einer LB-Selektivplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutraum bei 37°C inkubiert.

3.2.3.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur Plasmid-DNA-Isolation wurde das E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) für die DNA-Präparation im kleinen Maßstab, bzw. das Kit „Plasmid Midi Kit“ oder „Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) für die DNA-Präparation im großen Maßstab verwendet. Dabei wurde die DNA nach Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.2.4 Aufarbeitung und Analyse von DNA

3.2.4.1 Plasmodien-DNA Isolierung

Es wurden entweder frisch isolierte Parasiten oder Parasiten, die als Pellet bei -80°C gelagert wurden, verwendet. Das Pellet mit den Parasiten wurde in 5 ml 0,1 M EDTA resuspendiert, 400 μl Proteinase K (20 mg/ml) und 5 ml Lysispuffer zugegeben, gut gemischt und 1-2 h bei 55°C inkubiert. Die Lösung wurde infolge der frei werdenden DNA sehr viskös. Danach wurde erneut frischer Lysispuffer und 200 μl Proteinase K zugegeben, leicht geschüttelt und 1 h bei 55°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Trennung von DNA und Proteinen.

3.2.4.2 DNA-Reinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient dazu, Enzyme, wie z.B. Endonukleasen, nach einem Restriktionsverdau zu entfernen. Diese würden bei den nachfolgenden Reaktionen, wie Ligation und Transformation, stören. Dabei werden Proteine selektiv in die Phenolphase extrahiert und somit von der wässrigen DNA-Lösung getrennt.

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol versetzt, gemischt und zur Phasentrennung 5 min mit $15000 \times g$ zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde abgezogen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die verbleibende organische Phase wurde mit einem Zehntel ihres Volumens re-extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereint und zum Entfernen von Phenolresten mit Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und anschließend mit Chloroform extrahiert. Dazu wurde die DNA-Lösung jeweils mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform bzw. Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Fällung mit Äthanol/Ammoniumacetat.

3.2.4.3 Fällern und Waschen von DNA

DNA-haltige Lösungen wurden mit einem Zehntel ihres Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,5), sowie dem dreifachen Volumen an 96 %igen Äthanol versetzt, gemischt und 30 min bei -20°C stehen gelassen. Nach der Zentrifugation (30 min, $15000, 4^{\circ}\text{C}$) wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit 70 %igem Äthanol gewaschen. Durch das Waschen wurden restliche Salze entfernt, welche nachfolgende Reaktionen stören könnten. Zur besseren Sichtbarkeit des DNA-Pellets nach der Zentrifugation wurde $1 \mu\text{l}$ Glykogen pro Ansatz beigegeben, so dass sich das Pellet in der Lösung hell weiß anfärbte und der Überstand sicherer abpipettiert werden konnte.

3.2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können durch Elektrophorese in Agarose-Gelen ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden, um Reaktionen wie PCR, Plasmidisolierung oder Restriktion zu kontrollieren. Die DNA-Fragmente wurden im Gel nach Anfärbung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Der Größe der erwarteten Fragmente entsprechend, wurden 0,8-2,0 %ige Agarose-Gele angefertigt. Dazu wurde eine $1 \times$ TAE-Puffer-Lösung mit Agarose (Endkonzentration 0,8-2,0 % w/v) gemischt

und kurz aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde die Agarose als Horizontalgel mit eingehängtem Kamm gegossen. Als Laufpuffer wurde 1 × TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 × bzw. 10 × Farbmaler versetzt und dann neben einem DNA-Längenstandard in die Geltaschen pipettiert. Es wurde eine konstante Spannung zwischen 30 V und 65 V angelegt. Als Kontrolle für den Verlauf der Elektrophorese diente die Farbstoffbande des Probenpuffers. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (2,5 ng/ml) 10 min gefärbt und in 1 × TAE-Puffer entfärbt.

3.2.4.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen zu isolieren, wurden die entsprechenden DNA-Banden nach der elektrophoretischen Auftrennung mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen), gemäß den Angaben des Herstellers, eluiert und gereinigt. Anschließend wurde die DNA gefällt und gewaschen. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.4.6 Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA- und RNA-haltigen Lösungen wurde über Absorptionsspektrometrie bestimmt. Bei DNA-haltigen Lösungen entspricht ein Extinktions-Koeffizient von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von etwa 50 ng/μl, bei RNA-haltigen Lösungen entspricht ein Extinktions-Koeffizient von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm etwa 40 ng/μl. Für einzelsträngige Nukleinsäuren, wie z.B. Oligonukleotide, entspricht ein Extinktions-Koeffizient von 1 etwa 33 ng/μl (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.4.7 Restriktion von DNA

Doppelsträngige DNA wurde durch die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen in Fragmente definierter Größe zerlegt. Anschließend wurde der Ansatz über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand des Bandenmusters konnte die verwendete DNA analysiert werden. Die Reaktionen erfolgten nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung mitgelieferter Puffer bei den angegebenen optimalen Reaktionsbedingungen.

Analytischer Maßstab:

- 1-26 µl dsDNA (0,2-1 µg)
- 3 µl 10 × Inkubationspuffer
- 10 U Enzym
- mit H₂O bidest auf 30 µl auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde ca. 2 h bei empfohlener Temperatur nach Angaben des Herstellers inkubiert. Anschließend wurden 3 µl 10 × Probenpuffer zugegeben und ein Aliquot auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Präparativer Maßstab:

- 1-83 µl dsDNA (1-10 µg)
- 10 µl 10 × Inkubationspuffer
- 10-50 U Enzym
- mit H₂O bidest auf 100 µl auffüllen

Erneut wurde der Reaktionsansatz ca. 4 h bei empfohlener Temperatur inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Äthanol-Fällung. Zur Kontrolle der Restriktion wurde ein Aliquot auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.4.8 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation linearisierter Plasmide zu vermeiden, wurden diese nach dem Restriktionsansatz mit Alkalischer Phosphatase (Roche) nach den Angaben von Sambrook *et al.* (1989) behandelt. Die Inkubationsbedingungen hingen davon ab, ob die linearisierte DNA 5'-überhängende, 3'-überhängende oder glatte Enden besaß. Die Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch Zugabe von EGTA auf eine Endkonzentration von 10 mM und nachfolgender Erwärmung des Reaktionsansatzes auf 75°C für 10 min. In der Regel wurde die Dephosphorylierung unmittelbar an den Restriktionsverdau angeschlossen. Nach der Dephosphorylierung erfolgte eine DNA-Reinigung über Phenol/Chloroform-Extraktion und Äthanol-Fällung.

3.2.4.9 Ligation von DNA

Die Konzentration von gereinigter Vektor- und Insertions-DNA wurden nach der analytischen Auftrennung im Agarose-Gel durch Vergleich der Bandenintensität bestimmt. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Roche) nach Angaben des mitgelieferten Protokolls. Die Inkubation des Ligations-Ansatzes erfolgte über Nacht bei 4°C. Die ligierten Konstrukte wurden nach ihrer Transformation in *E. coli*-Zellen amplifiziert.

3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und DNA-Sequenzierung

3.2.5.1 Gewinnung, Reinigung, Mutation und Klonierung von DNA-Fragmenten

Die PCR (Polymerase-Chain-Reaction) ermöglicht eine selektive Amplifikation von DNA-Sequenzen. Im Prinzip hybridisieren kurze Oligonukleotide (Primer), die den interessierenden DNA-Abschnitt von beiden Seiten her begrenzen, mit den jeweils komplementären Basensträngen der cDNA. Eine hitzebeständige DNA-Polymerase ergänzt die fehlenden Stücke komplementär zur Vorlage (Syntheserichtung 5' --> 3'). Das Ergebnis sind 2 identische DNA- Doppelstränge, die durch Hitze in ihre beiden Einzelstränge getrennt werden. Durch Wiederholung dieses Zyklus, bestehend aus einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Syntheseschritt kann ein DNA- Molekül exponentiell amplifiziert werden. Entscheidend für die einfache Handhabung der Methode ist die große Hitzestabilität der verwendeten DNA-Polymerase. Die sogenannte Taq-Polymerase, isoliert aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, übersteht die extreme Denaturierungstemperatur von 95°C ohne große Aktivitätsverluste. Für die PCR-Reaktion wurden die PCR Kits „Gene Amp“ (Perkin Elmer), HotMaster™ Taq DNA Polymerase (Eppendorf) oder TripleMaster™ PCR System (Eppendorf) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden zunächst für 5 min in dem automatischen Thermozykler zur Denaturierung der DNA auf 94°C erhitzt. Danach wurden 30 Zyklen durchgeführt. Die Zyklen bestanden aus einem Denaturierungsschritt (1min, 94°C), der Hybridisierung der Oligonukleotid-Starter (1min) und dem Elongationsschritt (2min, 72°C). Die Hybridisierungstemperatur hängt von der Zusammensetzung der Oligonukleotide ab. Sie berechnet sich nach der Formel:

$T_m = 4 \times \Sigma[C + G]^{\circ}C + 2 \times \Sigma[A + T]^{\circ}C - 5^{\circ}C$. Der Amplifikationsreaktion schloss sich ein 10-minütiger Elongationsschritt bei 72°C an. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen) gereinigt und zur Kontrolle der Reaktion auf

einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden unter Verwendung des TA Cloning® Kits nach Angaben des Herstellers in den TOPO-Vektor kloniert und transformiert. Die direkte Klonierung beruht auf einem 3' überhängenden Desoxyadenosin, welches während der PCR von der Taq-Polymerase synthetisiert wird. Der TOPO-Vektor besitzt ein 3'-überhängendes Desoxythymidin, so dass das PCR-Produkt in den Vektor kloniert werden kann.

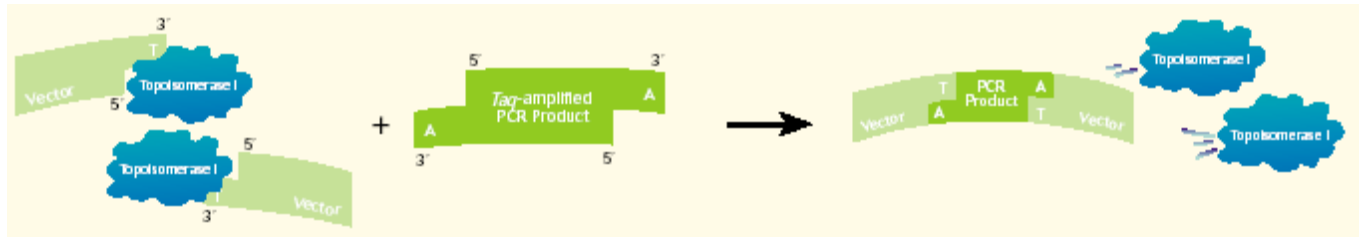


Abb. 24: Schematische Darstellung der Klonierung eines PCR-Produktes mit A-Überhang in den TOPO-Vektor mit T-Überhang (Invitrogen).

3.2.5.2 Site Mutagenesis

Zur gerichteten Mutation einer DNA-Sequenz bedient man sich der Methode der Site Mutagenesis, die ähnlich einer PCR durchgeführt wird. Es werden Primer verwendet, die der zu mutierenden Sequenz komplementär sind. An Stelle der für die PCR üblichen Taq-Polymerase wird hier eine Pfu-Polymerase verwendet, die die neu synthetisierte Nukleotidsequenz kontrolliert.

Es wurden mehrere Ansätze erstellt, die unterschiedliche Mengen DNA enthielten. Es wurde eine Primerkonzentration von 200 ng/μl gewählt. Das Mutagenesis 1-Programm enthält folgende Schritte:

| | | |
|------|------|---|
| 95°C | 30 s | Dieser Schritt trennt die beiden DNA-Stränge. |
|------|------|---|

| | |
|------|------|
| 95°C | 30 s |
|------|------|

| | |
|------|-------|
| 55°C | 1 min |
|------|-------|

| | |
|------|-------|
| 68°C | 2 min |
|------|-------|

| | |
|------|--|
| 37°C | bis zur Probenentnahme, wenn sich Verdau sofort anschließt |
|------|--|

Schritte 2-4 werden 18 × pro kb Plasmid durchgeführt.

Nach Beendigung des Programmes schließt sich eine Restriktion mit *Dpn* I an. Dieses Enzym verdaut bakterielles, methyliertes Plasmid. Das neu synthetisierte Plasmid trägt keine Methylierung, da es nicht bakteriellen Ursprungs ist und wird daher von dem Enzym nicht abgebaut.

3.2.5.3 Enzymatische Sequenzierung von DNA

(nach Sanger *et al.*, 1977)

Die Methode basiert auf der enzymatischen Synthese von DNA *in-vitro* (Sanger *et al.*, 1977). Hierfür wurde das “ABI PRISM™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Perkin Elmer) verwendet, das auf Reaktion der AmpliTaq DNA Polymerase FS aufbaut. Diese Polymerase wurde speziell für die Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten 2’3’-Didesoxynukleotiden (ddNTPS, bzw. N-Dye Terminator) entwickelt. Die AmpliTaq DNA Polymerase weist eine stark reduzierte Diskriminierung gegenüber dem Einbau von ddNTPs auf. Sie katalysiert in Gegenwart aller vier dNTPs und der vier fluoreszenzmarkierten ddNTPs die Polymerisation einer DNA mit der zur Matrize komplementären Sequenz. Während der in mehreren Zyklen ablaufenden Synthesereaktion kommt es durch Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Abbrüchen der Kettenpolymerisation. Die vier ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, daher kann in diesem System die Sequenzierungsreaktion in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Anschließend wurden die Sequenzier-Reaktionsansätze durch Äthanol-Fällung gereinigt und dann in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden die unterschiedlichen DNA-Fragmente am Ende des Gels über einen Laser detektiert und mit Hilfe der entsprechenden Software ausgewertet. Als DNA-Matrize wurden ca. 1,0 µg dsDNA in wässriger Lösung eingesetzt.

Reaktionsansatz:

4 µl Terminator Mix
1 µl Oligonukleotid (50 ng/µl)
x µl DNA (ca. 1,0 µg)
mit H₂O bidest auf 20 µl auffüllen
20 µl Mineralöl (Perkin Elmer)

Es wurde folgende PCR-Reaktion durchgeführt:

1. Vor dem ersten Zyklus: Denaturierung der DNA-Matrize bei 95°C, 5 min
2. Denaturierung: 95°C, 10 s
3. Annealing: 50°C, 5 s
4. DNA-Synthese: 60°C, 4 min
5. Anzahl der Zyklen: 25

Zur Reinigung des Reaktionsansatzes wurde eine Äthanol-Fällung durchgeführt und dazu zunächst das Mineralöl verworfen. Der Ansatz wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 50 µl 96 %igem Äthanol sowie 2 µl 3 M Natriumacetat versetzt und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 200 µl 70 %igem Äthanol gewaschen. Das Pellet wurde ca. 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 4 µl Formamid/EDTA-Probenpuffer resuspendiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben 2 min bei 95°C denaturiert und dann ca. 5 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss elektrophoretisch über ein Harnstoff-Acrylamidgel aufgetrennt. Dabei wurden mit einer Mikropipette pro Tasche 2 µl der Probe aufgetragen. Die genauen Beschreibungen des Sequenziergels und der Sequenzauswertung sind in der Gebrauchsanweisung des Herstellers aufgeführt und werden daher hier nicht näher erörtert.

3.2.6. DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung

3.2.6.1 Southern-Blot

Denaturierungslösung:

| | |
|------|-------|
| NaCl | 1,5 M |
| NaOH | 0,5 M |

Neutralisierungslösung:

| | |
|----------|-------|
| NaCl | 1,5 M |
| Tris/HCl | 0,5 M |
| (pH 8,0) | |

Eine häufig verwendete Methode zur Identifizierung von bestimmten DNA-Molekülen ist der Transfer (Blotting) von DNA-Fragmenten auf eine Membran (nach Southern, 1975). Für einen sogenannten „Southern-Blot“ schneidet man genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und trennt die Fragmente auf einem Agarose-Gel

elektrophoretisch auf. Auf das Gel legt man eine Membran und darüber mehrere Lagen Filterpapier. Durch den Kapillarfluss wird die DNA zur Membran transportiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Agarose-Gel für 45 min auf einem Schüttler in der Denaturierungslösung inkubiert, gefolgt von einer 45-minütigen Inkubation in der Neutralisierungslösung. Die DNA wurde über Nacht durch Kapillarfluss mit $20 \times \text{SSC}$ als Laufmittel auf eine Nylonmembran (Roche) transferiert. Die Membran wurde vorher mit Wasser befeuchtet und 30 min in $20 \times \text{SSC}$ geschwenkt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 5 min in $6 \times \text{SSC}$ inkubiert und 30 min zwischen Filterpapier (Whatman® 3 MM Filterpapier) getrocknet. Mit Bestrahlung von ultraviolettem Licht (3 min, 254 nm) wird die DNA auf der Nylonmembran fixiert.

3.2.6.2 DNA-Hybridisierung

Bei der Hybridisierung werden einzelsträngige DNA-Moleküle durch die Bindung mit spezifischen, markierten und einzelsträngigen DNA-Sonden lokalisiert. Die Schmelztemperatur T_m hängt unter anderem von dem GC-Gehalt der DNA-Sonde und der Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers ab (Sambrook *et al.*, 1989):

$$T_m = 81,5^\circ + 16,6 \log [\text{Na}^+] + 0,41 (\%G + \%C) - 0,63 (\% \text{Formamid}) - 600/n.$$

Idealerweise erfolgt die Hybridisierung etwa 15°C unterhalb des errechneten T_m -Wertes. Die Hybridisierung wurde bei 42°C unter Verwendung des Hybridisierungspuffers „DIG Easy Hyb“ (Roche) durchgeführt. Dafür wurden die Nylonmembranen in Hybridisierungsröhren für 30 min im Hybridisierungspuffer (20 ml/100 cm² Membran) bei 42°C vorhybridisiert. Zur Hybridisierung wurde die markierte DNA-Sonde (25 ng/ml Hybridisierungspuffer) denaturiert und in dem Hybridisierungspuffer (2,5 ml/100 cm² Membran) zu den Membranen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Hybridisierungs-Inkubator. Danach wurden die Membranen zwei Mal in $2 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS bei RT für 5 min und anschließend zwei Mal in $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS bei 42°C für 15 min gewaschen.

3.2.6.3 Nachweis markierter DNA

Puffer P1 (pH 7,5):

| | |
|-------------|--------|
| Maleinsäure | 0,10 M |
| NaCl | 0,15 M |

Puffer 2 :

10 % Blocking Reagenz (Roche) in Puffer 1

Puffer 3 (pH 9,5):

| | |
|-----------------------|-----------|
| 2 M Tris/HCl | 25 ml |
| 5 M NaCl | 10 ml |
| 1 M MgCl ₂ | 25 mM |
| Wasser | ad 500 ml |

Nach der Hybridisierung und dem Waschen wurden die Membranen für 1 min in Puffer 1 inkubiert und für 30 min in der Blockierungslösung (Puffer 2) geschwenkt. Die Membranen wurden für weitere 30 min mit in Puffer 2 verdünntem (1:1000) Anti-Dioxigenin-Antikörper-AP-Konjugat (Roche) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrmals mit Puffer 3 gewaschen. Jede Membran wurde in einer Plastikfolie eingeschweißt und 5 µl des Chemolumineszenzsubstrates CDP^{star} (Roche) in 1 ml Puffer 3 zugegeben. Nach etwa 1 min wurde die überschüssige Lösung entfernt. Zum Nachweis der Chemolumineszenz wurden Autoradiographie-Filme (Biomax, Kodak) verwendet, die bis zur gewünschten Signalstärke exponiert wurden.

3.2.7 Nachweis von Proteinen

3.2.7.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen während einer diskontinuierlichen Elektrophorese in einem vertikalen SDS-Polyacrylamidgel unter Verwendung des SDS-haltigen, diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystems nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Zu der die aufzutrennenden Proteine enthaltene Lösung wurde im Verhältnis 1:1 SDS-Probenpuffer mit Dithiothreitol (DTT) zugegeben und für 5 min bei 95°C erhitzt. Bedingt durch hydrophobe Bindungskräfte lagerten sich Natriumdodecylsulfat (SDS)-Ionen an die Polypeptide an. Zusätzlich wurden vorhandene Wasserstoffbrückenbindungen durch SDS und Disulfidbrücken durch DTT gespalten. Durch Anlagerung der SDS-Ionen an die denaturierten Proteine entstand ein Anion mit einheitlicher Nettoladung. Die Proteine wurden dadurch ausschließlich nach ihren unterschiedlichen Molekülmassen getrennt und ließen sich dadurch mit den Molekülmassen einer Mischung aus Markerproteinen vergleichen.

Zum Gießen des Gels wurde eine vertikale Zwei-Gelkammer verwendet. In einen Hohlraum, der durch 2 Abstandhalter zwischen zwei Glasplatten gebildet wurde, wird zunächst das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 6 cm gegossen. Das Trenngel wurde anschließend mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Zuletzt wurde in die noch flüssige Sammelgellösung der „Kamm“ eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in der Gelhalterung vertikal in den mit Elektroden versehenen Gelträger gestellt, in die Gelelektrophoresekammer überführt und diese mit Lauffpuffer gefüllt. Der „Taschenkamm“ wurde entfernt und das Gel mit den Proben beladen. Die elektrophoretische Proteinauftrennung begann nach Anlegen einer Spannung bei konstanter Stromstärke von 20 mA/Gel für 1 h. Nach Abschluss des Vorganges wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Das Trenngel wurde entweder für einen Western-Blot zum immunologischen Nachweis von Proteinen oder für eine Proteinfärbung mit Coomassie-Blue verwendet.

Pufferlösungen für SDS-Polyacrylamidgele:

Trenngel (10 %):

| | |
|-----------------------------------|---------|
| 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid | 5,00 ml |
| Tris/HCl, 1,5 M; pH 8,8 | 5,60 ml |
| SDS 10% | 0,15 ml |
| H ₂ O | 4,35 ml |

Das Trenngel enthielt je nach aufzutrennendem Protein 10 %, 12,5 % oder 15 %

Polyacrylamid. Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von 50 µl Ammoniumpersulfat (APS; 100 mg/ml) und 10 µl N,N,N',N'-tetrametylendiamin (TEMED) pro 15 ml Gellösung gestartet.

Sammelgel (5%):

| | |
|-----------------------------------|---------|
| 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid | 0,50 ml |
| Tris/HCl, 1 M; pH 6,8 | 625 µl |
| SDS 10 % | 50 µl |
| H ₂ O | 3,85 ml |

Laufpuffer:

| | |
|------------------|--------|
| Tris/HCl 100 mM | 250 ml |
| Glycin 1 M | 200 ml |
| SDS 10 % | 10 ml |
| H ₂ O | 540 ml |

Probenpuffer (2-fach) :

| | |
|------------------------------------|---------|
| Tris/HCl, 1M; pH 6,8 | 1,88 ml |
| SDS 10 % | 6,00 ml |
| Glycerin | 3,00 ml |
| H ₂ O | 2,12 ml |
| 1,5 M DTT/0,1 %BPB, bzw. BPB 0,1 % | 2,00 ml |

Das Sammelgel enthielt 5 % Polyacrylamid. Die Polymerisierung erfolgte durch Zugabe von 25 µl APS und 5 µl TEMED.

3.2.7.2 Proteinfärbung mit Coomassie Blau

Die durch Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Blau im Polyacrylamidgel sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel für 20 min in der Färbelösung auf einem Kippschüttler inkubiert. Das Gel wurde im Anschluss daran für 20 min in die Entfärbelösung 1 überführt, welche anschließend durch die Entfärbelösung 2 für weitere 20 min ersetzt wurde.

Um Reste der Entfärbelösung zu entfernen und das Reißen des Gels während des Trocknungsvorganges zu vermeiden, wurde das Gel in Wasser überführt und mindestens 1 h inkubiert. Zur späteren Dokumentation der Ergebnisse wurde das Gel 2 h zwischen 2 Zellophan-Folien getrocknet.

Färbelösung:

| | |
|--|-----------|
| Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck) | 0,6 mg |
| Äthanol | 250 ml |
| Eisessig | 100 ml |
| H ₂ O | ad 600 ml |

Entfärbelösung 1:

| | |
|------------------|------|
| Äthanol | 35 % |
| Essigsäure | 10 % |
| H ₂ O | 55 % |

Entfärbelösung 2:

| | |
|------------------|------|
| Äthanol | 10 % |
| Essigsäure | 10 % |
| H ₂ O | 80 % |

3.2.7.3 Western-Blot

(nach Towbin *et al.*, 1979)

Der Western-Blot dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen. Proteine sind im Gel aus folgenden Gründen schwer zu handhaben: 1. wegen der Konsistenz des Gels, 2. der Diffusion der Proteine (die durch die Elektrophorese erreichte Auftrennung geht verloren) und 3. der Verteilung der Proteine über die gesamte Dicke des Gels (~1mm dick, die Proteine sind damit für einen Nachweis eventuell zu niedrig konzentriert). Im Western Blot werden die Proteine durch den elektrischen Strom aus dem Gel auf eine stabile, dünne Membran (z.B. Polyvinylidendifluorid, Nitrocellulose) transferiert. Die spezielle Oberfläche dieser Membran hält die Proteine an dieser Stelle fest und ist zudem in der Lage, große Mengen an Protein aufzunehmen.

Nach der Proteintrennung in der SDS-Gelelektrophorese wurde eine PVDF-Membran der Größe des Trenngels angepasst. Die Nitrocellulosemembran und 12 Lagen Filterpapier wurden kurz in den Transferpuffer gelegt und befeuchtet. Das Filterpapier wurde in die Blot-Kammer überführt und mit der Membran bedeckt. Auf die Membran wurde das Trenngel mit den darin enthaltenen Proteinen gelegt und mit weiteren 6 Lagen Filterpapier in Transferpuffer überschichtet. Es wurde nun nach der „semi-dry“ Methode bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA/Blot für 2 h geblottet.

Nach Abschluss des Blotvorganges wurde die Blotmembran mit Ponceau S (0,1% Ponceau in 1% Essigsäure) gefärbt. Mit dieser Färbung lassen sich Proteine unspezifisch sichtbar machen. Dazu wurde die Membran in Ponceau S-Lösung ca. 1 min. geschwenkt, anschließend mit dH₂O entfärbt und die durch Entfärbung sichtbar werdenden Banden des Markers mit Bleistift markiert. Um freie, unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu

sättigen, wurde diese in einer Blockierlösung (10 % BSA, in PBS def. + 0,05 % Tween) inkubiert. Wahlweise kann diese Milchpulver oder BSA enthalten. Diese Inkubation kann auch über Nacht erfolgen. Die Lösung wurde abgegossen und durch die Primärantikörperlösung ersetzt. Die Komponenten dieser Lösung können ebenso wie die Antikörperkonzentration und die Inkubationszeit je nach Antikörper variieren. Anschließend wurde die Membran wiederholt mit PBS def. und PBS def. mit Tween 0,05 %, jeweils fünf Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur gewaschen. Nun wurden 10 ml der Sekundärantikörperlösung aufgetragen und, ebenfalls Antikörper-abhängig, mindestens 2 h schüttelnd bei RT inkubiert.

Die Membran wurde im Anschluss drei Mal je 5 min mit PBS Tween 0,05% und PBS def. gewaschen. Es wurde nun 1ml einer Chemolumineszenz-Lösung aufgetragen und je nach Blot entweder das Kit Super Signal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate oder das Kit Super Signal[®] West Extended Duration Substrate verwendet. Diese Lösung besteht zu gleichen Teilen aus einer Peroxid-Lumineszenz-Mischung (500 µl) und einem Peroxidstabilitätspuffer (500 µl). Die Chemolumineszenz-Lösung wurde kurz auf der Membran belassen, diese in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette befestigt. Ein Röntgenfilm (Kodak oder Hyperfilm[™] Amersham Biosciences) wurde aufgelegt und bei geschlossener Kassette belichtet. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine (Optimax[®] 2010) entwickelt. Die Belichtungszeit kann abhängig von der Schwärzung des Films variiert werden.

Transferpuffer:

| | |
|----------|----------|
| Tris/HCl | 50 mM |
| Glycin | 40 mM |
| SDS | 0,0375 % |
| Methanol | 20 % |

Blockierlösung:

| | |
|--------------------|--------|
| BSA | 10 % |
| Tween 20 | 0,05 % |
| In PBS def. gelöst | |

Primärantikörperlösung:

| | |
|--------------------|--------|
| BSA | 1 % |
| Tween 20 | 0,05 % |
| In PBS def. gelöst | |

Sekundärantikörperlösung:

| | |
|--------------------|--------|
| Milchpulver | 1 % |
| Tween 20 | 0,05 % |
| In PBS def. gelöst | |

Waschlösung 1:

| | |
|--------------------|--------|
| Milchpulver | 1 % |
| Tween 20 | 0,05 % |
| In PBS def. Gelöst | |

Waschlösung 2:

| | |
|--------------------|--------|
| Tween 20 | 0,05 % |
| In PBS def. gelöst | |

3.2.8 Computer-Software

Die Berechnung potentieller Transmembrandomänen erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes DAS Transmembrane Prediction Server (Cserzo et al. 1997).

Zur Berechnung der möglichen Protein-Sekundärstruktur aus der Aminosäuresequenz wurde das Programm "the PSIPRED protein structure prediction server" (McGuffin et al. 2000) genutzt.

Um einen Sequenzvergleich und die Abschätzung der Identität auf Aminosäureebene zu berechnen, wurde das Programm „Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" (Corpet, 1988) verwendet.

Mit Hilfe des Programmes "Prediction of Signal Sequences- PSORT Prediction" (McGeoch, 1985) konnte eine mögliche Signalsequenz identifiziert werden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Erstellung einer *P. falciparum*-Mutante mit Gst/Flag-markiertem DPM1-Protein

4.1.1 Charakterisierung der Dol-P-Man-Synthase von *P. falciparum* und Vergleich mit anderen Organismen

Lange Zeit waren lediglich die Sequenzen des DPM1-Gens von *S. cerevisiae* (Orlean *et al.* 1988), *S. pombe*, *H. sapiens* (Colussi *et al.*, 1988), *C. briggsiae* (Colussi *et al.*, 1988), *U. maydis* (Zimmerman *et al.*, 1996), *T. brucei* (Mazhari-Tabrizi *et al.*, 1996), *L. mexicana* (Ilgoutz *et al.*, 1999) und *T. reesei* (Kruszewska *et al.*, 2000) bekannt. Erst 2002 gelang es, auch die Sequenzen des DPM1-Gens von *P. falciparum* zu bestimmen (Delorenzi *et al.*, 2002). Ein erster Zugang zur Isolierung und Charakterisierung der Dol-P-Man-Synthase dieses Parasiten erfolgte über die computergestützte Analyse der *P. falciparum*-EST-Datenbank. Für die Analysen dieser EST-Daten wurde das Sanger Information BLAST Server Computerprogramm (http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/) verwendet.

Die EST-Daten wurden mit den Sequenzen des DPM1-Gens von *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *S. pombe* und *T. brucei* verglichen. Die Identitäten auf Aminosäureebene sind in Tab. 2 dargestellt.

DPM1 von *Plasmodium falciparum* ist ein hochkonserviertes Protein, bestehend aus 259 Aminosäuren, wobei das DPM1-Gen auf Chromosom 11 lokalisiert werden konnte. Es enthält keine Introns. Eine Unsicherheit jedoch betrifft die Transkriptions-Startstelle, da zwei AUG-Codons identifiziert werden konnten.

DPM2 wurde in einigen Organismen der DPM-Synthase-Klasse 2 (*H. sapiens*, *S. pombe*) als Protein identifiziert, welches die Übertragung der Mannose-Einheiten von Dolichol-Phosphat durch Stabilisierung der katalytischen Einheit DPM1 ermöglicht. Ein dem DPM2-Gen homologes Gen konnte zum Beispiel in *S. cerevisiae* nicht gefunden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es einige Organismen gibt, die nicht auf eine DPM2- Untereinheit angewiesen sind (s. auch Einleitung, Kapitel 1.10 „Dolichol-Phosphat-Mannose“).

4.1.1.2 Gegenüberstellung des DPM1-Proteins von *P. falciparum* und *S. cerevisiae*

| | <i>P. falciparum</i> -DPM1-Protein | Hefe-DPM1-Protein |
|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Aminosäuren | 259 | 267 |
| Molekulargewicht | 30,1 kDa | 30,6 kDa |
| Isoelektrischer Punkt | 8,81 | 7,97 |
| Ladung | 4 | 1 |
| C-terminale Transmembran- domäne | 0 | 1 |

Tabelle 1: Sequenzanalyse der von dem DPM1-Gen abgeleiteten Aminosäuresequenz aus *P. falciparum* im Vergleich zu dem Homolog aus *S. cerevisiae*

Die computergestützte Analyse erfolgte mit dem Programm HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources).

(http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/biounit/databases_husar.html)

4.1.1.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenz des DPM1-Gens von *P. falciparum*

```

          10              30              50
          .              .              .
ATGGTTATTTCGATTTTTCTGTGTTGTCATTACACTCTTAGGCTTATGCATAAAATATGGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCAATAAGCTAAAAAGGACAAACAGTAATGTGAGAATCCGAATACGTATTTATAACCAC
M V I R F F L F V I T L L G L C I N M V

          70              90              110
          .              .              .
TGTTGTAATTTTAAATATTTCGATTATATTACCTACTTACAATGAAAAAGAAAACCTTACCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAACATTAATAATTTATAAGCTAATATAATGGATGAATGTTACTTTTTCTTTTGAATGGT
C C N F K Y S I I L P T Y N E K E N L P

```

```

130                               150                               170
.                               .                               .
TATCTTATTTATATGATAATTGATGAATTAATAAACATGAAATTAATTTGAAATAATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAGAATAAATATACTATTAATACTACTTAATTTATTTGTACTTTAATTTAAACTTTATTAA
Y L I Y M I I D E L N K H E I K F E I I

190                               210                               230
.                               .                               .
GTAATAGATGATAATAGTCAAGATGGTACTGCAGATGTGTACAAAAAGTTACAAAACATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CATTATCTACTATTATCAGTTCTACCATGACGTCTACACATGTTTTTCAATGTTTTGTAA
V I D D N S Q D G T A D V Y K K L Q N I

250                               270                               290
.                               .                               .
TTTAAGGATGAAGAATTATTATTAATACAAAGAAAAGGAAAATTAGGGTTAGGTTCTGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATTCCTACTTCTTAATAATAATTATGTTTTCTTTTCTTTTAAATCCCAATCCAAGACGT
F K D E E L L L I Q R K G K L G L G S A

310                               330                               350
.                               .                               .
TATATGGAAGGTTTAAAAAATGTAACAGGAGATTTTGTATAATAATGGATGCTGATTTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATATACCTTCCAAATTTTTTACATTGTCCTCTAAAACAATATTATTACCTACGACTAAAT
Y M E G L K N V T G D F V I I M D A D L

370                               390                               410
.                               .                               .
TCACATCATCCTAAATATATTTATAACTTTATTAATAAAAAACAAGAGAAAAAAATTTGTGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTGTAGTAGGATTTATATAAATATTGAAATAAATTTTTTGTCTCTTTTTTTAACACTG
S H H P K Y I Y N F I K K Q R E K N C D

430                               450                               470
.                               .                               .
ATTGTCACAGGCACAAGATATAAGAACCAAGGTGGAATATCAGGATGGTCATTTAATAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACAGTGTCCGTGTTCTATATTCTTGGTTCCACCTTATAGTCCTACCAGTAAATTTATCT
I V T G T R Y K N Q G G I S G W S F N R

490                               510                               530
.                               .                               .
ATTATAATAAGTAGAGTAGCAAATTTTTTAGCTCAATTTCTATTATTTCATTAATCTATCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATATTATTTCATCTCATCGTTTTAAAAAATCGAGTTAAAGATAATAAGTAATTAGATAGT
I I I S R V A N F L A Q F L L F I N L S

550                               570                               590
.                               .                               .
GATTTAACCGGGTCTTTTAGATTATATAAAACTAATGTACTGAAGGAACTTATGCAATCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAAATTGGCCCAGAAAATCTAATATATTTTTGATTACATGACTTCCTTGAATACGTTAGA
D L T G S F R L Y K T N V L K E L M Q S

610                               630                               650
.                               .                               .
ATTAATAATACAGGTTATGTTTTTCAAATGGAAGTTCTTGTAAGAGCATATAAAATGGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATTATTATGTCCAATACAAAAGTTTACCTTCAAGAACATTCTCGTATATTTTACCCCT
I N N T G Y V F Q M E V L V R A Y K M G

```

```

        670                690                710
        .                .                .
AAATCTATAGAAGAAGTTGGTTACGTTTTTGTGGATAGATTATTTGGAAAAATCAAAACTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTAGATATCTTCTTCAACCAATGCAAAAACAACCTATCTAATAAACCTTTTAGTTTTGAC
K S I E E V G Y V F V D R L F G K S K L

        730                750                770
        .                .                .
GAAACTACAGATATTTTACAATACTTATCAGGTCTTTTCAAGTTATTCTGGTCAATA
-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTGATGTCTATAAAATGTTATGAATAGTCCAGAAAAGTTCAATAAGACCAGTTAT
E T T D I L Q Y L S G L F K L F W S I
    
```

Abb. 25: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des DPM1-Gens von *P. falciparum*: Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des rekonstruierten DPM1-Gens von *P. falciparum*. Für die abgeleitete Aminosäuresequenz ist der Ein-Buchstaben-Code angegeben.
 HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources).

4.1.1.4 Mögliche Sekundärstruktur des DPM1 Proteins von *S. cerevisiae*

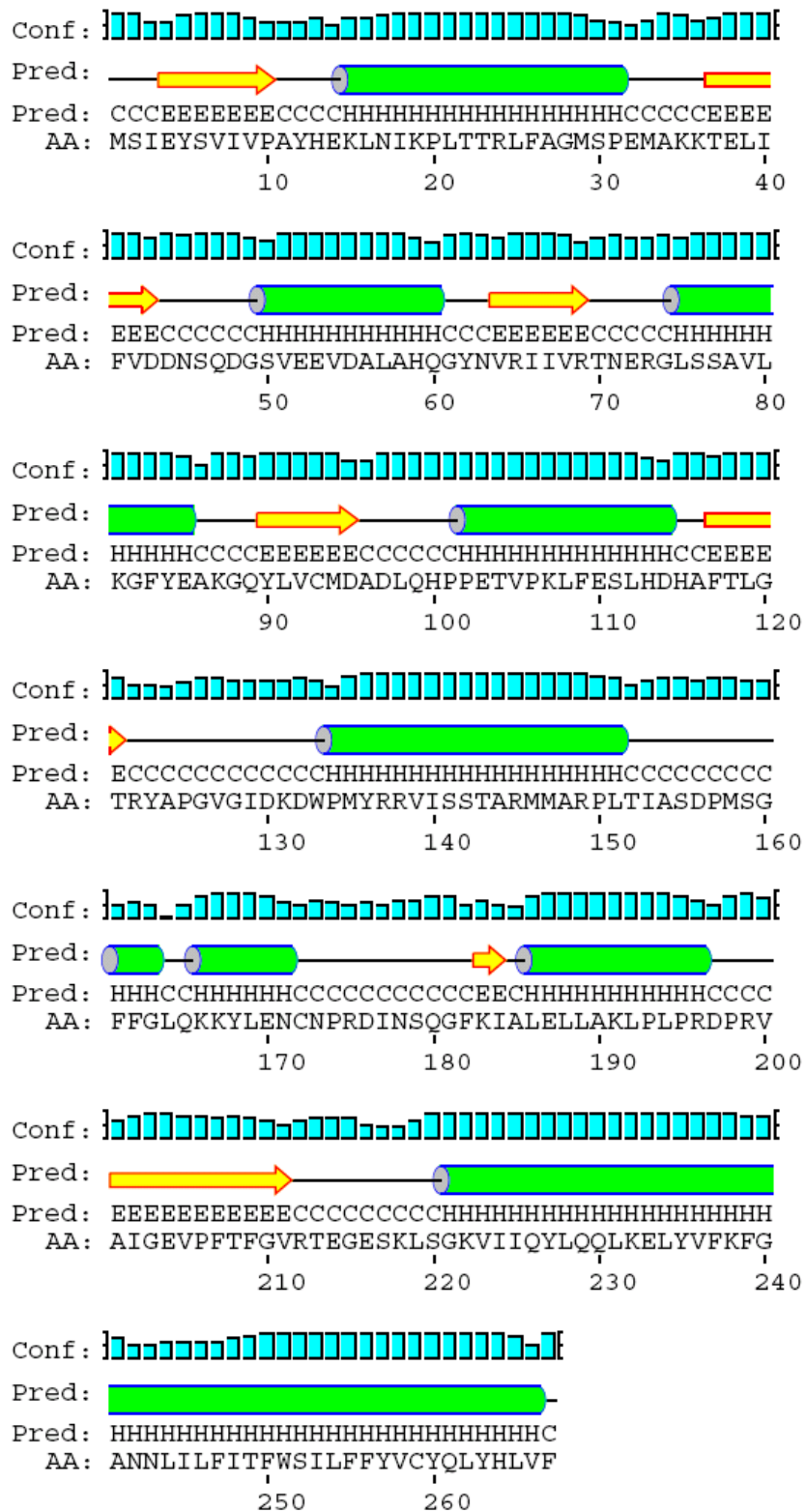


Abb. 26: Vorhersage der möglichen Sekundärstruktur des DPM1-Proteins von *S. cerevisiae*.
 Die Vorhersage wurde mit Hilfe computergestützter Analysen des PSIPRED Servers durchgeführt. (McGuffin et al. 2000) The PSIPRED protein structure prediction server. (Legende s.u.)

4.1.1.5 Mögliche Sekundärstruktur des DPM1-Proteins von *Plasmodium falciparum*

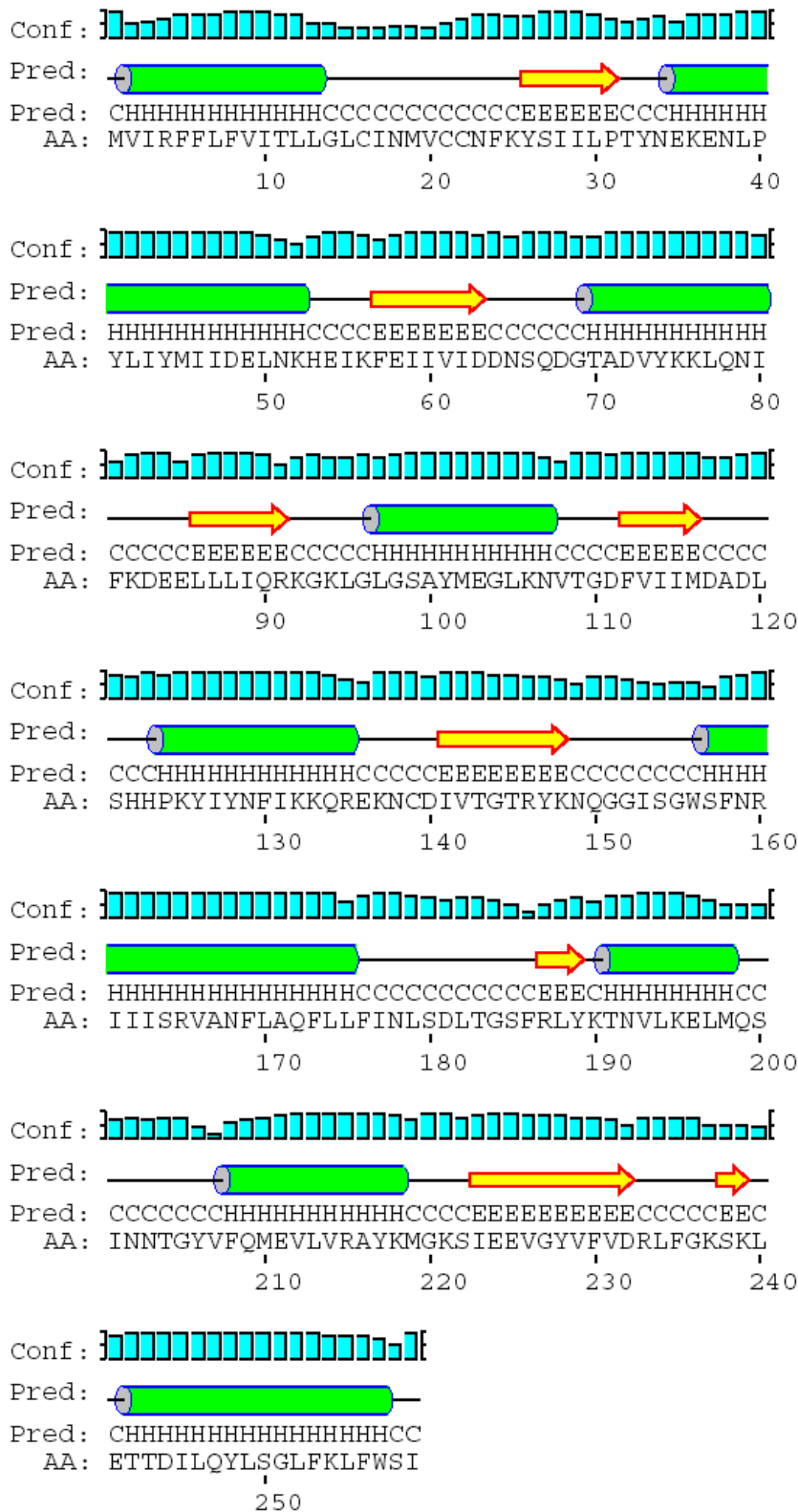
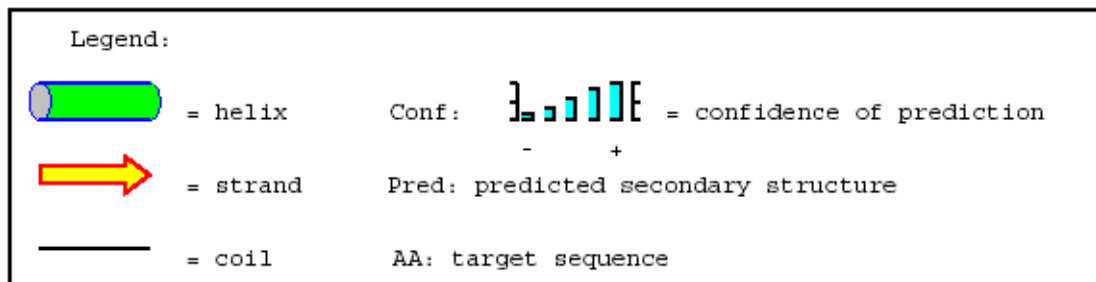


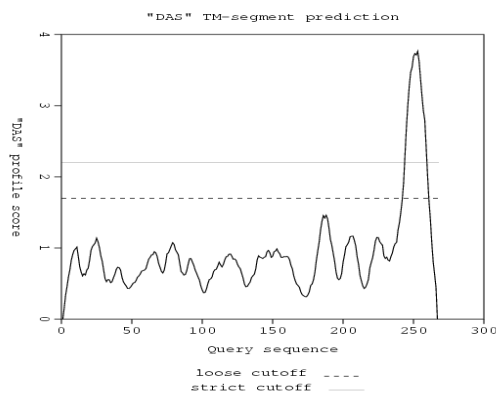
Abb. 27: Vorhersage der Sekundärstruktur des Proteins DPM1 von *Plasmodium falciparum* (McGuffin et al. 2000) The PSIPRED protein structure prediction server.

Die mögliche Sekundärstruktur wurde für beide Proteine, DPM1 von *P. falciparum* und *S. cerevisiae*, von der Aminosäuresequenz abgeleitet und durch computergestützte Analyse mit Hilfe des PSIREN protein structure prediction servers ermittelt. Da bisher noch keine Kristallisationsstudien mit einem ähnlichen Protein erfolgten, konnte für keines der beiden Proteine eine 3D-Struktur berechnet und gezeigt werden. Die Vorhersage beschränkt sich somit auf das mögliche Vorliegen von β -Faltblattstrukturen (hier gelb dargestellt), α -Helices (grün unterlegt) und Coils (schwarz). Die türkis unterlegten Markierungen zeigen die Zuverlässigkeit der Vorhersage (s. Legende).

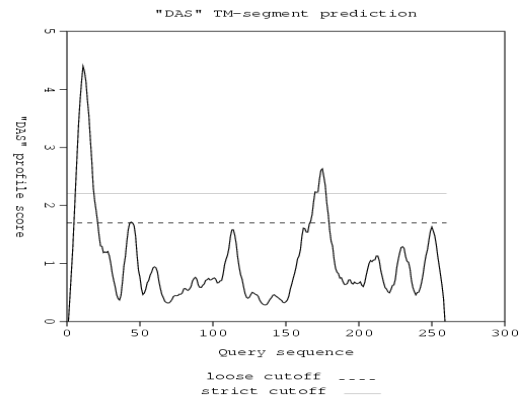


4.1.1.6 Vergleich potentieller Transmembrandomänen zwischen dem DPM1-Protein von *S. cerevisiae*, *P. falciparum*, *T. brucei* und mit Gst/Flag modifiziertem PfDPM1

A *S. cerevisiae*



B *P. falciparum*



Potential transmembrane segments

| Start | Stop | Length | ~ | Cutoff |
|-------|------|--------|---|--------|
| 5 | 21 | 17 | ~ | 1.7 |
| 6 | 18 | 13 | ~ | 2.2 |
| 44 | 44 | 1 | ~ | 1.7 |
| 167 | 179 | 13 | ~ | 1.7 |
| 170 | 177 | 8 | ~ | 2.2 |

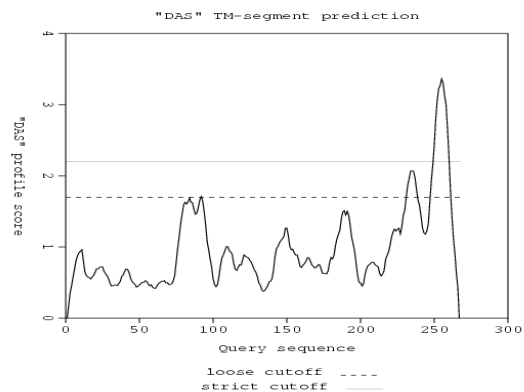
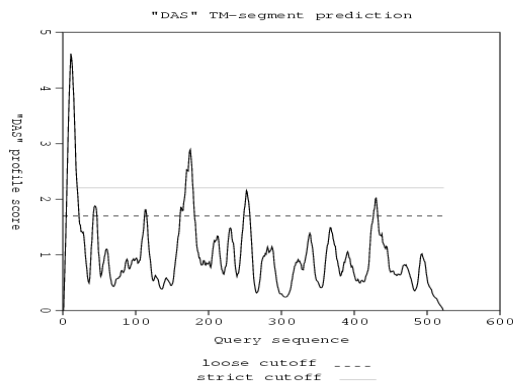
Abb. 28: Potentielle Transmembrandomänen des DPM1-Proteins von *S. cerevisiae* und *P. falciparum* im Vergleich

Mit Hilfe des Computerprogramms DAS Transmembrane Prediction Server wurden potentielle Transmembrandomänen des ScDPM1-Proteins und des PfDPM1-Proteins ermittelt (Cserzo et al. 1997).

Deutlich sichtbar wird im Vergleich zu ScDPM1 das Fehlen einer C-terminalen Transmembrandomäne des PfDPM1-Proteins, die für die Synthasegruppe von *S. cerevisiae* charakteristisch ist. Die Sequenz des PfDPM1-Proteins wurde ebenfalls mit Hilfe des Computerprogrammes „Prediction of Signal Sequences-PSORT Prediction“ untersucht. Diese Analyse ergab eine mögliche abspaltbare Signalsequenz am N-Terminus, hier als Transmembrandomäne dargestellt, die möglicherweise als ER-Signalsequenz fungiert. Eine N-terminale Signalsequenz fehlt beim Hefeprotein. Die Transmembrandomäne des parasitären Proteins zwischen den Aminosäuren 150-200 könnte eine Erklärung für die fehlenden Untereinheiten DPM2 und DPM3 liefern: Eventuell ist das Enzym durch diese Domäne in der Lage, sich selbst in der ER-Membran zu verankern, so dass keine weiteren Einheiten zur Stabilisierung benötigt werden.

A *P. falciparum* mit Gst und Flag

B *T. brucei*



Potential transmembrane segments

| Start | Stop | Length | ~ | Cutoff |
|-------|------|--------|---|--------|
| 5 | 22 | 18 | ~ | 1.7 |
| 6 | 19 | 14 | ~ | 2.2 |
| 42 | 46 | 5 | ~ | 1.7 |
| 113 | 115 | 3 | ~ | 1.7 |
| 161 | 180 | 20 | ~ | 1.7 |
| 169 | 178 | 10 | ~ | 2.2 |
| 249 | 256 | 8 | ~ | 1.7 |
| 427 | 432 | 6 | ~ | 1.7 |

Abb. 29: Potentielle Transmembrandomänen des modifizierten DPM1 Proteins von *Plasmodium falciparum* mit Flag und Gst und des humanpathogenen Parasiten *T. brucei*

Auch für diese Vorhersage wurde das Computerprogramm „DAS Transmembrane Prediction Server“ zur Berechnung möglicher Transmembrandomänen genutzt. Deutlich sichtbar wird hier bei dem modifizierten PfDPM1-Protein das Vorliegen von drei weiteren möglichen Transmembrandomänen an der Aminosäureposition 169 bis 178, 249 bis 256 und 427 bis 432 im Vergleich zu dem nicht veränderten PfDPM1-Protein. Diese Transmembrandomänen werden von der Markersequenz Gst/Flag verursacht. Möglicherweise interagiert diese Sequenz mit dem hydrophilen PfDPM1-Protein derart, dass die Enzymaktivität behindert wird.

Bei Betrachtung der potentiellen Transmembrandomänen des DPM1-Proteins von *T. brucei* wird im Vergleich zu *P. falciparum* die C-terminale hydrophobe Sequenz sichtbar, die wahrscheinlich die Transmembrandomäne darstellt. Diese Abbildung verdeutlicht, dass sich die Dol-P-Man-Synthasen von humanpathogenen Parasiten in ihrem Aufbau deutlich unterscheiden.

4.1.1.7 Vergleich potentieller posttranslationeller Modifizierungen des DPM1-Proteins von *S. cerevisiae* und *P. falciparum*

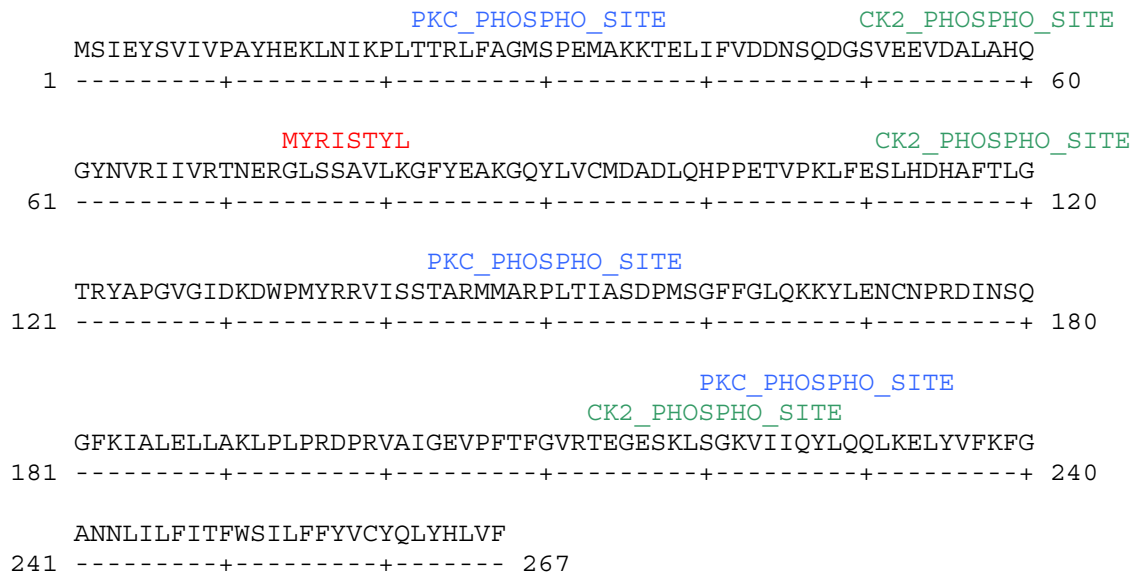


Abb. 30: Potentielle posttranslationale Modifikationen des DPM1-Proteins von *S. cerevisiae*
 Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes HUSAR erstellt.



Abb. 31: Potentielle posttranslationale Modifikationen des DPM1-Proteins von *P. falciparum*. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes HUSAR erstellt.

4.1.2 Expression des Gst/Flag markierten DPM1-Proteins in *P. falciparum*

4.1.2.1 Das Expressionssystem in *P. falciparum*

Um die Dol-P-Man-Synthase von *Plasmodium falciparum* untersuchen zu können, wurden zwei verschiedene Expressionssysteme angewendet.

Die Transfektion von *P. falciparum* ist ein sehr ineffizienter, langwieriger, bis zu mehreren Monaten dauernder Prozess, und bis heute treten bei einem Gen-Knockout- oder Gen-Replacement-Experiment in *Plasmodium falciparum* mehrere Schwierigkeiten auf. Um eine Selektion gewünschter Parasiten zu erreichen, werden der Kultur verschiedene Medikamente zugesetzt. Parasitenmutanten, die ein entsprechendes Resistenzgen korrekt in ihr Genom integriert haben, werden gegen die Selektions-Drugs unempfindlich und überleben, während nicht mutierte Parasiten absterben. Falls die Selektion zu früh abgebrochen wird, können alle Plasmide verloren sein, bevor die Integration in das Parasitengenom stattfand. Wird das Medikament zu früh nach der Transfektion appliziert, könnten Parasiten, die noch freies Plasmid tragen, im Vorteil gegenüber Plasmodien mit bereits integrierter DNA sein, da sie möglicherweise mehrere Kopien des Resistenz-Gens besitzen (Kadekoppala *et al.*, 2001; O'Donnell *et al.*, 2001) oder weil die Modifikation am Zielgen zu einem Nachteil im Wachstum führt.

Um die langen Wartezeiten zu verkürzen, entwickelten Wang *et al.* (2002) ein Transfektionssystem, in dem korrekt mutierte Plasmodien positiv durch die Expression einer Antibiotikaresistenz selektiert werden können, selbst im Hinblick auf die Möglichkeit eines Wachstumsnachteils. Das Modell von Wang *et al.* 2002 wurde im ersten Projekt übernommen, um nähere Erkenntnisse über PfDPM1 zu gewinnen und das Enzym einer Dol-P-Man-Synthase-Gruppe zuordnen zu können.

4.1.2.2 Der Expressionsvektor pGTPneo46

(s. auch Material und Methoden)

Der Vektor zur Expression des mit Flag und Gst markierten DPM1-Proteins trägt drei Resistenzgene: Ein Blasticidin-Resistenzgen steht unter der Kontrolle eines Plasmodien-Calmodulin-Promoters, 5'Cam, der in dem Plasmid enthalten ist. Die Expression dieses Gens ist bereits nach Aufnahme des Plasmids möglich. Ein Neomycin-Resistenzgen kann nur exprimiert werden, wenn das seltene Ereignis einer homologen Rekombination in das Genom des Parasiten stattfindet und das ganze Fragment unter der Kontrolle eines endogenen

Promoters steht. Ein zusätzliches Ampicillin-Resistenzgen soll die Klonierung des Fragmentes und die Selektion in *E. coli* erleichtern.

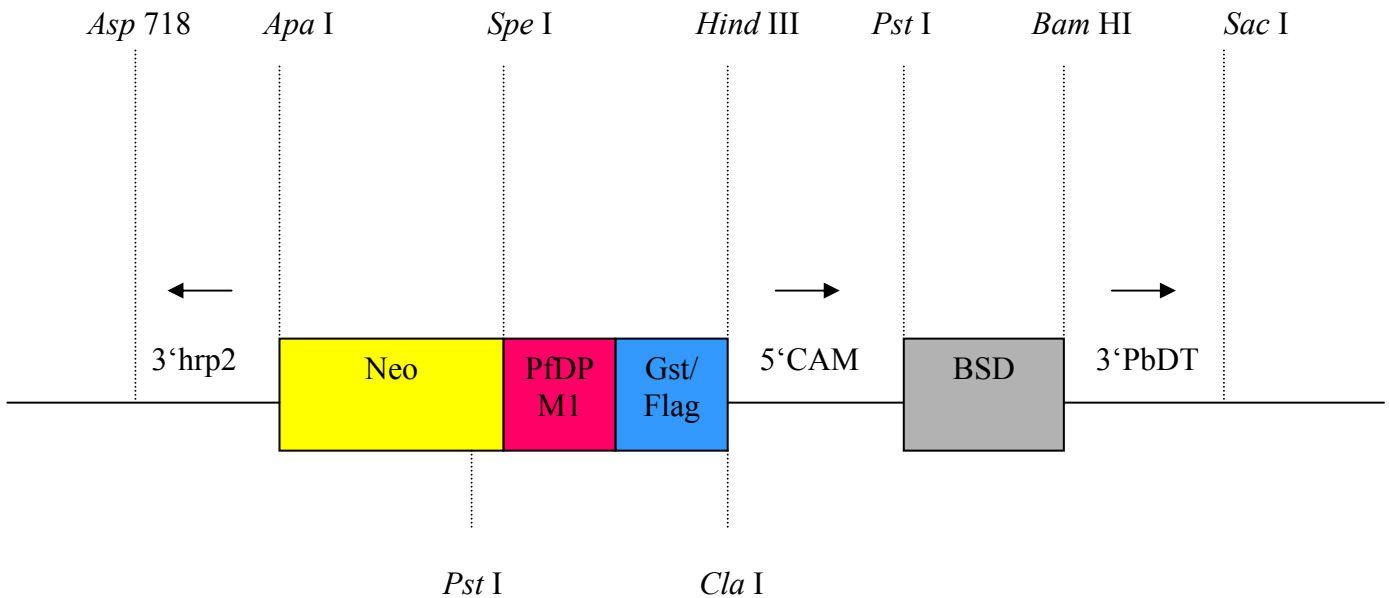


Abb. 32: Schematische Darstellung des Vektors pGTPneo46 (Wang *et al.*, 2002)

Das Blasticidin-Resistenzgen steht unter der Kontrolle eines 5'Cam-Promoters, so dass die Expression dieser Resistenz bereits nach Aufnahme des Plasmides möglich ist. Das Neomycin-Resistenzgen kann nur nach homologer Rekombination des markierten PfDPM1-Gens mit dem endogenen Gen exprimiert werden. Beide Wirkstoffe, Blasticidin und Neomycin können demnach zur Selektion der mutierten Parasiten verwendet werden.

4.1.2.3 Zwischenklonierung des PfDPM1-Gens in den pCR[®]TOPO[®]-Vektor

Zunächst wurde das DPM1-Gen aus dem Genom von *Plasmodium falciparum* mit einer PCR amplifiziert. Durch die spezifische Bindung der Primer an das gesuchte Gen, sollte nur dieses vervielfältigt werden. Dafür wurden die Schnittstellen *Hind* III und *Spe* I gewählt. Die anschließende Ligation in den TOPO-Vektor wurde durch den synthetisierten A-Überhang der Taq-Polymerase erleichtert. Schließlich wurde das amplifizierte Produkt, PfDPM1, in TOPO in *E. coli* (XL blue competent cells) chemisch transformiert und der Transformationsansatz ausplattiert. Um die Auswahl der Klone mit korrektem Insert zu erleichtern, wurden Platten mit Ampicillin-Resistenz verwendet und diese mit je 40 µl X-Gal und IPTG behandelt. Klone mit richtigem Insert färbten sich durch Unterbrechung des lacZ α -Gens weiß, während Klone mit leerem/ohne Plasmid blaue Färbung zeigten (s. auch Material

und Methoden). Um die angezüchteten Klone zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau mit *Eco* RI durchgeführt, ein Enzym, welches in dem TOPO-Vektor je eine Schnittstelle kurz vor und kurz nach der Insertionsstelle hat. Klon 1 mit Insert wurde angezüchtet und durch erneuten Restriktionsansatz mit *Hind* III und *Spe* I überprüft. Gleichzeitig wurde Klon 1 sequenziert.

Da das Gen PfDPM1 nach der Transfektion und Selektion in Plasmodiumkultur näher untersucht werden sollte, musste eine Markierung mit Hilfe von Sequenzen erfolgen, die für ein Protein kodieren, das ein Antikörper in späteren Experimenten erkennt. Die Wahl fiel hier auf eine Kombination aus einer Gst- und einer Flag-Sequenz. Gegen beide Proteine sind Antikörper vorhanden, und ein Western-blot mit diesem System bereits etabliert.

4.1.2.4 Klonierung von Gst und Flag-markiertem PfDPM1 in pGTPneo46

Das Plasmid wurde mit den Enzymen *Hind* III und *Spe* I geöffnet, die vorhandene DS/PK-Sequenz somit entfernt und anschließend dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu verhindern. Das Gst/Flag-Fragment trug die Schnittstellen *Spe* I und *Xba* I und sollte mit der *Xba* I-Stelle an die *Spe* I-Stelle des Plasmids ligieren, welche kompatibel sind. Über *Spe* I sollte die Ligation an PfDPM1 erfolgen, welches wiederum über *Hind* III an die *Hind* III Schnittstelle des Plasmids binden sollte. Für die Ligation beider Konstrukte in das pGTPneo46-Plasmid stellte sich nun folgendes Problem: Durch die Kompatibilität von *Xba* I mit *Spe* I ergaben sich folgende Möglichkeiten der Ligation:

1. Nur das PfDPM1-Gen ligiert in das Plasmid
2. Die Gst/Flag-Sequenz liegt in falscher Orientierung vor und die Expression kann nicht stattfinden
3. Das erwünschte Ergebnis, PfDPM1 mit Gst/Flag in korrekter Orientierung

Die erste Überprüfung des Konstruktes erfolgte mit einer Restriktion durch die Enzyme *Hind* III und *Sal* I, da die Gst-Sequenz eine *Sal* I-Schnittstelle kurz vor der *Xba* I-Stelle aufweist. Im erwünschten Falle wird dabei ein Fragment von 1,5 kb ausgeschnitten, da sowohl die Gst/Flag-Sequenz als auch PfDPM1 jeweils eine Größe von 750 Basenpaaren haben. Die erhoffte Ligation an der Stelle *Xba* I und *Spe* I kann durch *Spe* I-Restriktion nicht wieder eröffnet werden.

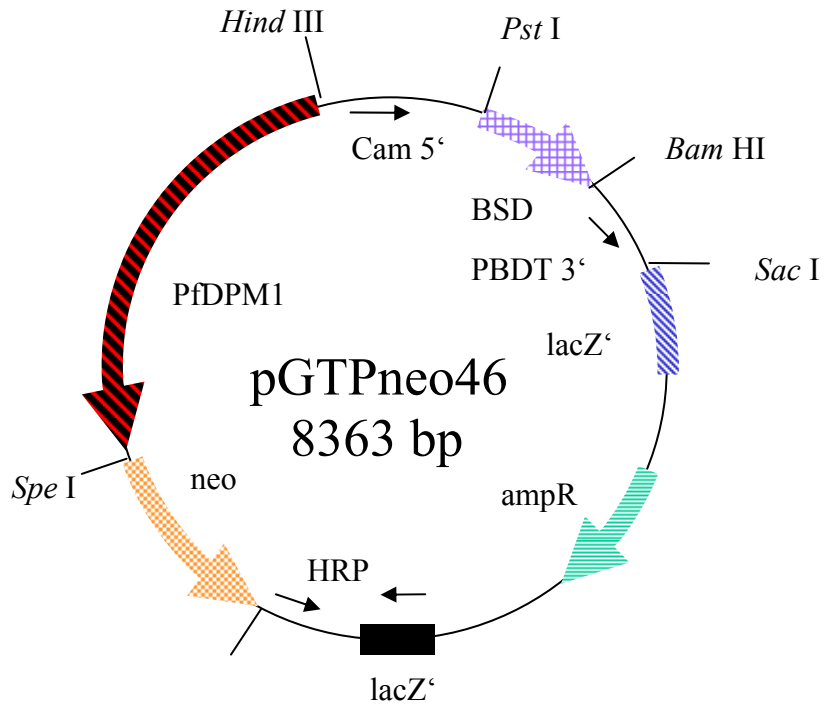


Abb. 33: Erste Möglichkeit, lediglich das PfDPM1 –Gen ligiert in das Plasmid

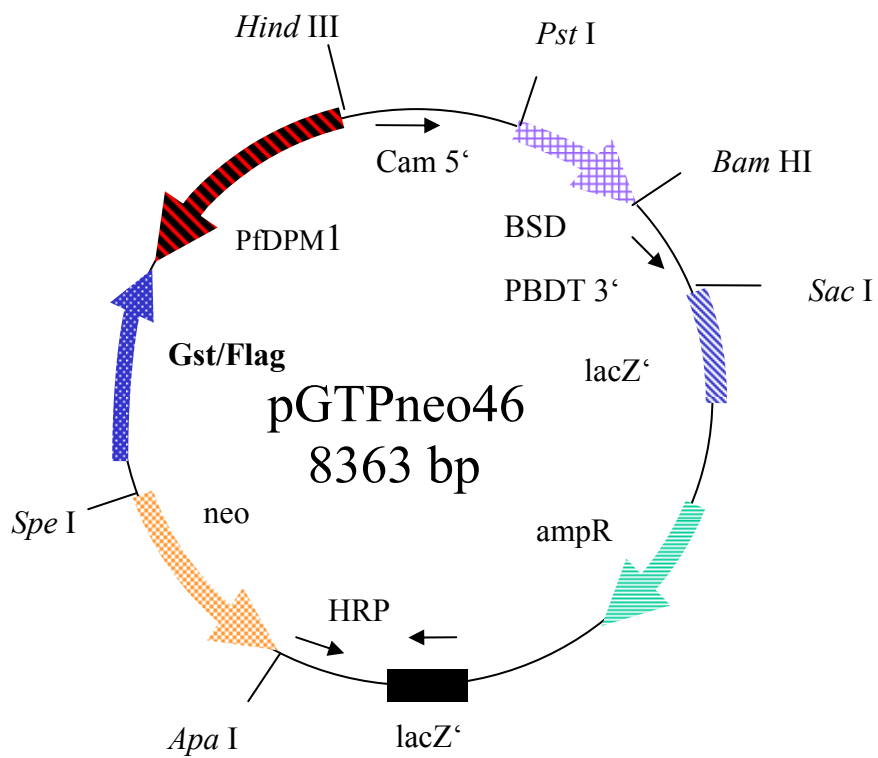


Abb. 34: Zweite Möglichkeit: Die Gst/Flag-Sequenz ligiert in falscher Orientierung und ist somit funktionslos.

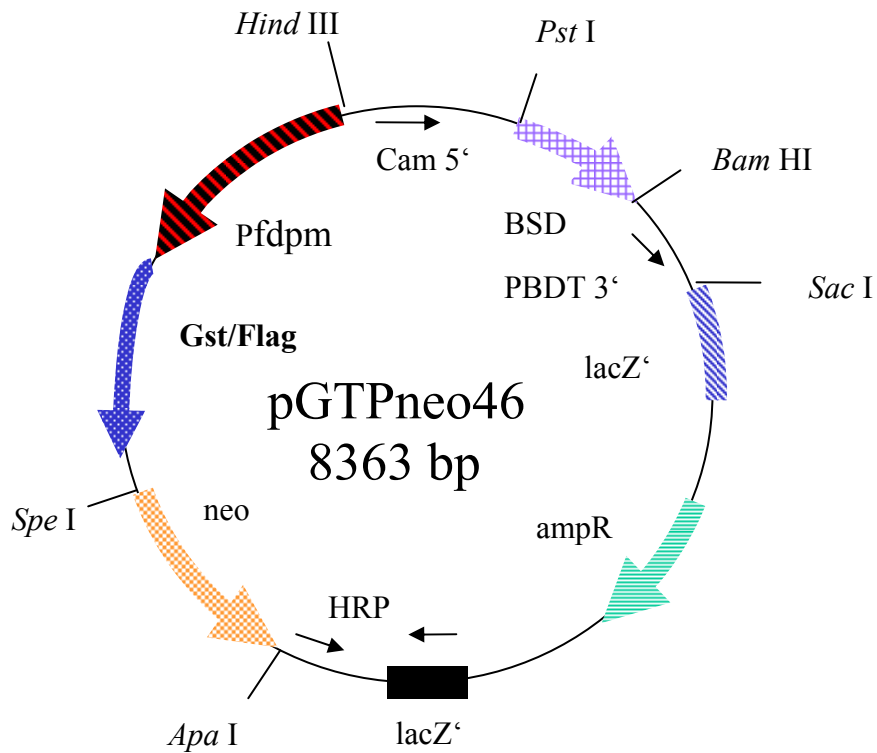


Abb. 35: Dritte Möglichkeit: Das erwünschte Ergebnis, beide Fragmente inserieren in korrekter Orientierung

Durch Überprüfung mehrerer Klone durch Restriktionsanalyse konnte anhand der Größe und der Schnittstellen ein Klon identifiziert werden, der das gesuchte Fragment in korrekter Orientierung tragen könnte. Die genaue Kontrolle der Sequenz erfolgte durch eine Sequenzierung, es lag kein Stopcodon vor.

Klon 18

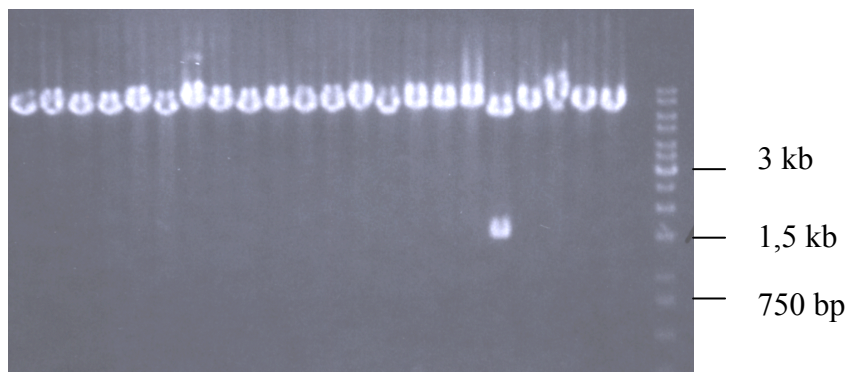


Abb. 36: Gel des Restriktionsverdaus Pfdpm1 plus Gst/Flag in pGTPneo46 mit *Hind III* und *Sal I*. Die gewünschte Bande von 1,5 kb zeigt Klon 18.

Klon 18 wurde nun in einer „Maxiprep“ angezüchtet und anschließend zur Kontrolle erneut verdaut, wobei ein Ansatz *Sal* I und *Hind* III, ein zweiter *Spe* I und *Hind* III, ein dritter nur *Sal* I und ein vierter lediglich *Hind* III enthielt. Wurde in einem Ansatz nur ein Enzym verwendet, zeigte das Plasmid wie erwartet eine Linearisierung. Wie erwünscht, konnte in dem Reaktionsansatz mit den Enzymen *Hind* III und *Sal* I und anschließender Gelelektrophorese eine 1,5 kb Bande beobachtet werden, während die Enzymkombination *Hind* III und *Spe* I wie erwartet, ein 750 bp großes Fragment (PfdPM1) ergab.

Als Negativkontrolle zu den PfdPM1 mit Gst und Flag markierten Klonen diente mit XL blue competent cells transformiertes, mit *Hind* III und *Spe* I verdautes und dephosphoryliertes Plasmid pGTPneo46.

4.1.3 Transfektion des Konstruktes in Kultur von *Plasmodium falciparum*

Die Transfektion des Konstruktes PfdPM1 und Gst/Flag in pGTPneo46 erfolgte mit Elektroporation in eine Kultur des FCBR-Stammes. Dabei befanden sich 10 % der Parasiten im Ringstadium. Nach der Zentrifugation mit $2300\times g$ wurden 250 μ l Parasiten mit der DNA in 400 μ l Albumax versetzt. Der erste Ansatz enthielt 50 ng DNA, der zweite 93 ng DNA, der dritte Ansatz fungierte als Negativkontrolle und enthielt keine DNA. Als Positivkontrolle wurde eine Kultur des FCBR-Stammes genutzt, die nicht mit DNA transformiert, somit nicht mit den Selektionsmedikamenten versetzt, jedoch mit dem gleichen Medium und Erythrozytenkonzentraten behandelt wurde wie die Versuchsansätze.

Die Elektroporation wurde mit einer Spannung von 310V und einer Kapazität von 950 μ F durchgeführt. Der erste Ansatz wurde 12,5sec, der zweite und dritte jeweils 11,9sec elektroporiert.

Nach zwei Tagen wurde zur Selektion mit der Zugabe von 1 μ g Blasticidin pro ml begonnen. Nachdem die Parasiten zunächst nicht mehr im dünnen Blutaussstrich sichtbar waren, konnte man nach 21 Tagen wieder Plasmodien beobachten. Der Hypothese nach sollten dies lediglich Parasiten sein, die das Plasmid aufgenommen haben und somit das Blasticidin-Resistenz-Gen exprimieren konnten.

Nun begann die Selektion mit Neomycin, was ebenfalls in einer Konzentration von 1 μ g pro ml erfolgte. Mit der Beigabe von Neomycin „zwang“ man die Parasiten, die PfdPM1 und Gst/Flag-Kassette homolog gegen eigenes PfdPM1 zu rekombinieren, so dass der eigene PfdPM1-Promoter nun die Expression der neuen Kassette und der „in frame“ insertierten Neomycin-Resistenz kontrollierte.

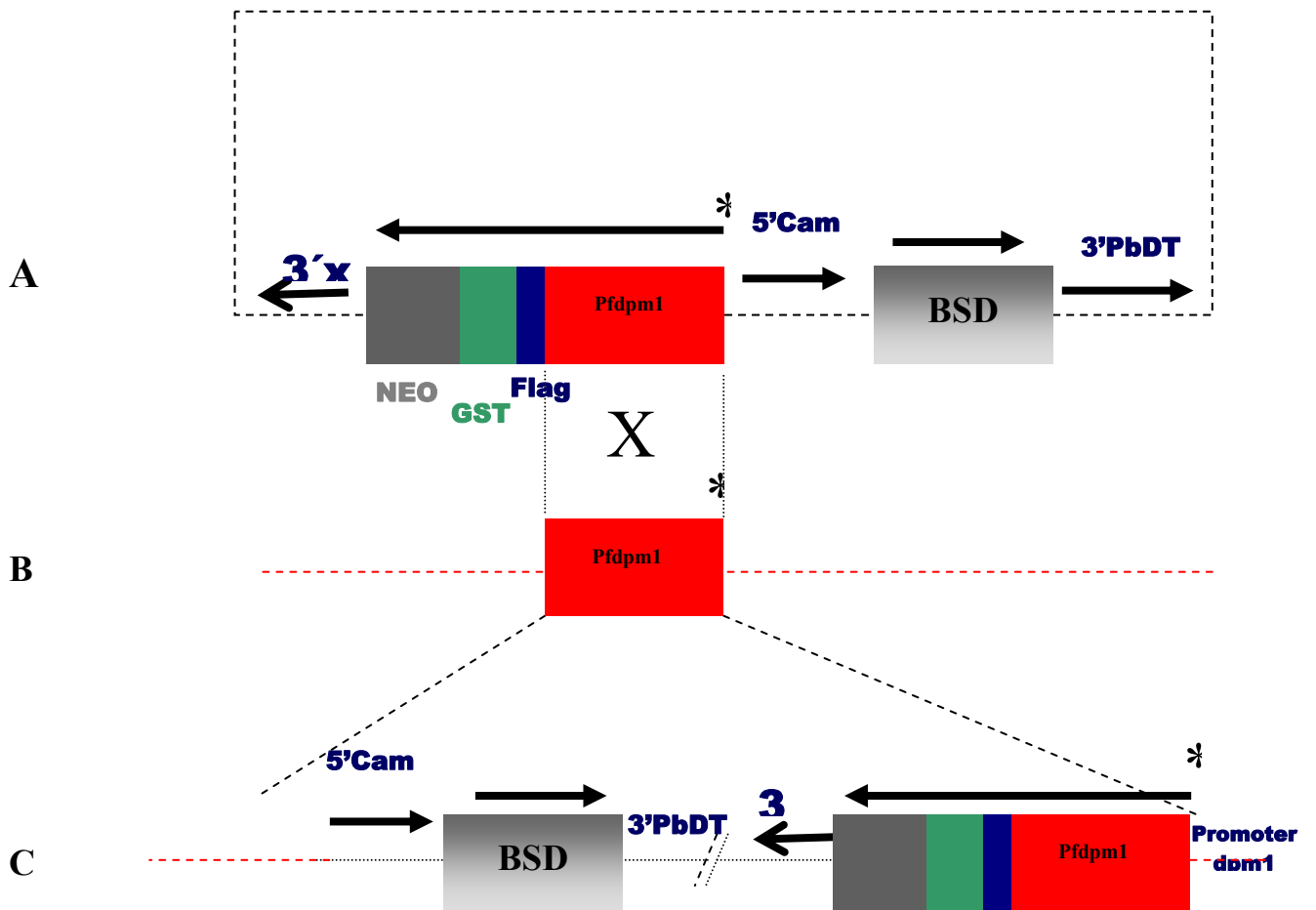


Abb. 37: Schematische Darstellung der homologen Rekombination von endogenem und mit Gst/Flag verändertem PfDPM1 als Vorstufe zu einer Koimmunopräzipitationsstudie.

A zeigt das erstellte Konstrukt mit vorgestelltem Cam Promoter vor bsd, während die neo Sequenz nur exprimiert wird, wenn das Konstrukt in frame inseriert und die homologe Rekombination (B) mit vorgeschaltetem endogenem Promoter stattfindet. C zeigt das erwünschte Endprodukt in *Plasmodium*.

Nach einem Monat der Selektion mit Neomycin waren in der täglichen Kontrolle der Blutausstriche immer noch keine Parasiten sichtbar, während die Positivkontrolle normales Wachstum aufwies.

Eine mögliche Begründung für das Misslingen des Experimentes liegt in den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Markersequenzen und der Dol-P-Man-Synthase selbst. Wie durch die Abbildungen der Transmembrandomänen gezeigt (s. Abb.

29), fehlt diesem Enzym bei *Plasmodium* der hydrophobe C-Terminus. Die nachgeschaltete Gst-Sequenz dagegen, ist sehr hydrophob (s. Abb. 30), so dass dies möglicherweise die korrekte Faltung und Enzymaktivität des Dol-P-Man-Synthase-Proteins behindert.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein zweiter Versuchsaufbau entwickelt. Im zweiten Experiment sollte eine neutrale, nicht in das endogene Protein intervenierende Markersequenz genutzt werden, die es ermöglichen sollte, das Protein für eine zur Kristallisation notwendigen Mengen zu gewinnen. Dazu wurde das Strep-Tag-System genutzt, welches nach Angaben des Herstellers zu diesem Zweck entwickelt wurde und nicht mit endogenen Proteinen interagiert.

4.2 Überexpression von Strep-tag-markiertem DPM1 in *P. falciparum*

4.2.1 Ziel des Experiments

Der Versuchsaufbau des zweiten Projektes zielte nicht auf eine homologe Rekombination in das Genom des Parasiten mit Austausch eines endogenen Gens gegen ein modifiziertes Gen, sondern begnügte sich mit der Aufnahme des Plasmids durch *P. falciparum*. Mit Hilfe des Strep-Tag-Systems wurde das PfDPM1-Gen markiert, um dieses nach der Selektion in Plasmodien-Kultur im Western Blot wieder aufzufinden. Die Verwendung dieses Systems ermöglicht es, nach Selektion in Kultur das DPM1-Protein in den Parasiten in großen Mengen zu vervielfältigen, aufzureinigen und eine Kristallisation anzuschließen.

Das modifizierte Gen stand unter der Kontrolle des bereits im ersten Versuch genutzten *Plasmodium*-Promoters 5'-Cam. Auf diese Weise konnte das Gen auch dann exprimiert werden, wenn keine Integration in das Genom stattfand. Um eine Selektion der mutierten Parasiten zu ermöglichen, wurde eine zweite 5'Cam-Kassette benutzt, die, wie ebenfalls im ersten Experiment, ein Blasticidin-Resistenzgen trug.

Mit Hilfe dieses Expressionssystems sollten große Mengen PfDPM1-Protein als Vorstufe einer späteren Koimmunopräzipitationsstudie gewonnen werden. Erzielt werden sollte markiertes PfDPM1 mit unmarkiertem, endogenem Protein aufzufinden und zu analysieren, so dass sich Aussagen über die Zugehörigkeit von *Plasmodium* zu einer DPM-Synthase-Gruppe treffen lassen.

4.2.2 Klonierung eines Strep-tag-markierten PfDPM1-Konstruktes

Auch im zweiten Versuchsansatz zur Expression von PfDPM1 diente das Plasmid pGTPneo46 als Ausgangspunkt. Die Cam-Promoter-Kassette wurde dem Plasmid zwei Mal entnommen, zum einen, um das Blastocidin-Resistenzgen mit Cam-Promoter und 3'PbDT-Sequenz beizubehalten. Sie wurde mit *Hind* III und *Sac* I ausgeschnitten und sollte erneut als Selektionsmarker für Parasiten gelten, welche das Plasmid aufgenommen haben. Zum anderen wurde die zweite Cam-Kassette so modifiziert, dass an Stelle des ursprünglichen Blastocidinresistenzgens nun ein mit einer Strep-Tag-Sequenz markiertes PfDPM1 eingesetzt wurde.

PfDPM1strep wurde aus genomischer DNA mit Hilfe von spezifisch gewählten Primern amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass nicht nur PfDPM1 vervielfältigt werden konnte, sondern das Gen gleichzeitig mit einer möglichen Sequenz versehen wurde, die für die in dem Strep-tag-System enthaltenen Aminosäuren kodiert. Wenn PfDPM1strep in Aminosäuren translatiert wird, wird das Protein direkt an die acht Aminosäuren des Strep-Tag-Systems gebunden und kann anschließend im Western Blot durch spezifische Antikörper gegen diese Sequenz wieder identifiziert werden.

Die Sequenz des Strep-Tag-Systems entspricht: NH₂-WSHPQFEK-COOH.

Nach der Amplifikation des PfDPM1strep-Fragmentes wurde es zunächst in den TOPO-Vektor mit den Schnittstellen *Pst* I und *Bam* HI, entsprechend den Schnittstellen der Blastocidin-Resistenz, kloniert und anschließend sequenziert. In den Sequenzierungsdaten zeigte sich, dass das Gen an Position 213 eine zweite *Pst* I-Schnittstelle trug, so dass diese mittels „Site Mutagenesis“ entfernt werden musste. Der „Site Mutagenesis-Ansatz“ wurde erneut transformiert, die resultierenden Klone mit *Bam* HI und *Pst* I getestet und eine Sequenzierung durchgeführt.

Parallel dazu wurde auch die 5'Cam-Promoter-Kassette mit den Schnittstellen *Hind* III und *Sac* I in TOPO kloniert. Da die für das Herausschneiden des Blastocidin-Resistenzgens notwendige Enzymkombination *Bam* HI und *Pst* I auch im TOPO-Vektor schneidet, musste die Kassette in einen neuen Vektor kloniert werden, der diese Schnittstellen nicht trägt oder dessen Schnittstellen durch Restriktion mit *Hind* III und *Sac* I entfernt werden können. Für diese Zwischenstufe wurde der Expressionsvektor pMAL C2_E genutzt, welcher mit der Enzymkombination *Hind* III und *Sac* I geöffnet wurde.

Im folgenden Schritt wurde die 2450 bp große 5'Cam-Promoter-Kassette in diesen Vektor kloniert und das 250 bp große Blastocidin-Resistenzgen mittels *Bam* HI und *Pst* I entfernt.

Nun konnte das mutierte PfDPM1strep-Gen in pMAL C2_E ligiert und anschließend in TOPO-Zellen (one shot competent cells) transformiert werden. Die mit 5'Cam-versehene PfDPM1strep-Kassette wurde nun aus pMALC2_E mit *Hind* III und *Sac* I ausgeschnitten und in einen mit *Hind* III linearisierten, die 5'Cam-Promoter-Kassette und Blasticidin-Resistenzgen tragenden pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-Vektor kloniert. Die Schnittstellen *Hind* III und *Sac* I sind kompatibel, so dass nun das endgültige Konstrukt entstand, welches zum Abschluss erneut sequenziert wurde.

Die Transfektion in *Plasmodium* konnte nicht mit dem pMAL C2_E-Vektor erfolgen, da dieses Plasmid mit einer Eigengröße von 6,9 kb und doppelter Cam-Kassette von jeweils 2450 bp zu groß geworden wäre.

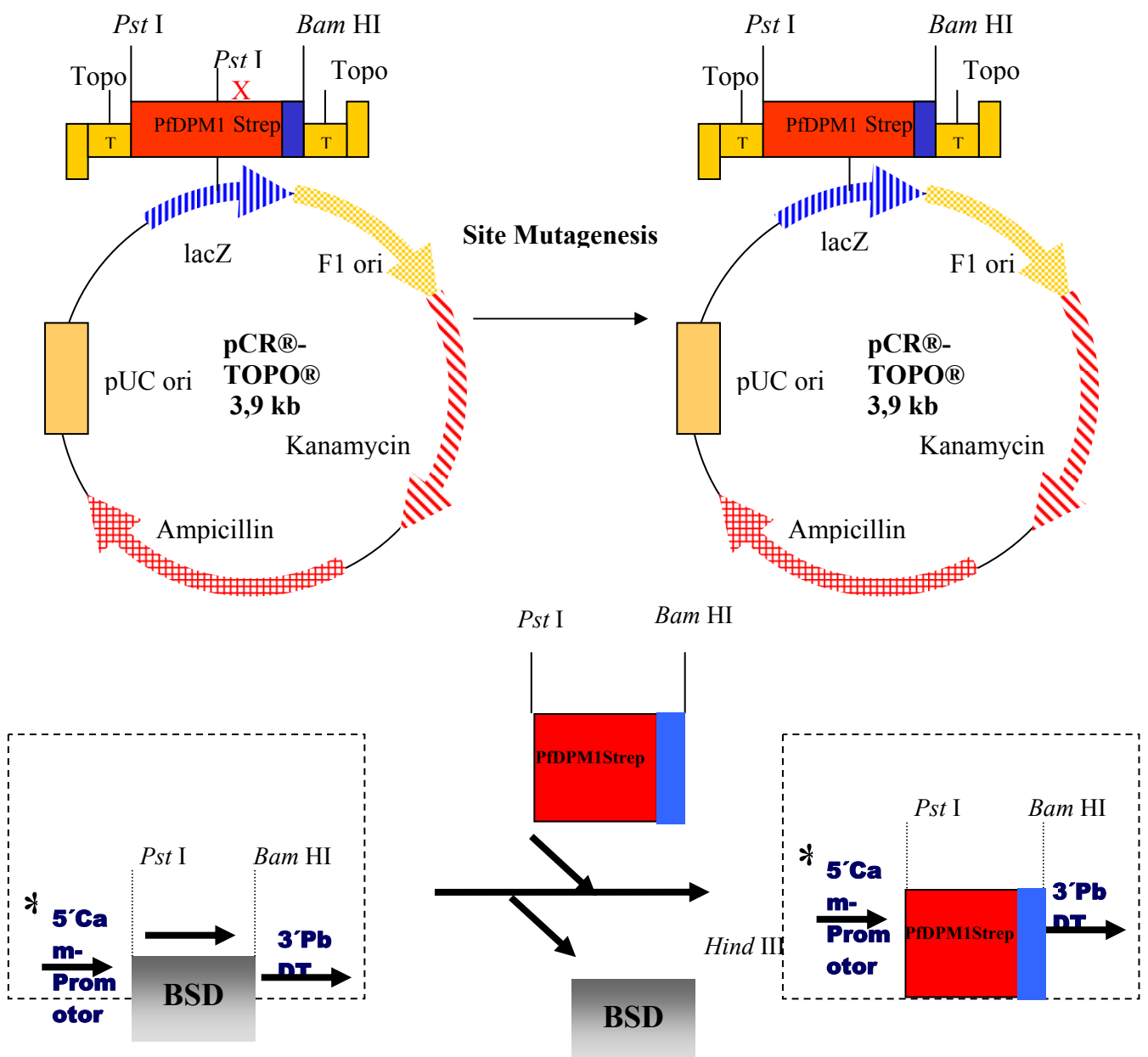
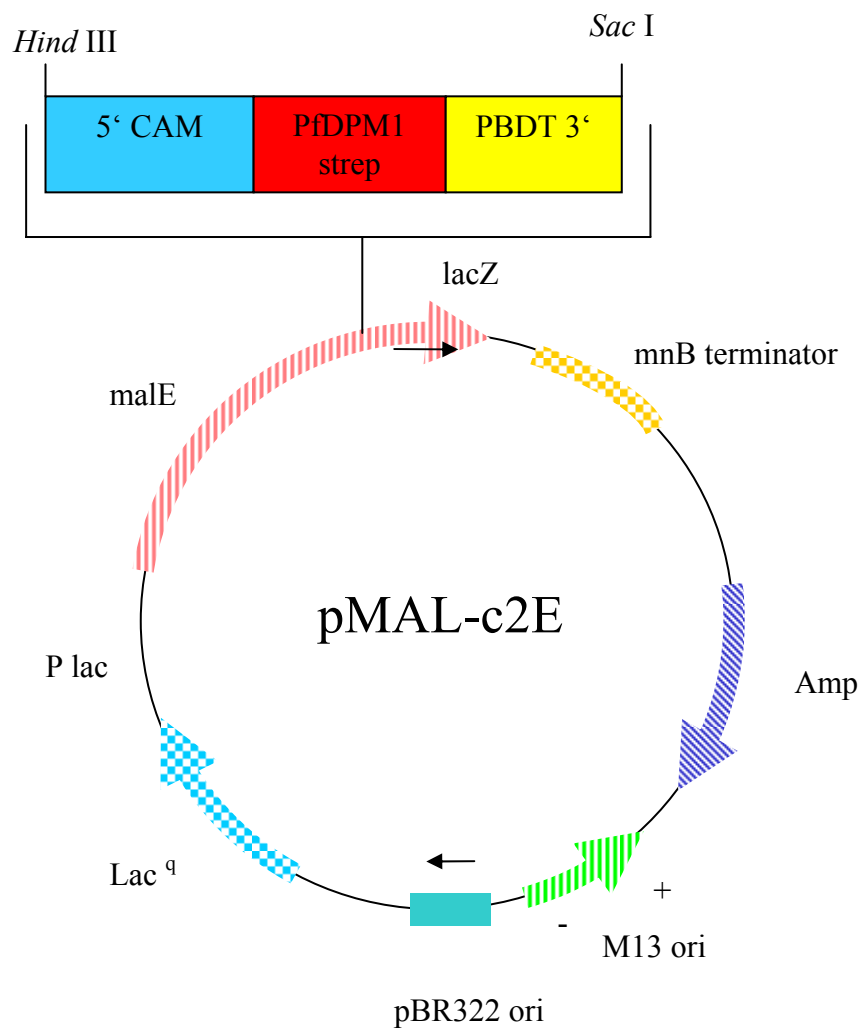


Abb. 38: Schematische Darstellung des Klonierungsweges

Schritt 1 zeigt die Klonierung des modifizierten PfDPM1strep-Gens in den TOPO-Vektor. Im Anschluss erfolgte die Site Mutagenese zur Entfernung der unerwünschten Schnittstelle *Pst* I innerhalb des Gens, da PfDPM1strep anschließend mit *Pst* I und *Bam* HI ausgeschnitten und gegen das Blasticidin-Resistenzgen ausgetauscht werden sollte, welches die gleichen Restriktionsstellen trägt. Auf diese Weise wurde dem PfDPM1strep-Gen ein Plasmodien-eigener Promoter, 5'Cam, vorgeschaltet. Um das Blasticidin-Resistenzgen ausschneiden zu können, wurde es in den Expressionsvektor pMALC2_E kloniert, da dieser Vektor nach Verdau mit *Hind* III und *Sac* I diese Schnittstellen nicht mehr enthält (s. Plasmidkarte in Material und Methoden).



↓
Restriktions-
verdau mit
Hind III /
Sac I

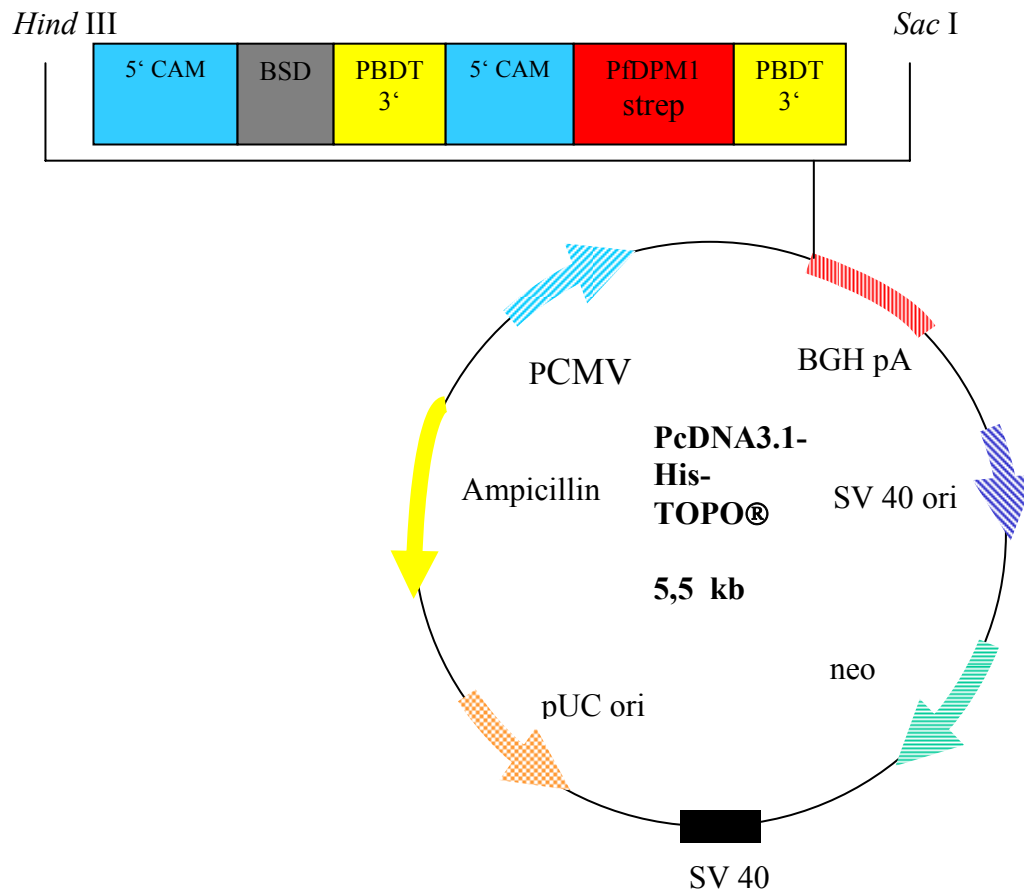


Abb. 39: Schematische Darstellung des Klonierungsvorganges (modifiziert von Invitrogen)

Die Cam-Kassette mit dem Blasticidin-Resistenzgen wurde in den Expressionsvektor pMALC2_E kloniert, um Schwierigkeiten mit den Schnittstellen in dem TOPO-Vektor zu vermeiden. Die mit dem 5'Cam-Promoter versehene PfDPM1strep-Sequenz wurde nun mit der Blasticidin-Resistenz-Kassette ligiert und in den kleineren Vektor pcDNA 3.1/V5-His-TOPO kloniert.

4.2.3 Transfektion des PfDPM1strep-Konstruktes in *Plasmodium falciparum*-Kultur

Die Transfektion des PfDPM1-Konstruktes in eine *Plasmodium falciparum*-Kultur des Stammes 3D7 über Elektroporation fand unter standardisierten Bedingungen statt. Die Spannung in dem Experiment betrug 310V, die Kapazität 950 µF (s. auch Material und Methoden).

Nach 2 Tagen begann die Selektion mit Blastocidin, um solche Parasiten zu erkennen, die das Plasmid bereits aufgenommen hatten. Da es für den Versuchserfolg nicht zwangsweise notwendig war, dass die Plasmodien das Konstrukt in ihr Genom inkorporierten und somit eine homologe Rekombination durchführen, wurde lediglich ein Selektionsmarker verwendet.

4.2.4 Nachweis des PfDPM1Strep-Proteins mittels Western Blot

Auf ein 10% SDS-Gel wurden je zwei PfDPM1strep-Proben (je 20 µl), zwei 3D7-Proben als Kontrolle (je 20 µl) und ein Marker aufgetragen. Das Gel lief mit 100V 1:1h. Im Anschluss wurde ein Blot mit 60mV für 2h auf eine Nitrocellulosemembran durchgeführt.

Die Färbung erfolgte 10 min mit Coomassie blue und 10 min Entfärber 1 (s. Material und Methoden). Die Blockierlösung (s. Material und Methoden) wurde über Nacht bei 4°C aufgetragen. Anschließend wurde der Blot für drei Stunden mit einem Maus Anti-Strep-Tag-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 mit 1% BSA in PBS + 0,05% Tween 20 bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde drei Mal mit PBS für je 5 min Dauer und drei Mal mit PBS Tween 0,05% für je 5 min gewaschen. Schließlich wurde der zweite Antikörper, ein Kaninchen Anti-Maus-Antikörper, in einer Verdünnung von 1:10.000 mit 1% BSA in PBS + 0,05% Tween 20 für zwei Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen. Erneut wurde drei Mal mit PBS def., drei Mal mit PBS + 0,05% Tween 20 und drei Mal mit PBS def. gewaschen. Als Chemolumineszenz-Lösung wurde Extended Duration Substrate Super Signal® West Dura aufgetragen und ca. 1 min auf der Membran belassen. Belichtung und Entwicklung des Filmes erfolgte unter den in „Material und Methoden“ beschriebenen Bedingungen.

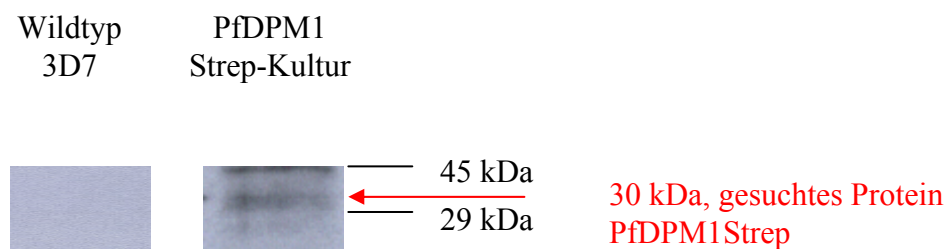


Abb. 40: Western Blot zum Nachweis des markierten PfDPM1-Proteins mit Strep-tag

Im Western Blot wird die gesuchte Bande bei 30 kDa, welche das PfDPM1strep-Protein darstellt, deutlich sichtbar. Bei dem Blot des Wildtyps dagegen zeigt sich, wie erwartet, keine Bande.

4.3 Erstellung eines *S. cerevisiae* Gst/Flag markierten DPM1-Konstruktes

4.3.1 Klonierung des markierten Gens in den pRS 426 MET-Vektor

DPM1 von *S. cerevisiae* stellt ein 267 Aminosäuren großes Protein dar, welches ein Molekulargewicht von 30,6 kDa aufweist.

Es trägt eine C-terminale hydrophobe Domäne und kann als funktionierendes Enzym in *E. coli* exprimiert werden. Anhand dieser Kriterien lässt sich das Protein in die Klasse 1 der Dol-P-Man-Synthasen einordnen (s. Einleitung „Dol-P-Man“).

Um das DPM1-Protein von *S. cerevisiae* näher untersuchen zu können, wurde ein Konstrukt erstellt, welches ein mit einer Gst- und Flag-Sequenz markiertes Gen in einem Hefevektor beinhaltet. Da das Protein eine hydrophobe Domäne trägt, wurden keine Interferenzen zwischen der hydrophoben Gst-Sequenz und dem DPM1 Protein erwartet.

Zu diesem Zweck wurde die Gst- und Flag-Sequenz mit den Restriktionsstellen *Hpy* 99I und *Sal* I versehen. ScDPM1 trug die Schnittstellen *Eco* RI und *Hpy* 99I, so dass beide Fragmente über *Hpy* 99I verbunden und über *Eco* RI und *Sal* I in das Plasmid ligiert werden sollten.

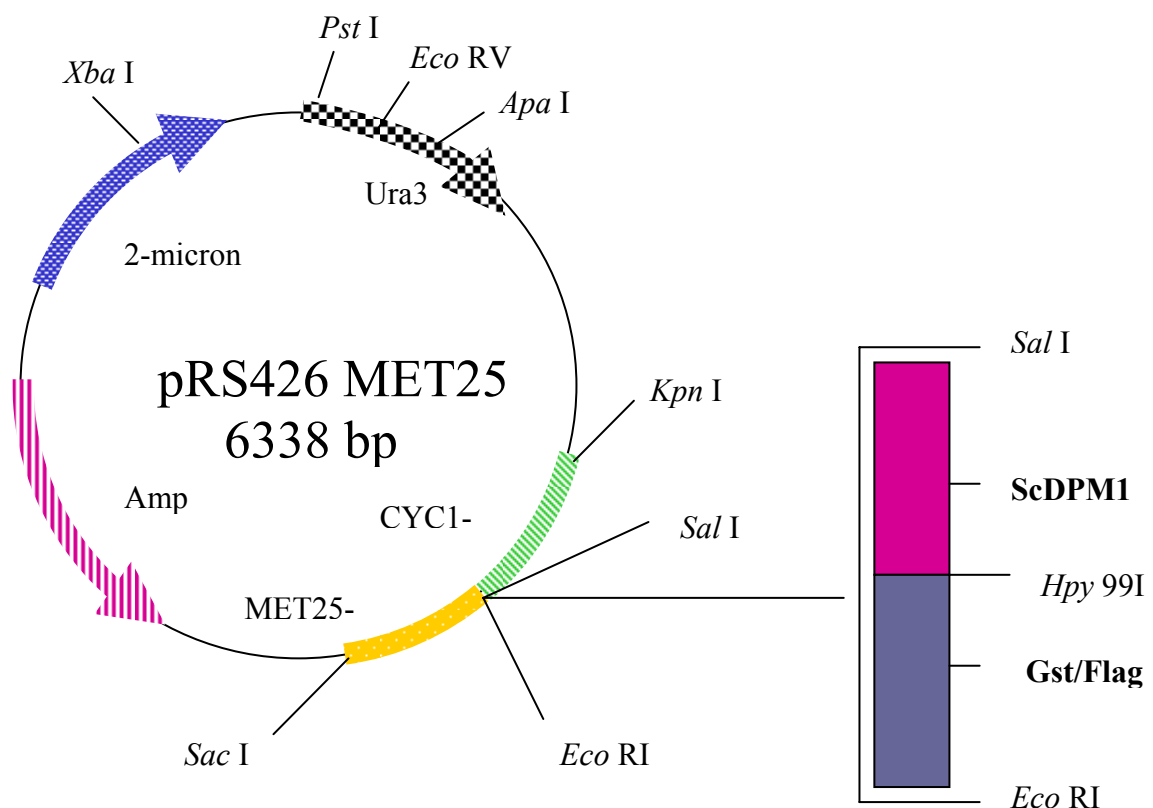


Abb. 41: Schematische Darstellung des Klonierungsvorganges

Das über *Hpy* 99I verbundene Fragment ScDPM1 und Gst/Flag wurde in den mit *Sal* I und *Eco* RI linearisierten Vektor pRS426 Met kloniert.

Dieses Konstrukt wurde zunächst in chemisch kompetente *E. coli* des XL blue Stammes transformiert und über einen Restriktionsverdau mit *Eco* RI und *Sal* I überprüft.

Da die *Gst/Flag*-Sequenz 777 bp trägt und das *ScDPM1*-Gen 828 bp groß ist, wurde ein Insert von 1605 bp erwartet.

Eine Schwierigkeit ergab sich bei der Restriktion mit *Hpy* 99I, *Eco* RI und *Sal* I auf Grund der Inkompatibilität der Puffersysteme dieser Enzyme, so dass der Verdau schrittweise durchgeführt werden musste. Nach der Kontrolle auf dem Agarose-Gel wurde das Fragment ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktion aufgereinigt. Während dieser Arbeitsschritte ging viel DNA verloren, so dass nach erneutem Verdau und Kontrolle mit der Gel-Elektrophorese nicht genügend DNA zur weiteren Klonierung vorlag.

Aus diesem Grunde wurden neue Schnittstellen für die Fragmente gewählt, deren Puffersysteme kompatibel waren.

Das Fragment *Gst/Flag* wurde mit *Spe* I und *Xba* I verdaut und in den pCR[®]TOPO 2.1 Vektor kloniert. Aus dem ersten, oben beschriebenen Klonierungsversuch wurde mit *Eco* RI und *Nhe* I ein Fragment ausgeschnitten, welches das *ScDPM1*-Gen und die *Flag* –Sequenz beinhaltet. Da die *Flag*-Sequenz lediglich Bedeutung für die Antikörper-Bindung bei einem Western-Blot hat, ist das doppelte Vorliegen unbedenklich.

Die *Nhe* I-Schnittstelle ist mit *Spe* I kompatibel, so dass beide Fragmente auf diese Weise in den TOPO-Vektor ligiert werden konnten. Das Gen wurde in dem TOPO-Vektor sequenziert und kontrolliert.

Die Kasette wurde mit *Eco* RI und *Sal* I ausgeschnitten, in pRS 426 ligiert und mittels Restriktionsverdau kontrolliert.

Die Transformation in eine YPH99⁻ dpm His-Gal-Hefe-Übernachtskultur erfolgte unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen. Diese Hefekultur wächst nur auf Galaktose-Nährböden, da der Promoter, der die DPM-Synthese kontrolliert, nur in Anwesenheit von Galaktose aktiv ist. Auf Glukose-Agar ist der Promoter nicht aktiv, folglich ist weder GPI-Synthese möglich, noch können die DPM-abhängigen Proteinmodifikationen durchgeführt werden. Histidin dagegen kann endogen exprimiert werden, so dass die Kultur auch auf Histidin-Mangel-Agar Wachstum zeigt. Der Transformationsansatz wurde sowohl auf SGR-Agar ohne Histidin, auf SGR-Agar ohne Uracil und ohne Histidin als auch auf SD-Agar ohne Histidin ausplattiert. Alle mit dem pRS 426 Vektor transformierten Hefezellen wuchsen auf Galaktose-Selektivplatten ohne Uracil und auf Glukose-Nährböden, da der Galaktose-abhängige Promoter durch den endogenen DPM1-Promoter ersetzt wurde und somit unabhängig von dem angebotenen Medium aktiv ist.

4.3.2 Ausplattierung der transformierten konditional letalen Mutante auf Permissiv- und Nichtpermissiv-Nährböden

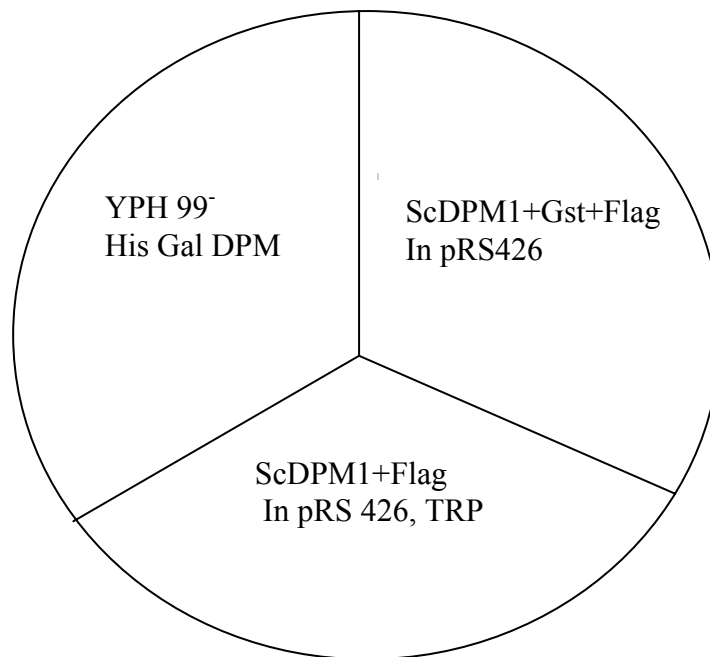


Abb. 42: Ausplattierungsschema der Hefekulturen

Dieses Schema wurde auf drei unterschiedlichen Nährböden getestet. SGR (Galaktose) ohne Histidinzusatz, SD (Glukose) ohne Histidinzusatz und SGR ohne Histidin und ohne Tryptophan.



Abb. 43: Wachstum der Hefekulturen auf SGR-Agar ohne Histidin
Wie erwartet wachsen alle Kulturen auf Galaktose-Agar ohne Histidin.

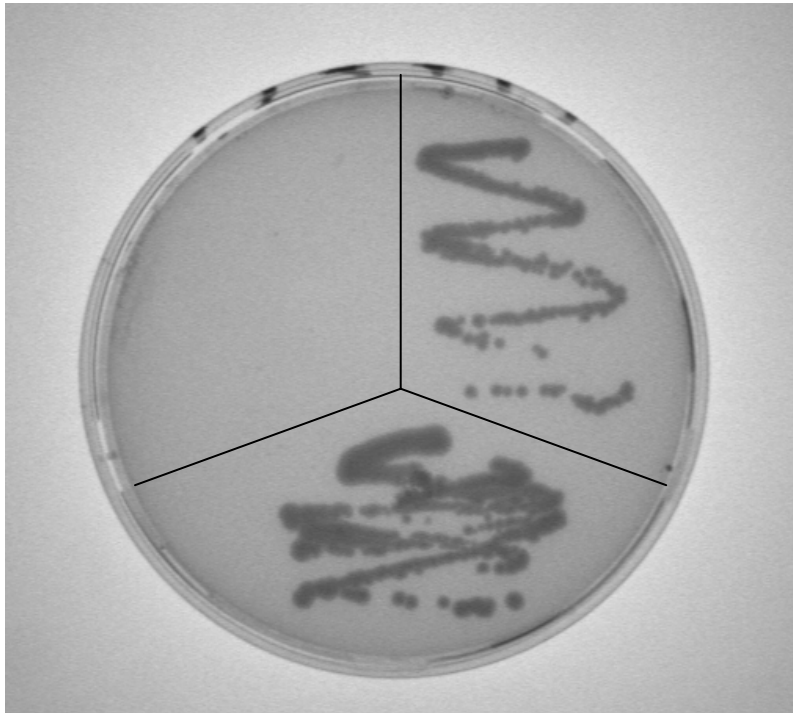


Abb. 44: Wachstum der Hefekulturen auf SGR-Agar ohne Histidin und ohne Uracil

Auf dem Uracil-Mangelagar wachsen lediglich die mit dem Hefevektor pRS426 transformierten Kulturen. Dieser Vektor enthält ein Gen zur Expression von Uracil, so dass die Kultur nicht auf Uracil im Agar angewiesen ist. Der Wildtyp YPH 99-His-Gal-DPM dagegen hat keine endogene Uracil-Quelle und wächst daher nicht. Auf Histidin-Zufuhr über den Agar ist keine Kultur angewiesen, da der Wildtyp ein Histidin-Expressionsgen trägt. Durch die Verwendung dieses Mangel-Agars ist folglich eine Selektion möglich.

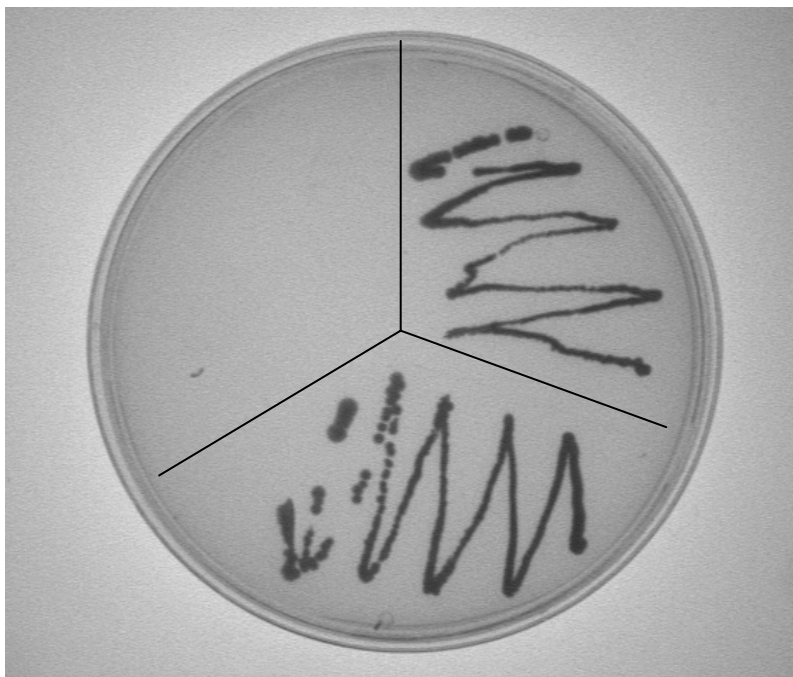


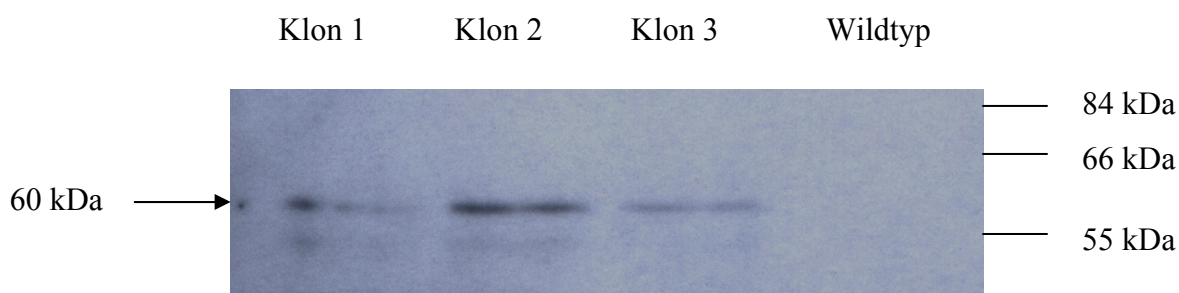
Abb. 45: Wachstum der Hefekulturen auf SD-Agar ohne Histidin

Wie erwartet wächst der Hefe-Wildtyp YPH 99⁻ His-Gal-DPM nicht auf Glukose-Nährboden, da der Wildtyp einen Galaktose-sensitiven Promoter vor dem DPM-Gen trägt. Somit kann DPM nur in Anwesenheit von Galaktose im Medium gebildet werden und die Kultur wächst. Auf Glukose-Agar ist der Promoter nicht aktiv, der Hefe fehlt DPM und sie zeigt kein Wachstum, da weder GPIs gebildet werden, noch Proteine N-glykosyliert oder O-mannosyliert werden.

In der transformierten Hefemutante wurde DPM unter der Kontrolle eines Methionin-Promoters exprimiert, welcher unabhängig von dem angebotenen Medium angeschaltet ist. Somit ist die GPI-Biosynthese möglich und die Kultur wächst.

4.3.3 Nachweis des Gst/Flag markierten DPM1-Proteins von *S. cerevisiae* mittels Western Blot

Drei Klone der Hefekulturen mit Gst/Flag markiertem ScDPM1-Protein wurden auf SD-Agar ohne Histidin ausplattiert und in Übernachtskultur angeimpft. Mit Hilfe eines Western Blots gelang der Nachweis des markierten Proteins von 60 kDa. Dabei entsprechen 30 kDa ScDPM1, 30 kDa Größe weist auch das Gst-Protein auf. Der Blot wurde nach den Angaben in dem Kapitel „Material und Methoden“ durchgeführt. Die Primärantikörperlösung enthielt einen Anti-Gst-Antikörper (Ziege) in einer Konzentration von 1:5000 in 10 % BSA und PBS Tween 20 0,05 %. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Ziege-Antikörper (Esel) in einer Konzentration von 1:50.000, ebenfalls in 10 % BSA und PBS Tween 20 0,05%.

**Abb. 46: Western Blot von drei Klonen der Hefekultur mit Gst und Flag-markiertem ScDPM1-Protein.**

Der Blot wurde mit Anti-Gst-Antikörper durchgeführt und die Chemolumineszenz-Lösung Extended Duration Substrate Super Signal® West Dura verwendet. Das gesuchte Protein, ScDPM1 mit Gst von insgesamt 60 kDa Größe wurde mit einem Pfeil markiert. Der Wildtyp zeigt keine Reaktion mit dem Antikörper, während die Klone 1-3 mehrere Banden aufweisen.

5. DISKUSSION

5.1 Kurze Übersicht der vorliegenden Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mutanten von *Plasmodium falciparum* erstellt, welche das DPM1-Gen von *P. falciparum* mit unterschiedlicher Markierung in einem für eine schnelle, positive Selektion geeigneten Vektor für diese Parasiten aufweisen. Nach der Klonierung der entsprechenden Konstrukte bestand der zweite Abschnitt des Versuchs in der Transfektion von *P. falciparum* mit der klonierten DNA. Im dritten Abschnitt wurde die für das Konstrukt adäquate Selektion mittels bestimmter Antibiotika durchgeführt. Dieser Versuchsansatz verfolgte eine nähere Charakterisierung des DPM1-Proteins von *P. falciparum*, da dieses bisher noch nicht einer Dol-P-Man-Synthasegruppe zugeordnet werden konnte.

Darüber hinaus wurde eine Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* erstellt, die ebenfalls eine Markierung des DPM1-Proteins trägt. Zwar war bekannt, dass die DPM-Synthase von *S. cerevisiae* zu der ersten Enzymklasse gehört, dennoch sind Koimmunopräzipitationsstudien zur näheren Untersuchung dieses Proteins noch nicht gelungen.

Die Erkenntnisse, dass die Dol-P-Man-Synthase ein essentielles Enzym in Hefe darstellt, und dass die DPM1-Proteine von *L. mexicana* und *T. brucei* als humanpathogene Parasiten nicht den gleichen Aufbau haben wie das menschliche Protein, machten eine Analyse des DPM1-Proteins von *P. falciparum* besonders interessant. Sollten sich grundlegende Unterschiede im Vergleich zur DPM-Synthase des Menschen herausstellen, könnte dieses Protein als Angriffspunkt einer neuen Antimalaria-Therapie genutzt werden.

Damit eine Inhibition der DPM-Synthase auch das gewünschte klinische Ergebnis, nämlich die Vernichtung der Parasiten, mit sich bringt, sollte zunächst gezeigt werden, dass DPM1 auch in Plasmodien ein essentielles Gen darstellt und diese Parasiten ohne GPIs nicht lebensfähig sind. Letzteres konnte bereits für ein anderes Protozoon der Gattung der Apikomplexa, *Toxoplasma gondii*, belegt werden.

Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu überprüfen, ist die Erstellung von DPM1-Knock-out-Mutanten (s. Ausblick).

DPM1 ist die Dol-P-Man-Synthase, die die Produktion des Proteins Dol-P-Man katalysiert (Orlean, *et al.* 1988). Dieses Protein überträgt die Mannose-Reste während der GPI-Biosynthese, spielt jedoch auch eine wichtige Rolle bei der N-Glykosylierung und O-Mannosylierung von Proteinen.

Dol-P-Man wird durch die Übertragung von GDP-Mannose auf Dol-P an der zytoplasmatischen Seite des ER gebildet. Für entsprechende Glykosylierungsschritte wird dieses Protein jedoch auf der lumenalen Seite des ER benötigt. Über einen noch unbekanntem Mechanismus wird Dol-P-Man auf diese Seite transportiert. Es wird eine „Flipase“ postuliert, die den Transport des Moleküls über die ER-Membran gewährleisten soll (Vishwakarma & Menon, 2004).

Die Dol-P-Man-Synthase lässt sich anhand mehrerer Eigenschaften in zwei unterschiedliche Klassen einteilen. Der Klasse eins gehören Organismen mit DPM-Synthasen an, die eine C-terminale, hydrophobe Domäne aufweisen, welche eine Transmembrandomäne darstellt und somit für die Stabilität und korrekte Lokalisierung des Proteins sorgt. Proteine dieser Klasse fungieren als eigenständige Enzyme und bestehen lediglich aus einer Einheit, DPM1, welches in *E. coli* als funktionierendes Enzym exprimiert werden kann. Organismen, die eine Dol-P-Man-Synthase dieser Klasse aufweisen, sind *S. cerevisiae*, *U. maydis*, *T. brucei* und *L. mexicana*.

Merkmale der DPM-Synthasen der zweiten Klasse sind zum einen das Fehlen einer C-terminalen, hydrophoben Domäne und somit auch einer Transmembrandomäne. Die dieser Klasse angehörende menschliche DPM-Synthase weist drei Untereinheiten mit unterschiedlichen Funktionen auf (Maeda *et al.*, 1998).

Während DPM1 als katalytische Einheit angesehen wird, übernimmt das zwei Transmembrandomänen aufweisende DPM2-Protein eher regulatorische Aufgaben und stabilisiert die Einheit DPM1. Auch DPM3 scheint zur Stabilisierung und korrekten Lokalisation der katalytischen Untereinheit beizutragen (Maeda *et al.*, 2000) und ist für die DPM-Synthaseaktivität essentiell (Ashida *et al.*, 2006).

Organismen, die eine DPM-Synthase ohne hydrophoben C-Terminus besitzen, sind neben *H. sapiens*, *S. pombe* und *T. reesei* auch *C. briggsiae* (s. auch Einleitung, 1.10 „Dolichol-Phosphat-Mannose“).

Um einen ersten Zugang zu dem DPM1-Gen von *P. falciparum* zu erhalten, wurde unter Verwendung der Computerprogramme HUSAR und des Sanger-BLAST-Servers die wachsende Anzahl an Sequenzdaten aus dem *P. falciparum*-EST-Projekt analysiert. Im Gegensatz zur menschlichen DPM-Synthase konnten bei computergestützter Analyse der Sequenzen jedoch keine homologen Sequenzen zu den humanen Untereinheiten DPM2 und DPM3 gefunden werden. Die computergestützte Auswertung ergab eine Identität auf Aminosäure-Ebene von 31% gegenüber *S. cerevisiae* und 49 % zu *H. sapiens*. Der Vergleich

zwischen *S. cerevisiae* und *H. sapiens* erbrachte eine Identität von 32% (Delorenzi *et al.*, 2002).

Auf Grund der Tatsache, dass das Genom von *P. falciparum* einen AT-Gehalt von mehr als 80% aufweist und dadurch in rekombinanter Form extrem instabil ist, führt dies zu geringen Transformationseffizienzen und häufigen Rekombinationsereignissen bei klonierter cDNA. Daher war die Amplifizierung mittels spezifischer Primer aus genomischer DNA die einzige sichere Möglichkeit, das korrekte PfDPM1-Gen zu erhalten. Zur Kontrolle, ob es sich um das DPM1-Gen handelt, wurden Fluoreszenz-Studien durchgeführt (Delorenzi *et al.*, 2002).

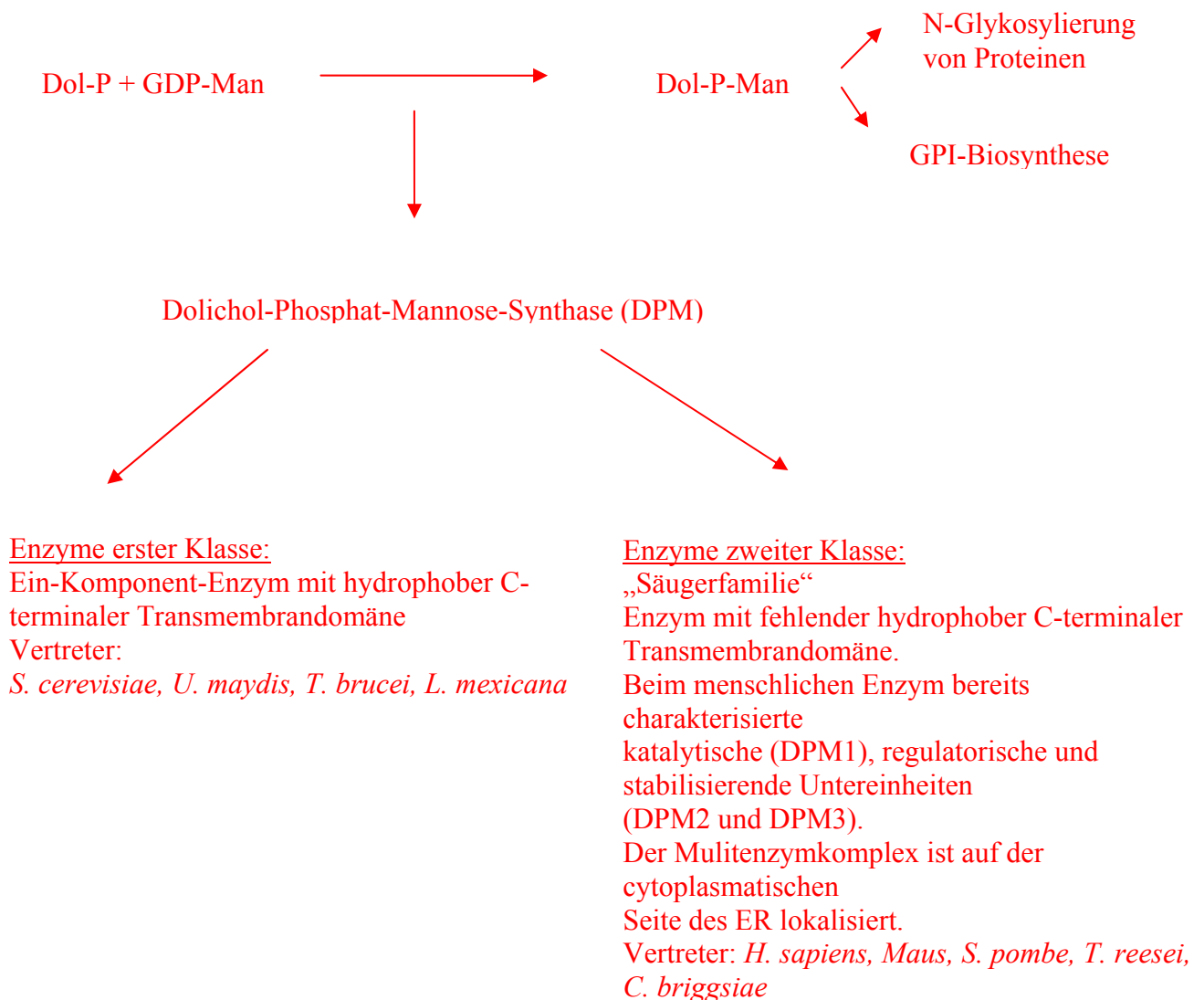


Abb. 47: Schematische Abbildung der DPM-Bildung und wichtigster Merkmale der Unterscheidung beider Enzymklassen in der Übersicht

5.2 Charakterisierung des DPM1-Proteins von *P. falciparum*

(s. auch Einleitung, Kap. 1.10 „Dolichol-Phosphat-Mannose“ und „Ergebnisse“)

Das offene Leseraster des DPM1-Gens kodiert für 259 Aminosäuren. Nach Maeda *et al.* (1998) ergab der Sequenzvergleich innerhalb einer Klasse der DPM-Synthasen eine Identität von 60-70%, während beide Gruppen im Vergleich lediglich eine Identität von 30-40 % aufweisen. Dieses Kriterium erfüllt die DPM-Synthase von *P. falciparum* nicht. Verglichen mit *S. cerevisiae*, einer DPM-Synthase der Klasse eins, konnte lediglich eine Identität von 31% ausgemacht werden. Im Vergleich mit den Sequenzen von *H. sapiens* mit einer DPM-Synthase der zweiten Klasse ergab sich eine Identität von 49%. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine Sonderstellung des Enzyms von *P. falciparum* sein.

Samuelson *et al.* postulierten 2005 das Fehlen von N-Glykanen bei *P. falciparum*. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Dol-P-Man-Synthase dieses Parasiten lediglich Bedeutung für die GPI-Biosynthese hat. Da die Untereinheiten DPM2 und DPM3, die *P. falciparum* fehlen, regulatorische Funktionen haben, kann man die Hypothese aufstellen, dass diese die N-Glykosylierung regulieren und aus diesem Grunde bei dem Parasiten nicht nachzuweisen sind.

| Organismen im Vergleich | Identität in % | Ähnlichkeit in % |
|---|----------------|------------------|
| <i>P. falciparum</i> / <i>H. sapiens</i> | 49 % | 70 % |
| <i>P. falciparum</i> / <i>S. cerevisiae</i> | 31 % | 48 % |
| <i>S. cerevisiae</i> / <i>H. sapiens</i> | 32 % | 50 % |

Tab. 2.: Übersicht zur Identität und Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der DPM1-Proteine von *P. falciparum*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens* im Vergleich

5.3 Gegenüberstellung der Sequenzen des DPM1-Proteins von *S. cerevisiae* (ScDPM1), *T. brucei* (TbDPM1), *H. sapiens* (HsDPM1), *S. pombe* (SpDPM1) und *P. falciparum* (PfDPM1)

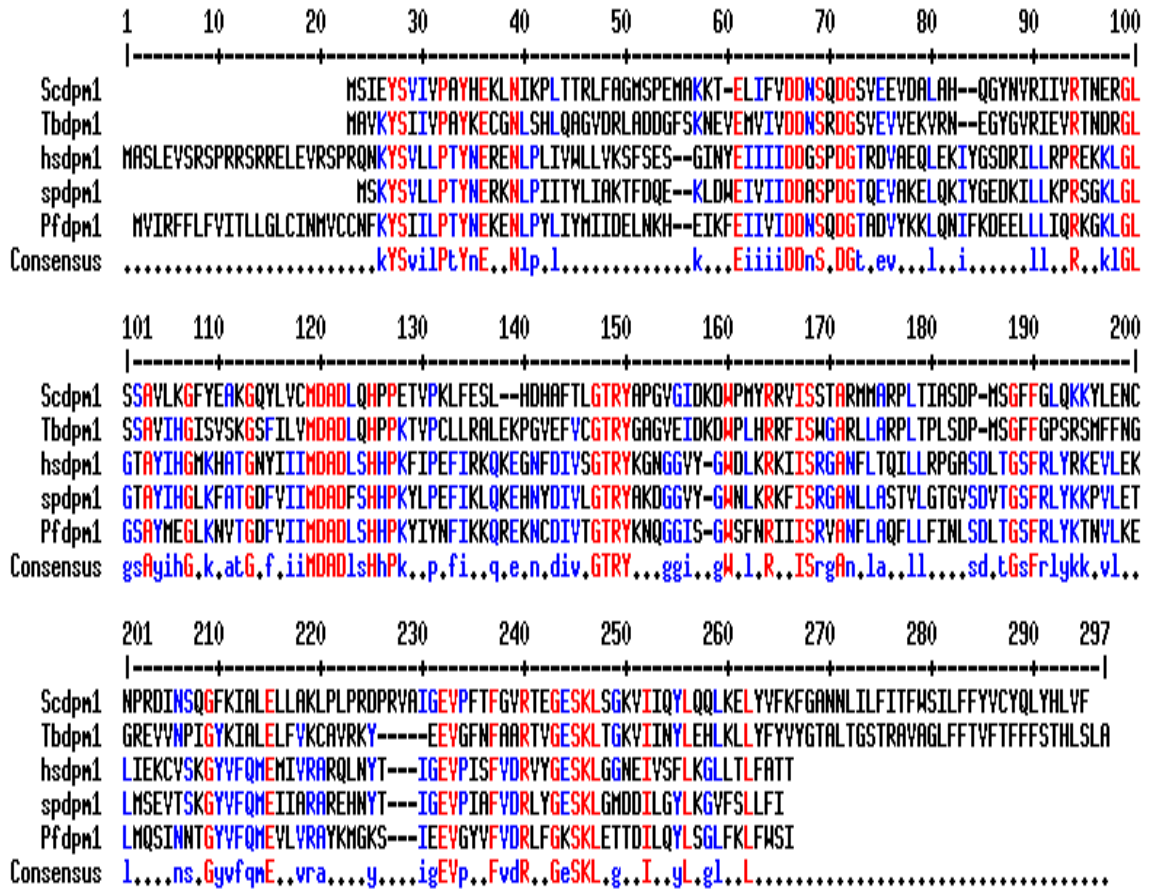


Abb. 48: Vergleich der Aminosäuresequenzen des DPM1-Gens von *S. cerevisiae* (Sc), *T. brucei* (Tb), *H. sapiens* (Hs), *S. pombe* (Sp), *P. falciparum* (Pf):

Aminosäure-Übereinstimmungen in allen Organismen sind rot dargestellt, während Übereinstimmungen in drei oder mehr Organismen blau unterlegt sind.

Die Aminosäuren 1-22 in der HsDPM1- und PfDPM1-Sequenz stellen wahrscheinlich eine N-terminale Signalsequenz dar, die im ER abgespalten wird.

Die Aminosäuren 268-295 bei ScDPM1, bzw. 297 bei TbDPM1 zeigen eine C-terminale, hydrophobe Domäne, die als Transmembrandomäne fungiert.

Deutlich sichtbar wird aus der Abb. 48 eine N-terminale Sequenz von 22 Aminosäuren, die bei Betrachtung dieser Organismen als Vertreter beider Gruppen von DPM-Synthasen, nur bei *H. sapiens* und *P. falciparum* vorliegt. Diese Sequenz könnte als Signalsequenz für das ER fungieren. Diese Vermutung wurde durch Analysen des Computerprogrammes „Prediction of Signal Sequences- PSORT Prediction“ bestätigt. Dies würde auch die potentielle N-terminale Transmembrandomäne in Abb. 29 erklären (s. Kapitel „Ergebnisse“). Wie erwartet, zeigt sich eine C-terminale hydrophobe Sequenz lediglich bei *S. cerevisiae* und *T. brucei*. *S. pombe* dagegen, trägt weder eine N-terminale Signalsequenz noch eine C-terminale hydrophobe Domäne.

5.4 Liegt eine Interaktion der Markersequenz Gst mit PfDPM1 vor?

Die Tatsache, dass die mit Gst und Flag markiertem PfDPM1 transformierten Kulturen im Gegensatz zu ebenso behandelten *S. cerevisiae*-Kulturen nicht lebensfähig waren, lässt die Hypothese zu, dass das hydrophobe Gst-Protein die Faltung des hydrophilen DPM1-Proteins von *P. falciparum* behindert, während das Hefe-Protein mit hydrophober C-terminaler Sequenz keine Beeinträchtigung zeigt. Ebenfalls konnte in einer Plasmodiumkultur mit Gst und Flag markiertem Gpi8, welches ein Transmembranprotein darstellt, keine Beeinträchtigung im Wachstum der Kultur beobachtet werden. Aus der Abbildung 30 „Potentielle Transmembrandomänen des modifizierten DPM1 von *P. falciparum*“ geht ein deutlicher Unterschied zu dem unveränderten, endogenen DPM1 Protein des Parasiten hervor. Während bei dem endogenen Protein durch computergestützte Analyse lediglich fünf potentielle Transmembrandomänen ausgemacht werden konnten, weist das modifizierte Protein drei weitere, durch die Markersequenz verursachte, potentielle Transmembrandomänen auf. Durch diese Analyse wird die Hypothese unterstützt, dass eine Interaktion des hydrophoben Markerproteins mit dem endogenen hydrophilen DPM1 stattfand, welche die Enzymaktivität behindert haben könnte.

5.5 Erkenntnisse zur Einordnung der parasitären DPM-Synthase aus Komplementierungsstudien

Weitere Hinweise zur Einordnung der DPM-Synthase von *P. falciparum* in eine Klasse mit der Hefe *S. pombe* entstehen aus der Beobachtung, dass PfDPM1 eine Mangelmutante von *S. pombe* komplementierte und Enzymaktivität entwickelte (Santos de Macedo, unpublizierte Daten).

Dagegen konnte bei dem Versuch, eine *S. cerevisiae*-Mangelmutante mit PfDPM1 zu komplementieren, keine Enzymaktivität und kein Wachstum der Hefe beobachtet werden. Die *S. pombe* Mangelmutanten wurden mit dem Shuttle-Plasmid pRS426ME transformiert, welche das DPM1-Gen von *P. falciparum* enthielt. Die Hefemutante wurde auf SD-Agar ohne Histidin und Uracil angezüchtet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Wildtyp als auch die mit PfDPM1 komplementierte Mutante wächst, während die DPM1 Mangelmutante und eine Mutante, die allein mit dem Shuttleplasmid transformiert wurde, kein Wachstum auf dem Selektivagar zeigten.

Auch das menschliche DPM1-Protein komplementierte *S. pombe*-Mangelmutanten (Colussi *et al.*, 1997), was die Vermutung nahe legt, dass auch *S. pombe* eine DPM2-Untereinheit besitzt (Maeda *et al.*, 1998).

Die Mauszell-Linie Thy1-E dagegen, eine Thymoma negative mutierte Zell-Linie mit fehlender DPM-Aktivität konnte mit der Dol-P-Man-Synthase von *P. falciparum* nicht komplementiert werden (Santos de Macedo, unpublizierte Daten). Der Defekt der DPM-Synthase verursacht in dieser Zell-Linie die Akkumulation eines unreifen N-gebundenen Oligosaccharid-Vorläufers und eine defekte GPI-Biosynthese. Dadurch können Proteine wie Thy-1 auf der Zelloberfläche nicht mehr durch GPIs verankert werden.

Dieses Ergebnis ist überraschend und könnte ein weiterer Hinweis auf eine Sonderstellung von *P. falciparum* sein, denn unter der Annahme, dass die DPM-Synthase dieses Parasiten zu der zweiten Enzymklasse gehört, sollte die Komplementierung gelingen.

Auf Grund der hohen Identität auf Aminosäureebene zwischen dem DPM1-Protein von Maus und Mensch lässt sich dieses Ergebnis wahrscheinlich auf das menschliche Enzym übertragen, was demnach nicht mit PfDPM1 zu komplementieren wäre.

Des Weiteren konnte in der Maus im Gegensatz zu *P. falciparum* bereits ein DPM2-Gen identifiziert werden, das hohe Homologie zu dem menschlichen Gen, HsDPM2, aufweist (Maeda *et al.*, 1998).

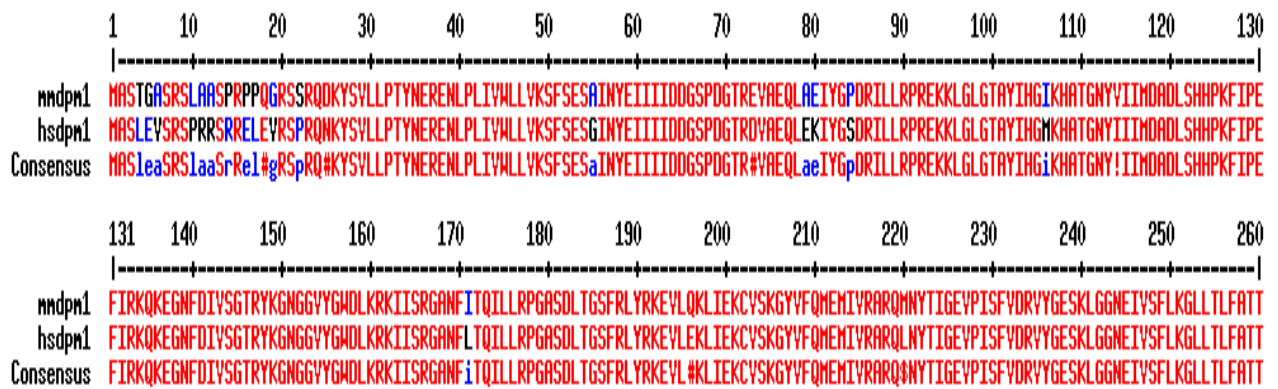


Abb. 49: Vergleich der Aminosäuresequenzen des DPM1-Proteins zwischen Maus (MmDPM1) und Mensch (HsDPM1)

Die Identität zwischen beiden Sequenzen beträgt annähernd 100 %.

Sowohl DPM1 von *S. cerevisiae* als auch von *S. pombe* (Colussi *et al.*, 1997) komplementierten dagegen die defekte Mauszell-Linie (Beck *et al.*, 1990), was die Vermutung belegt, dass das Enzym von *S. cerevisiae* ohne weitere Untereinheiten optimale Enzymaktivität erlangt und somit selbst als DPM-Synthase fungiert. *S. pombe* dagegen gehört der gleichen DPM-Synthase-Gruppe an, so dass keine Schwierigkeiten zu erwarten waren. Versuche, die die Komplementierung von DPM1 von *H. sapiens* und *S. pombe* mit *S. cerevisiae* zeigen sollten, schlugen jedoch fehl. Es konnte keine ausreichende Enzymaktivität beobachtet werden.

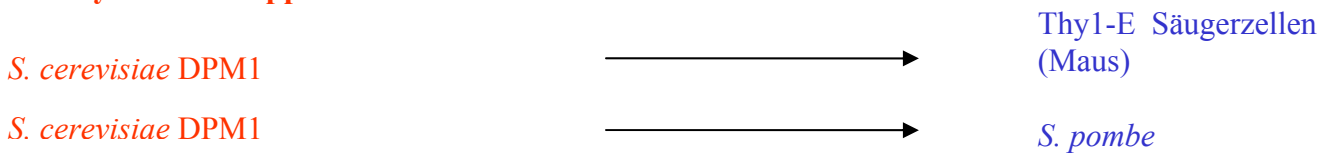
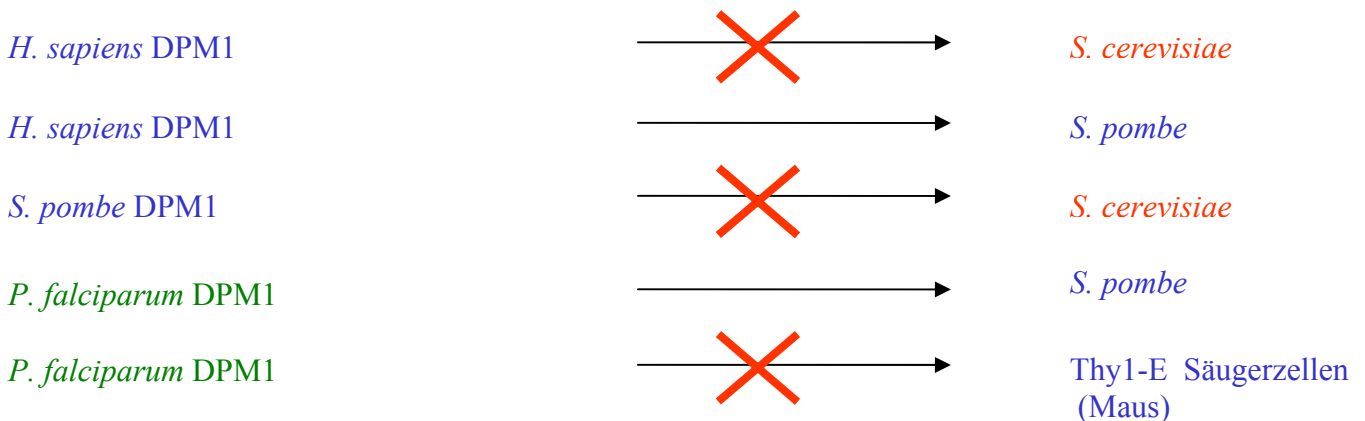
DPM-Synthase-Gruppe 1:**DPM-Synthase-Gruppe 2:**

Abb. 50: Schematische Übersicht über Komplementierungsversuche und ihren Erfolg
 Enzyme erster Klasse sind rot, Enzyme zweiter Klasse blau gekennzeichnet. Auf Grund des Fehlens einer C-terminalen hydrophoben Domäne des DPM1-Proteins wurde *P. falciparum* hier unter „Enzymen zweiter Klasse“ aufgeführt. Da eine mögliche Sonderstellung von *P. falciparum* jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, wurde es grün unterlegt dargestellt.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich zusammenfassend folgende Rückschlüsse auf die Einordnung der Dol-P-Man-Synthase von *P. falciparum* ziehen:

Die Tatsachen, dass DPM1 von *P. falciparum* eine C-terminale Transmembrandomäne fehlt und dass das hydrophobe Markerprotein Gst die korrekte Expression des hydrophilen DPM-Proteins behinderte, legen bereits die Einordnung in die zweite Enzymklasse nahe. Verstärkt werden die Hinweise durch die Beobachtung, dass PfDPM1 keine Mangelmutante von *S. cerevisiae* komplementieren konnte und keine Enzymaktivität zu erkennen war, während eine DPM1-Mangelmutante von *S. pombe* erfolgreich mit dem Enzym von *Plasmodium falciparum* komplementiert wurde und volle Enzymaktivität entwickelte (Santos de Macedo, unpublizierte Daten).

Zweifel zwischen der engen Verwandtschaft von DPM1 von *P. falciparum* und dem Säuger DPM1 kommen durch das negative Resultat des Komplementierungsversuches von PfDPM1-Protein mit Thy1-E-Zellen auf. Dies wird unterstützt durch das Fehlen von Homologien zu den menschlichen DPM2- und DPM3- Untereinheiten. Darüber hinaus ist die Identität auf Aminosäureebene zwischen DPM1 von *P. falciparum* und *H. sapiens* mit 49 % relativ gering und entspricht nicht der von Maeda *et al.* (1998) aufgestellten These, die Identität innerhalb einer Gruppe betrage 60-70 %. Darüber hinaus könnte die in Abb. 29 dargestellte potentielle Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 150-200 die Funktion einer stabilisierenden Untereinheit übernehmen. Die DPM-Synthase von *Plasmodium* könnte über diese Domäne in der Lage sein, sich selbst in der ER-Membran zu verankern, was unter den bisher charakterisierten DPM-Synthasen einzigartig wäre.

Diese Argumente sprechen für eine Sonderstellung innerhalb der zweiten Enzymklasse. Interessanterweise komplementiert aber DPM1 aus *P. falciparum* *S. pombe* und DPM1 dieser Hefe wiederum *H. sapiens*-Zellen.

Da DPM1 von *P. falciparum* in *S. cerevisiae* keine Enzymaktivität zeigte und selbst keine C-terminale Transmembrandomäne trägt, bleibt die Frage nach einer definitiven Stabilisierungs- und Regulationseinheit noch unbeantwortet.

Eine weitere Möglichkeit, warum bei der Suche in den Datenbanken keine homologen Untereinheiten zu den humanen DPM2- und DPM3-Proteinen gefunden werden konnten, besteht in der Hypothese, dass diese Homologien zu schlecht konserviert und dadurch durch computergestützte Vergleiche nicht zu finden sind.

AUSBLICK

Um eine Sonderstellung des DPM1-Proteins von *P. falciparum* zu bestätigen oder abzulehnen, sind weitere Experimente gefordert.

Da die Komplementationsversuche innerhalb der zweiten Enzymklasse keine einheitlichen Ergebnisse erbrachten, müsste getestet werden, ob DPM1 von *P. falciparum* *H. sapiens*-Zellen komplementiert oder nicht. Ließe sich das nicht zeigen, wäre dies ein weiterer Hinweis auf eine Sonderstellung. Von großer medizinischer Wichtigkeit wäre dieser Versuch für die Entwicklung potentieller Antimalariamedikamente. Sollte DPM1 von *P. falciparum* empfindlicher auf bestimmte Substanzen reagieren als das menschliche Enzym, könnte es sich als Grundlage der Erarbeitung einer neuen Chemotherapie erweisen. Darüber hinaus sollten Koimmunopräzipitationsstudien mit der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Mutante von *P. falciparum* mit Strep-Tag markierten PfDPM1-Konstrukt stattfinden, um nähere Erkenntnisse über das Protein und dessen Konfiguration zu gewinnen.

Im Anschluss daran wären Kristallisationsstudien möglich, die weitere Erkenntnisse über das Protein, wie zum Beispiel die Vorhersage einer Tertiärstruktur, ermöglichen.

Ein großer Nachteil stellt jedoch die niedrige Effizienz des Strep-Tag-Systems dar. Die Mengen an Protein, die zur Kristallisation benötigt werden, lassen sich mit diesem System nur schwer gewinnen. Folglich könnte ein neues Konstrukt kloniert werden, welches lediglich eine Flag-Sequenz als Markierung trägt, da Western Blots mit Flag-Markierung etabliert sind und darüber hinaus die Konfiguration des hydrophilen DPM1-Proteins von *P. falciparum* durch diese Markierung nicht behindert wird. Eine Möglichkeit, diese Mutante zu erstellen, besteht in der Modifizierung des bereits klonierten Konstruktes, PfDPM1 mit Gst und Flag markiert in dem Vektor pGTPneo46. Könnte man lediglich die Gst-Sequenz entfernen, sollten bei der späteren Faltung und Expression des Proteins in der Plasmodienkultur keine Interaktionen mehr auftreten.

Um zu belegen, dass die Blockierung der parasitären DPM-Synthase zu dem gewünschten klinischen Ergebnis führt, könnte eine DPM-knock-out-Mutante erstellt werden. Um diese Knock-out-Mutanten zu erhalten ist es möglich, sich der homologen Rekombination zu bedienen. Voraussetzung ist, dass die transferierte DNA identische Sequenzen zum Zielgen besitzt. Daher verwendet man zur Transfektion eine mutierte Sequenz des Zielgens, so dass ein funktionelles Protein nicht exprimiert werden kann. Mit entsprechenden Selektionsmarkern versehen, wird der Parasit „gezwungen“ das Fragment zu integrieren.

Der Einbau von Fremd-DNA an den Orten mit identischer Sequenz ist jedoch gerade bei Plasmodien ein ausgesprochen seltenes Ereignis. Nur etwa 0,1 % der Fremd-DNA wird über homologe Rekombination in einen definierten Locus integriert. In allen anderen Fällen rekombiniert die DNA mit nicht verwandten Sequenzen, was man als „heterologe Rekombination“ bezeichnet.

Aus diesem Grund ist eine Methode zur Anreicherung derjenigen Zellen notwendig, in welchen das seltene Ereignis der homologen Rekombination stattgefunden hat. Bei einem solchen Verfahren wird in das klonierte DPM1-Gen mit den herkömmlichen Methoden das HsdhfrL22Y-Gen eingefügt. Dieses Gen kodiert für die humane Dehydrofolatreduktase und verleiht der Zelle Resistenz gegen den Wirkstoff WR99210 (von Jacobus Pharma, USA, zur Verfügung gestellt). Zusätzlich erweitert man das Ende des Gen-Konstruktes um ein weiteres Selektionsgen, das Thymidin-Kinase-Gen (TK-Gen). Die Selektionswirkung der Thymidin-Kinase beruht auf der Synthese einer zytotoxischen Substanz aus dem Nucleotidanalogon Ganciclovir. Nach der Transfektion dieses Genkonstruktes in die Plasmodium-Kultur ist eine Anreicherung der Parasiten mit homologer Rekombination folgendermaßen möglich: Da der homologe Rekombinationsvorgang zwischen den komplementären Sequenzen in der Regel nicht zur Integration des angehängten TK-Gens führt, besitzen nur die Zellen mit homologer Rekombination gleichzeitig eine Resistenz gegen WR99210 und sind nicht sensitiv gegen Ganciclovir (Positiv-Negativ-Selektion). Die Zellen, bei denen eine heterologe Integration der Fremd-DNA stattgefunden hat, haben in der Regel auch das TK-Gen integriert und sind dadurch sensitiv gegenüber Ganciclovir.

Eine Beurteilung des Versuchsergebnisses könnte sich jedoch als schwierig darstellen, denn falls sich DPM1 tatsächlich als ein essentielles Gen erweist, wären auch die Parasiten mit korrektem Insert nicht lebensfähig.

6.1 ZUSAMMENFASSUNG

Glykosylphosphatidylinositole (GPIs) sind eine Klasse von Glykolipiden, die bei allen Eukaryonten vorkommen (Ferguson *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1988). Die Biosynthese der GPI-Anker erfolgt durch schrittweise Übertragung der einzelnen Zuckerkomponenten auf Phosphatidylinositol. Anschließend wird der GPI-Anker-Vorläufer auf das C-terminale Ende des neu synthetisierten Proteins übertragen, welches in der Membran verankert werden soll (Kinoshita *et al.*, 1997).

Diese Arbeit befasst sich mit der Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase von *Plasmodium falciparum*, einem Enzym, dessen Aktivität lediglich im ER nachgewiesen werden konnte (Czichi & Lennarz, 1977).

Der durch die Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase katalysierte Syntheseschritt besteht in der Übertragung von GDP-Man auf das Polyisoprenoid Dol-P zur Synthese von Dol-P-Man. Dol-P-Man fungiert als Mannosendonator in der GPI-Biosynthese, aber auch der N-Glykosylierung und O-Mannosylierung von Proteinen (Colussi *et al.*, 1997).

Die bekannten Dol-P-Man-Synthase-Sequenzen lassen sich in zwei Klassen unterteilen: DPM1-Proteine der ersten Klasse weisen eine C-terminale hydrophobe Domäne auf, die vermutlich als Transmembrandomäne fungiert. Darüber hinaus sind sie eigenständige Enzyme und entwickeln ohne Untergruppen die volle Enzymaktivität. Enzyme dieser Klasse liegen in Organismen wie *S. cerevisiae*, *T. brucei*, *U. maydis* und *L. mexicana* vor.

Dol-P-Man-Synthasen zweiter Klasse fehlt eine C-terminale hydrophobe Domäne. Sie liegen in *H. sapiens*, der Maus, *S. pombe*, *C. briggsiae* und *T. reesei* vor. Neben dem DPM1-Protein konnten im Menschen noch zwei weitere Untereinheiten identifiziert werden, DPM2 und DPM3, die zur Stabilisierung und Regulation der katalytischen Untereinheit DPM1 beitragen. Um eine Einordnung und Charakterisierung des DPM1-Proteins von *Plasmodium falciparum* zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mutanten erstellt, die Markierungen an diesem Protein tragen. Falls die Dol-P-Man-Synthase dieses Parasiten deutliche Unterschiede zu dem menschlichen Protein aufweisen sollte, könnte man somit ein neues Feld der Antimalariatherapie eröffnen. Das Pfdpm1-Protein konnte in dieser Arbeitsgruppe durch eine computergestützte Analyse der *P. falciparum*-EST-Datenbank bestimmt werden. Für die Analysen der EST-Daten wurde das Sanger Information BLAST Server Computerprogramm (http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/) verwendet.

Ein erster Ansatz zielte auf eine homologe Rekombination des Parasitengenoms ab. Das Konstrukt trug ein mit Gst und Flag markiertes DPM1 Protein von *P. falciparum*, sowie eine

Blasticidin-Resistenz und eine sich an das Fragment anschließende Neomycinresistenz, die nur bei homologer Rekombination und Vorschaltung eines endogenen Plasmodien-Promoters exprimiert werden konnte.

Nach der Transfektion dieses Konstruktes in *Plasmodium-falciparum*-Kultur und Abschluss der Selektion konnten nach anfänglich noch sichtbarem Wachstum keine Parasiten mehr beobachtet werden. Eine mögliche Hypothese, um das Misslingen dieses Versuches zu erklären besteht darin, dass das sehr hydrophobe Gst-Protein das bereits durch Sequenzanalyse nachgewiesene hydrophile PfDPM1-Protein in Faltung und Expression behindert.

Somit wurde ein zweiter Versuchsansatz entwickelt, der eine neue Markierung des PfDPM1-Proteins vorsah und darüber hinaus nicht auf eine homologe Rekombination in das Plasmodien-Genom abzielte, da dies ein sehr seltenes Ereignis ist.

Es wurde ein Konstrukt erstellt, welches das DPM1-Protein von *P. falciparum* durch eine Strep-tag-Markierung mit einem vorgeschalteten Plasmodium-Promoter trug. Außerdem wurde als Selektionsmarker ein Blasticidin-Resistenzgen eingefügt, dem ebenfalls ein Plasmodium-Promoter vorgeschaltet wurde. Somit „zwang“ man die Parasiten nach Transfektion durch Blasticidin-Beigabe zum Nährmedium zwar zur Aufnahme dieses Konstruktes, jedoch musste das Fragment nicht durch endogenes Protein ersetzt werden. Im abschließenden Western-Blot konnte die Markierung nachgewiesen und das DPM1-Protein identifiziert werden.

Die Sequenzanalyse dieses Proteins, der Nachweis seiner hydrophilen Eigenschaft, die Übersicht über durchgeführte Komplementationsversuche und die unergiebigste Suche nach DPM2 und DPM3-Homologen in der *P. falciparum*-EST-Datenbank lässt die Hypothese zu, dass das DPM1-Protein von *P. falciparum* eine Sonderstellung unter den bereits charakterisierten Proteinen einnimmt.

Neben dem DPM1-Gen von *P. falciparum* wurde ebenfalls das DPM1-Gen von *S. cerevisiae* untersucht. Es wurde eine Mutante hergestellt, die ein mit Gst und Flag markiertes ScDPM1-Protein trug. Da diese Hefe in die erste Enzymklasse einzuordnen ist, war nicht zu erwarten, dass die hydrophobe Gst-Sequenz das endogene DPM1-Protein der Hefe in Faltung und Expression behindern würde. Das Fragment wurde in den Hefe-Shuttle-Vektor pRS426 kloniert und mit *dpm1*-Hefe-Mangelmутanten transformiert. Alle transformierten Hefezellen wuchsen auf Galaktose-Selektivplatten ohne Uracil, was zeigt, dass diese Zellen das Plasmid pRS426 aufgenommen hatten.

6.2 SUMMARY

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) represents a complex glycolipid which plays an important role as anchoring molecule for cell surface proteins. The biosynthesis of these molecules is a complex process which involves step-by-step transfer of single sugar components to phosphatidylinositol. The GPI-precursor molecule will later be attached to the C-terminus of a vast range of cell surface proteins such as exoenzymes like alkaline phosphatase, adhesion molecules and complement regulatory proteins.

This work concentrates on dolichol phosphate mannose synthase of *Plasmodium falciparum*, an enzyme which shows its activity in the ER compartment (Czichi & Lennarz, 1977, Delorenzi *et al.*, 2002).

Dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) is formed by transfer of mannose from GDP-Mannose to dolichol phosphate, a step which is catalysed by the Dol-P-Man-synthase.

Dol-P-Man functions as a mannosyl donor in pathways leading to glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, N-glycosylation and O-mannosylation of protein. The known sequences of dolichol phosphate mannose synthases (DPM1) are divided into two groups (Colussi *et al.*, 1997): The first group includes DPM1 proteins of *S. cerevisiae*, *U. maydis*, *T. brucei* and *L. mexicana*. It is characterized by a hydrophobic C-terminal domain which functions as typical integral membrane protein. DPM1 proteins of the first group show synthase activity in *E. coli* indicating that they are DPM synthase itself (Maeda *et al.*, 1998). Members of the second group are *H. sapiens*, *T. reesei*, *S. pombe*, mouse and *C. briggsiae*. DPM1 proteins of this group lack a C-terminal hydrophobic protein and do not function in *S. cerevisiae* (Colussi *et al.*, 1997). The Dol-P-Man-synthase of *H. sapiens* consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3, which guarantee the stable expression and regulation of the catalytic unit DPM1.

To achieve further information about the DPM1-Protein of *P. falciparum*, mutants of this organism were made which show a marker sequence at the DPM1 Protein. If the DPM1 protein of the parasite showed differences to its human counterpart a new field of antimalarial therapy could be opened.

The PfDPM1 gene was identified in this group by analysing the *P. falciparum*-EST-data and the Sanger Information BLAST Server computer program.

The first experiment was thought to achieve a homologous recombination, a very rare process in this organism. The construct had a *gst* and flag marker sequence at the DPM1 protein,

furthermore it showed a blasticidin- and a neomycin resistance gene. While the blasticidin resistance gene could be expressed after taking up the plasmid, the neomycin resistance could only be expressed after homologous recombination and use of an endogenous promoter of *Plasmodium* itself. After transfection and selection with these two drugs, no parasites could be seen in the daily blood smear control. One possible explanation for the failing of this experiment is, that DPM1 of *Plasmodium* could be characterized as a very hydrophilic protein. As a consequence, an interaction between the hydrophobic *gst* and the hydrophilic endogenous protein can not be ruled out. Therefore, a second experiment was developed. Instead of the *gst* and flag marker sequences, a neutral marker sequence, strep-tag, was used. Besides, a homologous recombination was no longer necessary as the construct was cloned with two *Plasmodium* promoters, one to guarantee the expression of a blasticidin resistance gene and another promoter to control the DPM1 protein. Therefore, a selection with blasticidin was possible. This project aimed at the amplification of DPM1 in the organism itself to allow further investigations with high amounts of this protein. The taking up of the plasmid was controlled by a western blot which showed the labelled DPM1 protein. The sequence analysis of this protein, the hydrophilic characteristics, the summary of the complementation experiments, the fact that *gst* seems to interfere with the hydrophilic DPM1-protein and the failing of finding homologous subunits to HsDPM2 and HsDPM3 in *P. falciparum* (by using the *P. falciparum*-EST-data) lead to the conclusion that this protein is unique among the DPM-Synthases.

Besides, the DPM1 protein of *S. cerevisiae* was also examined. A construct was cloned which shows the DPM1 gene with a *gst* and flag marker sequence in a yeast shuttle vector called pRS426. Those cells growing on SD agar without uracil seemed to have taken up the construct. As expected, the hydrophobic *gst* sequence did not interfere with the ScDPM1 protein and bakers yeast was able to grow with only one subunit of the mammalian gene.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas** AK, Murphy KM, Sher A. (1996).
Functional diversity of helper T lymphocytes.
Nature. 31;383(6603):787-93.
- Abeijon C, Hirschberg CB.** (1992) .
Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum.
Trends Biochem Sci.;17(1):32-6.
- Adams** JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M, Miller LH. (1990).
The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites.
Cell. 5;63(1):141-53.
- Aikawa** M, Iseki M, Barnwell JW, Taylor D, Oo MM, Howard RJ. (1990)
The pathology of human cerebral malaria.
Am J Trop Med Hyg. 43(2 Pt 2):30-7.
- Akira** S, Takeda K, Kaisho T. (2001)
Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.
Nat Immunol;2(8):675-80.
- Albert** S, Schroter A, Bratzke H, Brade V. (1995)
Postmortem diagnosis of tropical malaria
Dtsch Med Wochenschr. 5;120(1-2):18-22.
- Ali** A, Gowda DC, Vishwakarma RA (2005).
A new approach to construct full-length glycosylphosphatidylinositols of parasitic protozoa and [4-deoxy-Man-III]-GPI-analogues.
Chem Commun (Camb). 28; (4):519-21 Epub 2004
- Allen** SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Alpers MP, Peto TE, Clegg JB, Weatherall DJ. (1997).
Alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria.
Proc Natl Acad Sci U S A. 23;94(26):14736-41.
- Almeida** IC, Camargo MM, Procopio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR, Gazzinelli RT, Ferguson MA. (2000)
Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent Proinflammatory agents.
EMBO J 3;19(7):1476-85.
- Almeida** IC, Gazzinelli RT. (2001)
Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses.
J Leukoc Biol. 70 (4): 467-77.
- Ashida** H, Maeda Y, Kinoshita T (2006).
DPM1, the catalytic subunit of dolichol-phosphate mannose synthase, is tethered to

and stabilized on the endoplasmatic reticulum membrane by DPM3.
J Biol Chem. 13; 281(2):896-904.

AWMF online (2002).

Diagnostik und Therapie der Malaria.
Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationalen
Gesundheit (DTG)
<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/11/trop0011.htm>

AWMF online (2000)

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)
Leitlinien Kinderheilkunde und Jugendmedizin
<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/11/027-010.htm>

Baeuerle PA. (1991)

The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein
subunits.
Biochim Biophys Acta. 16;1072(1):63-80

Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S.
(1991). Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people
having two years exposure to hyperendemic malaria.
Am J Trop Med Hyg. ;45(1):65-76.

Baird JK. (1995) Host Age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium*
falciparum.
Parasitol Today. ;11(3):105-11.

Bangs JD, Hereld D, Krakow JL, Hart GW, Englund PT. (1985)

Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface
glycoprotein.
Proc Natl Acad Sci U S A. ;82(10):3207-11

Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH. (2000)

Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic
schizonts.
Parasitology. ;121 (Pt 3):273-87.

Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. (1989)

A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a
Cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.
J Clin Invest. ;84(3):765-72.

Baruch DI, Ma XC, Singh HB, Bi X, Pasloske BL, Howard RJ. (1997)

Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium*
falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence.
Blood. 1;90(9):3766-75.

Basco, L.K., Ruggeri, C. & Le Bras, J. (1994). Molécules Antipaludiques: Mécanismes
d'Action; Mécanismes de Résistance ; Relations structure-Activité des Schizontocides
Sanguins. Paris, Milan, Barcelona : Masson

- Beck PJ, Orlean P, Albright C, Robbins PW, Gething MJ, Sambrook JF. (1990).**
The *Saccharomyces cerevisiae* DPM1 gene encoding dolichol-phosphate-mannose synthase is able to complement a glycosylation-defective mammalian cell line.
Mol Cell Biol.;10(9):4612-22.
- Benachour A, Sipos G, Flury I, Reggiori F, Canivenc-Gansel E, Vionnet C, Conzelmann A, Benghezal M. (1999)**
Deletion of GPI7, a yeast gene required for addition of a side chain to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure, affects GPI protein transport, remodeling, and cell wall integrity.
J Biol Chem. 21;274(21):15251-61
- Benghezal M, Benachour A, Rusconi S, Aebi M, Conzelmann A. (1996)**
Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins.
EMBO J. 2;15(23):6575-83
- Berendt AR, Tumer GD, Newbold CI. (1994)**
Cerebral malaria: The sequestration hypothesis
Parasitol Today.;10(10):412-4.
- Berendt AR, Ferguson DJ, Gardner J, Turner G, Rowe A, McCormick C, Roberts D, Craig A, Pinches R, Elford BC, et al. (1994)**
Molecular mechanisms of sequestration in malaria.
Parasitology.;108 Suppl:S19-28.
- Bienze U, Ayeni O, Lucas AO, Luzzatto L (1972).**
Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant.
Lancet 1:107.
- Boccuni P, Del Vecchio L, Di Noto R, Rotoli B. (2000)**
Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Crit Rev Oncol Hematol. ;33(1):25-43.
- Boch J und Supperer R (1992).** Veterinärmedizinische Parasitologie. Pauer Parey, Berlin und Hamburg, 4. Auflage.
- Boonpucknavig V, Boonpucknavig S, Udomsangpetch R, Nitiyanant P. (1990)**
An immunofluorescence study of cerebral malaria. A correlation with histopathology.
Arch Pathol Lab Med. ;114(10):1028-34.
- Boutlis CS, Gowda DC, Naik RS, Maguire GP, Mgone CS, Bockarie MJ, Lagog M, Ibam E, Lorry K, Anstey NM. (2002)**
Antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults.
Infect Immun. ;70(9):5052-7.
- Bradley, DJ, Newbold CI und Warrell DA (1990).** Malaria. Infektionskrankheiten.

Warrell DA (Hrsg.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

- Brightbill** HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. (1999)
Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors.
Science. 30;285(5428):732-6.
- Brown** H, Hien TT, Day N, Mai NT, Chuong LV, Chau TT, Loc PP, Phu NH, Bethell D, Farrar J, Gatter K, White N, Turner G. (1999)
Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria.
Neuropathol Appl Neurobiol. ;25(4):331-40
- Bruce-Chwatt**, LJ (1985a). Essential malariology.
Heinemann Medical books, London
- Bruce-Chwatt** LJ. (1985b). Malaria, the growing medical and health problem.
Drugs Exp Clin Res. 11(12):899-909.
- Campos** MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. (2001)
Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite.
J Immunol. 1;167(1):416-23.
- Cappadoro** M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L, Arese P. (1998)
Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency.
Blood. 1;92(7):2527-34.
- Carter** R, Mendis KN. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):564-94.
Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria
Clin Microbiol Rev. 2003 ;16(1):173.
- Cavalli-Sforza** LL., Menozzi P, Piazza, A (1994).
The history and geography of human genes.
Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Chen** R, Walter EI, Parker G, Lapurga JP, Millan JL, Ikehara Y, Udenfriend S, Medof ME. (1998)
Mammalian glycosylphosphatidylinositol anchor transfer to proteins and posttransfer deacylation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 4;95(16):9512-7.
- Chen** Q, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Datta S, Hagblom P, Wahlgren M. 1998
Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*.
Nature. 23;394(6691):392-5.

- Cheng** TC. (1986).
General Parasitology, Phylum Apicomplexa
second Edition, Academic Press, Inc., London, pp 193-204
- Ciuca**, M., L. Ballif, and M. Chelarescu-Vieru. (1934).
Immunity in malaria.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **27**:619–622.
- Clark** IA, Rockett KA. (1994) The cytokine theory of human cerebral malaria.
Parasitol Today.;10(10):410-2.
- Clark** IA, Chaudhri G, Cowden WB. (1989)
Roles of tumour necrosis factor in the illness and pathology of malaria.
Trans R Soc Trop Med Hyg. ;83(4):436-40.
- Clarke** BL, Naylor C, Lennarz WJ (1989)
Comparative studies on mannosylphosphoryl dolichol and glucosylphosphoryl
dolichol synthases.
Chem Phys Lipids.;51(3-4):239-47.
- Clayton** C, Hausler T, Blattner J. (1995).
Protein trafficking in kinetoplastid protozoa.
Microbiol Rev. 59(3):325-44.
- Coatney** GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. (1971).
The Primate Malarias.
Bethesda: U.S. Department of Health, Education and Welfare
- Collins** WE, Sullivan JS, Nace D, Williams T, Williams A, Galland GG, Barnwell JW. (2004)
Additional observations on the sporozoite transmission of *Plasmodium knowlesi* to
monkeys.
J Parasitol.;90(4):866-7.
- Colussi** PA, Taron CH, Mack JC, Orlean P. (1997)
Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases
represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces*
pombe.
Proc Natl Acad Sci U S A. 22;94(15):7873-8.
- Corpet** F (1988)
Multiple sequence alignment with hierarchical clustering
Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890)
- Cox** MJ, Kum DE, Tavul L, Narara A, Raiko A, Baisor M, Alpers MP, Medley
GF, Day KP. (1994)
Dynamics of malaria parasitaemia associated with febrile illness in children
from a rural area of Madang, Papua New Guinea.
Trans R Soc Trop Med Hyg.;88(2):191-7.
- Crans** WJ (1992). A history of malaria in New Jersey. Proceedings of the Seventy-Ninth
Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Control Association, Inc. 115-122.

- Crawley J, Nahlen B. (2004).**
Prevention and treatment of malaria in young African children.
Semin Pediatr Infect Dis.;15(3):169-80.
- Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A (1997)**
Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method.
Prot. Eng. vol. 10, no. 6, 673-676.
- Czichi U, Lennarz WJ. (1977)**
Localization of the enzyme system for glycosylation of proteins via the lipid-linked pathway in rough endoplasmic reticulum.
J Biol Chem. 25;252(22):7901-4.
- Darko CA, Angov E, Collins WE, Bergmann-Leitner ES, Girouard AS, Hitt SL, McBride JS, Diggs CL, Holder AA, Long CA, Barnwell JW, Lyon JA (2005)**
The clinical grade 42-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* strain FVO expressed in *Escherichia coli* protects *Aotus Nancymai* against challenge with homologous erythrocytic-stage parasites.
Infect Immun. 73 (1): 287-97.
- David PH, Handunnetti SM, Leech JH, Gamage P, Mendis KN. (1988)**
Rosetting: a new cytoadherence property of malaria-infected erythrocytes.
Am J Trop Med Hyg. ;38(2):289-97.
- Davidson RC, Nett JH, Renfer E, Li H, Stadheim TA, Miller BJ, Miele RG, Hamilton SR, Choi BK, Mitchell TI, Wildt S. (2004)**
Functional analysis of the ALG3 gene encoding the Dol-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransferase enzyme of *P. pastoris*.
Glycobiology.;14(5):399-407. Epub 2004 Mar 19.
- Debierre-Grockiego F, Azzouz N, Schmidt J, Dubremetz JF, Geyer H, Geyer R, Weingart R, Schmidt RR, Schwarz RT. (2003)**
Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages.
J Biol Chem. 29;278(35):32987-93. Epub 2003 Jun 18.
- Delabays, N., Benakis, A., and Collet, G. (1993).** Selection and breeding for high artemisinin (qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua*.
Ann. Hort. 330: 203-206)
- Delorenzi M, Sexton A, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Speed T, Schofield L. (2002)**
Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*.
Infect Immun. ;70(8):4510-22.
- Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin (2002)**
Leitlinien „Diagnostik und Therapie der Malaria“
- Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin (2004)**
Leitlinien und Empfehlungen „Malaria“

- Djimde A**, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D. (2001)
A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria.
N Engl J Med. 25;344(4):257-63.
- Doering TL**, Schekman R. (1996)
GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles.
EMBO J. 2;15(1):182-91.
- Doering TL**, Masterson WJ, Englund PT, Hart GW. (1989)
Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine.
J Biol Chem. 5;264(19):11168-73.
- Dönges J.** (1988). Parasitologie. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Dorman EK**, Shulman CE, Kingdom J, Bulmer JN, Mwendwa J, Peshu N, Marsh K. (2002)
Impaired uteroplacental blood flow in pregnancies complicated by falciparum malaria.
Ultrasound Obstet Gynecol. ;19(2):165-70.
- Dorsey G**, Gandhi M, Oyugi JH, Rosenthal PJ (2000).
Difficulties in the prevention, diagnosis, and treatment of imported malaria.
Arch Intern Med. 11;160(16):2505-10.
- Duffy PE**, Fried M. (2003a)
Antibodies that inhibit Plasmodium falciparum adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns.
Infect Immun.;71(11):6620-3.
- Dvorak JA**, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. (1975)
Invasion of erythrocytes by malaria merozoites.
Science. 28;187(4178):748-50.
- Eckstein-Ludwig U**, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. (2003)
Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum.
Nature. 21;424(6951):957-61.
- Elmendorf HG**, Haldar K. (1993)
Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite Plasmodium falciparum: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi.
EMBO J. ;12(12):4763-73.
- Enderle T**, Ha T, Ogletree DF, Chemla DS, Magowan C, Weiss S. (1997)
Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy.
Proc Natl Acad Sci U S A. 21;94(2):520-5.

- Englund PT.** (1993).
The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors.
Annu Rev Biochem.;62:121-38.
- Ferguson MA, Cross GA.** (1984)
Myristylation of the membrane form of a Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.
J Biol Chem. 10;259(5):3011-5.
- Ferguson MA, Low MG, Cross GA.** (1985)
Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.
J Biol Chem. 25;260(27):14547-55.
- Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW.** (1988).
Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane.
Science. 12;239(4841 Pt 1):753-9.
- Ferguson, MA** (1999)
The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors and the contribution of trypanosome research
J Cell Sci. 112: 2799-2809
- Ferguson, MA** (2000)
Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African Sleeping illness.
Proc Natl Acad Sci USA. 97: 121-138.
- Ferreira, J. E. S. and Janick, J.** (1996). Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. In: Janick J. (ed.): Progress in new crops. ASH Press, Arlington VA., S. 579-584
- Field MC, Menon AK** (1992).
Biosynthesis of glycosylphosphatidyl inositol membrane protein anchors.
Lipid modification of proteins.
Eds.: Hooper NM, Turner AJ, Oxford, 155-190
- Field M.C., Menon, A.K.** (2002)
Glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored proteins.
The Encycl. Molecular Medicine.
editor T.E. Creighton; publisher, Wiley & Sons, Inc pp 1497-1501.
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB.** (1993)
The population genetics of the haemoglobinopathies.
Baillieres Clin Haematol. ;11(1):1-51.
- Flury I, Benachour A, Conzelmann A.** (2000)
YLL031c belongs to a novel family of membrane proteins involved in the transfer of ethanolaminephosphate onto the core structure of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast.
J Biol Chem. 11;275(32):24458-65.

- Freeze HH.** (1998)
Disorders in protein glycosylation and potential therapy: tip of an iceberg?
J Pediatr.;133(5):593-600.
- Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V.** (1993)
Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes.
J Exp Med. 1;177(5):1287-98.
- Fried M, Duffy PE.** (1996)
Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta.
Science. 7;272(5267):1502-4.
- Friedman MJ.** (1978)
Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria.
Proc Natl Acad Sci U S A. ;75(4):1994-7.
- Furchgott RF, Zawadzki JV.** (1980)
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature. 27;288(5789):373-6.
- Garcia-Silva MT, Matthijs G, Schollen E, Cabrera JC, Sanchez del Pozo J, Marti Herreros M, Simon R, Maties M, Martin Hernandez E, Hennet T, Briones P.** (2004)
Congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ie. A new patient.
J Inherit Metab Dis.;27(5):591-600.
- Gaynor EC, Mondesert G, Grimme SJ, Reed SI, Orlean P, Emr SD** (1999).
MCD4 encodes a conserved endoplasmic reticulum membrane protein essential for glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in yeast.
Mol Biol Cell. ;10(3):627-48.
- Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA.** (2004).
Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites.
Immunol Rev. ;201:9-25.
- Geigy,R. Herbig, A.** (1955):
Acta Tropica, Suppl. 6, Verlag f. Recht und Gesellschaft AG Basel.
- Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, Schwarz RT.** (1996b)
Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of Plasmodium falciparum.
Mol Biochem Parasitol. ;75(2):131-43.
- Gerold P, Dieckmann-Schuppert A, Schwarz RT.** (1994)
Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, Plasmodium falciparum. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors.
J Biol Chem. 28;269(4):2597-606.

Gerold, P (1995)

Identifizierung und Charakterisierung von freien und proteingebundenen Glycosyl-Phosphatidylinositolen der asexuellen, erythrozytären Stadien des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*.
Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Gilles HM, Fletcher KA, Hendrickse RG, Lindner R, Reddy S, Allan N. (1967)

Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria.
Lancet. 21;1(7482):138-40.

Goerg H, Ochola SA, Goerg R. (1999)

Treatment of malaria tropica with a fixed combination of rifampicin, co- trimoxazole and isoniazid: a clinical study.
Chemotherapy. ;45(1):68-76.

Goman M, Langsley G, Hyde JE, Yankovsky NK, Zolg JW, Scaife JG. (1982)

The establishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and identification of individual clones by hybridisation.
Mol Biochem Parasitol. ;5(6):391-400.

Gowda DC, Gupta P, Davidson EA. (1997)

Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage *Plasmodium falciparum*.
J Biol Chem. 7;272(10):6428-39.

Gowda DC. (2002)

Structure and activity of glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*.
Microbes Infect. 4(9):983-90.

Grau GE, Del Giudice G, Lambert PH. (1987)

Host immune response and pathological expression in malaria: possible implications for malaria vaccines.
Parasitology. ;94 Suppl:S123-37.

Greene LS. (1993)

G6PD deficiency as protection against *falciparum* malaria:
An epidemiologic critique of population and experimental studies.
Year Phys Anthropol 36:153

Greenwood BM. (1997)

Malaria transmission and vector control.
Parasitol Today.;13(3):90-2.

Greenwood B, Mutabingwa T. (2002)

Malaria in 2002.
Nature. 7;415(6872):670-2.

Greenwood Genetic Center (2004)

Congenital disorders of Glycosylation

<http://www.ggc.org/Diagnostics/Biochemical/glycosylation.htm>

Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ. (1993)

NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system.

Int Rev Cytol.;143:1-62.

Grimme SJ, Westfall BA, Wiedman JM, Taron CH, Orlean P. (2001)

The essential Smp3 protein is required for addition of the side-branching fourth mannose during assembly of yeast glycosylphosphatidylinositols.

J Biol Chem. 20;276(29):27731-9. Epub 2001 May 16.

Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. (1999)

Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections.

Nat Med. ;5(3):340-3.

Haldane, JBS. (1948).

The rate of mutation of human genes.

Hereditas 35 (Suppl.): 267-273.

Hamblin MT, Di Rienzo A.. (2000)

Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus.

Am J Hum Genet;66(5):1669-79. Epub 2000 Apr 12.

Hamburger D, Egerton M, Riezman H. (1995)

Yeast Gaalp is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins.

J Cell Biol. ;129(3):629-39.

Herscovics A, Orlean P. (1993)

Glycoprotein biosynthesis in yeast.

FASEB J. 1;7(6):540-50.

Higgs DR. (1993)

Alpha-Thalassaemia.

Baillieres Clin Haematol. Mar;6(1):117-50.

Hill, A. (1992)

Trends in childhood mortality in sub-Saharan mainland Africa,

p. 10–31. In E. van de Walle, G. Pison, and M. Sala-Diakanda (ed.),

Mortality and society in sub-Saharan Africa. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Holder AA, Freeman RR. (1981)

Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens.

Nature. 26;294(5839):361-4.

- Holder** AA, Freeman RR. (1982)
Biosynthesis and processing of a Plasmodium falciparum schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody.
J Exp Med. 1;156(5):1528-38.
- Holder** AA, Lockyer MJ, Odink KG, Sandhu JS, Riveros-Moreno V, Nicholls SC, Hillman Y, Davey LS, Tizard ML, Schwarz RT, et al. (1985)
Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of Plasmodium falciparum merozoites.
Nature. 19-25;317(6034):270-3.
- Holder** AA, Guevara Patiño JA, Uthaipibull C, Syed SE, Ling IT, Scott-Finnigan T, Blackman MJ (1999)
Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria.
Parasitologia. 41(1-3):409-14.
- Holding** PA, Snow RW. (2001)
Impact of Plasmodium falciparum malaria on performance and learning: review of the evidence.
Am J Trop Med Hyg. ;64(1-2 Suppl):68-75.
- Holding** PA, Stevenson J, Peshu N, Marsh K. (1999)
Cognitive sequelae of severe malaria with impaired consciousness.
Trans R Soc Trop Med Hyg. ;93(5):529-34.
- Homans** SW, Edge CJ, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW. (1989)
Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.
Biochemistry. 4;28(7):2881-7.
- Hong** Y, Ohishi K, Watanabe R, Endo Y, Maeda Y, Kinoshita T. (1999)
GPII stabilizes an enzyme essential in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis.
J Biol Chem. 25;274(26):18582-8.
- Hooper** NM. (1997)
Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes.
Clin Chim Acta. 266: 3-12.
- Horuk** R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. (1993)
A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor.
Science. 27;261(5125):1182-4.
- Hoshino** K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. (1999)
Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.
J Immunol. 1;162(7):3749-52.

- Hou LJ, Raju SS, Abdulah MS, Nor NM, Ravichandran M. (2004)**
Rifampicin antagonizes the effect of chloroquine on chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* in mice.
Jpn J Infect Dis.;57(5):198-202.
- HUSAR** : (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources)
http://www.genome.dkfz-heidelberg.de/menu/biounit/databases_husar.html
- Ikezawa H. (1997)**
Molecular biology of the GPI-anchored proteins
Nippon Saikingaku Zasshi. ;52(2):435-59.
- Ikezawa H. (1999)**
Development from actions of bacterial phospholipases C on eucaryotic plasma membranes to molecular biology of GPI-anchored proteins
Yakugaku Zasshi.;119(7):472-94.
- Ilgoutz SC, Zawadzki JL, Ralton JE, McConville MJ. (1999)**
Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*.
EMBO J. 17;18(10):2746-55.
- Inoue N, Watanabe R, Takeda J, Kinoshita T. (1996)**
PIG-C, one of the three human genes involved in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* GPI2.
Biochem Biophys Res Commun. 4;226(1):193-9.
- Jaeken J, Stibler H, Hagberg B. (1991)**
The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement.
Acta Paediatr Scand Suppl.;375:1-71.
- Janik A, Sosnowska M, Kruszewska J, Krotkiewski H, Lehle L, Palamarczyk G. (2003)**
Overexpression of GDP-mannose pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae* corrects defects in dolichol-linked saccharide formation and protein glycosylation.
Biochim Biophys Acta. 7;1621(1):22-30.
- Jarolim P, Palek J, Amato D, Hassan K, Sapak P, Nurse GT, Rubin HL, Zhai S, Sahr KE, Liu SC. (1991)**
Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 15;88(24):11022-6.
- Jeffrey, G. M. (1966)**
Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*.
Bull. W. H. O. 35:873-872.

- Jhaveri** KN, Ghosh K, Mohanty D, Parmar BD, Surati RR, Camoens HM, Joshi SH, Iyer YS, Desai A, Badakere SS. (1997)
Autoantibodies, immunoglobulins, complement and circulating immune complexes in acute malaria.
Natl Med J India. ;10(1):5-7.
- Kadekoppala** M, Cheresch P, Catron D, Ji DD, Deitsch K, Wellems TE, Seifert HS, Haldar K. (2001)
Rapid recombination among transfected plasmids, chimeric episome formation and trans gene expression in *Plasmodium falciparum*.
Mol Biochem Parasitol. ;112(2):211-8.
- Kar** S, Seth S, Seth PK. (1992)
Prevalence of malaria in Ao Nagas and its association with G6PD and HbE.
Hum Biol.;64(2):187-97.
- Kasahara** K, Sanai Y. (2000)
Functional roles of glycosphingolipids in signal transduction via lipid rafts.
Glycoconj J. ;17(3 -4):153-62.
- Kerr** C. (2001)
Malaria vaccine news.
Microbiol. 9 : 202.
- Kihn** L, Rutkowski D, Stinson RA. (1990)
Incorporation of human liver and placental alkaline phosphatases into liposomes and membranes is via phosphatidylinositol.
Biochem Cell Biol. ;68(9):1112-8.
- Kim** S, Westphal V, Srikrishna G, Mehta DP, Peterson S, Filiano J, Karnes PS, Patterson MC, Freeze HH. (2000)
Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ia (CDG-Ia).
J Clin Invest.;105(2):191-8.
- Kinoshita** T, Inoue N. (2000)
Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis.
Curr Opin Chem Biol.;4(6):632-8.
- Kinoshita** T, Ohishi K, Takeda J. (1997)
GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency.
J Biochem (Tokyo). ;122(2):251-7.
- Knell** AJ. (1991). Malaria.
Oxford university press, Oxford
- Kornfeld** R, Kornfeld S. (1985)
Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.
Annu Rev Biochem.;54:631-64.

- Krasnewich D, Gahl WA. (1997)**
Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome.
Adv Pediatr.;44:109-40.
- Krishna S, Uhlemann AC, Haynes RK. (2004)**
Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance.
Drug Resist Updat. ;7(4-5):233-44.
- Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC. (2005)**
Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity.
J Biol Chem. 280(9):8606-16. Epub 2004
- Kruatrachue M., Charoenlarp P., Chongsuphajaisiddhi T., Harinasuta C. (1962)**
Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria in Thailand.
Lancet. 8;2:1183-6.
- Kruszewska JS, Saloheimo M, Migdalski A, Orlean P, Penttila M, Palamarczyk G. (2000)**
Dolichol phosphate mannose synthase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* belongs to the human and *Schizosaccharomyces pombe* class of the enzyme.
Glycobiology. ;10(10):983-91.
- Laemmli UK. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 15;227(5259):680-5.
- Learngaramkul P, Petmitr S, Krungkrai SR, Prapunwattana P, Krungkrai J. (1999)**
Molecular characterization of mitochondria in asexual and sexual blood stages of *Plasmodium falciparum*.
Mol Cell Biol Res Commun.;2(1):15-20.
- Lee J, Seymour H und Eugene CB. (1985)**
An illustrated guide to the protozoa. Society of protozoologists
P.O. Box 368, Lawrence, Kansas 66044 USA
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. (1999)**
Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products.
J Biol Chem. 19;274(47):33419-25.
- Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E. (1990)**
Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells.
Trends Biochem Sci. ;15(3):113-8.

- Liu H**, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM. (2000)
TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta.
J Immunol. 15;164(8):4277-85.
- Livingstone FB**, (1967).
Abnormal hemoglobins in human populations.
Aldine, Chicago, Ill.
- Livingstone, FB.** (1971)
Malaria and human polymorphisms.
Annu. Rev. Genet. 5:33-64.
- Low MG.** (1987)
Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors.
Biochem J. 244: 1-13
- Lu J**, Jayaprakash KN, Schlueter U, Fraser-Reid B. (2004)
Synthesis of a malaria candidate glycosylphosphatidylinositol (GPI) structure: a strategy for fully inositol acylated and phosphorylated GPIs.
J Am Chem Soc. 23;126(24):7540-7.
- Lucius, R und Loos-Frank, B.** (1997)
Parasitologie. Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner.
Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl., pp. 97-100
- Lusingu JP**, Vestergaard LS, Mmbando BP, Drakeley CJ, Jones C, Akida J, Savaeli ZX, Kitua AY, Lemnge MM, Theander TG. (2004)
Malaria morbidity and immunity among residents of villages with different Plasmodium falciparum transmission intensity in North-Eastern Tanzania.
Malar J. 28;3(1):26.
- Luzzatto L.** (1979)
Genetics of red cells and susceptibility to malaria.
Blood. ;54(5):961-76.
- MacDonald, G.** (1957).
The epidemiology and control of malaria.
Oxford University Press, London, United Kingdom.
- Maeda Y**, Tomita S, Watanabe R, Ohishi K, Kinoshita T. (1998)
DPM2 regulates biosynthesis of dolichol phosphate-mannose in mammalian cells: correct subcellular localization and stabilization of DPM1, and binding of dolichol phosphate.
EMBO J. 1;17(17):4920-9.
- Maeda Y**, Tanaka S, Hino J, Kangawa K, Kinoshita T. (2000)
Human dolichol-phosphate-mannose synthase consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3
EMBO J. 1;19(11):2475-82.

- Maeda Y**, Watanabe R, Harris CL, Hong Y, Ohishi K, Kinoshita K, Kinoshita T. (2001)
PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the lumenal side of the ER.
EMBO J. 15;20(1-2):250-61.
- Maerki S**, Brun R, Charman SA, Dorn A, Matile H, Wittlin S. (2006)
In vitro assessment of the pharmacodynamic properties and the partitioning of OZ277/RBx-11160 in cultures of *Plasmodium falciparum*
J Antimicrob Chemother. 58(1): 52-58
- Magez S**, Stijlemans B, Radwanska M, Pays E, Ferguson MA, De Baetselier P. (1998)
The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors.
J Immunol. 15;160(4):1949-56.
- Mandel M**, Higa A. (1970)
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.
J Mol Biol. 14;53(1):159-62.
- Mason SJ**, Miller LH, Shiroishi T, Dvorak JA, McGinniss MH. (1977)
The Duffy blood group determinants: their role in the susceptibility of human and animal erythrocytes to *Plasmodium knowlesi* malaria.
Br J Haematol. 36(3):327-35.
- Masterson WJ**, Doering TL, Hart GW, Englund PT. (1989)
A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein.
Cell. 10;56(5):793-800.
- Mazhari-Tabrizi R**, Eckert V, Blank M, Muller R, Mumberg D, Funk M, Schwarz RT. (1996)
Cloning and functional expression of glycosyltransferases from parasitic protozoans by heterologous complementation in yeast: the dolichol phosphate mannose synthase from *Trypanosoma brucei brucei*.
Biochem J. 15;316 (Pt 3):853-8.
- Mazier D**, Nitchou J, Idrisse-Boubou M (2000)
Cerebral malaria and immunogenetics.
Parasite. Immunol. 22(12):613-23.
- McConville MJ**, Ferguson MA. (1993)
The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes.
Biochem J. 1;294 (Pt 2):305-24.
- McConville MJ**, Menon AK. (2000)
Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review).
Mol Membr Biol. 17(1):1-16

- McGeoch DJ** (1985)
Prediction of Signal Sequences- PSORT Prediction
Virus Research, 3, 271
- McGuffin LJ**, Bryson K, Jones DT. (2000)
Bioinformatics. 16, 404-405
- Medana IM**, Chaudhri G, Chan-Ling T, Hunt NH. (2001)
Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology?
Immunol Cell Biol. ;79(2):101-20.
- Mehlhorn H** und Walldorf V. (1988)
Life cycles.
Parasitology in Focus, ed.: Mehlhorn, 1-143.
- Mehlotra RK**, Lorry K, Kastens W, Miller SM, Alpers MP, Bockarie M, Kazura JW, Zimmerman PA. (2000)
Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea.
Am J Trop Med Hyg.;62(2):225-31.
- Meis JF**, Jap PH, Verhave JP, Meuwissen JH. (1983)
Ultrastructural studies of a vesicle system associated with endoplasmic reticulum in exo-erythrocytic forms of *Plasmodium berghei*.
J Protozool. ;30(1):111-4.
- Mendis KN**, David PH, Carter R. (1991)
Antigenic polymorphism in malaria: is it an important mechanism for immune evasion?
Parasitol Today. ;7(3):34-7.
- Menendez C**, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Font F, Alonso PL. (2000)
The impact of placental malaria on gestational age and birth weight.
J Infect Dis. ;181(5):1740-5. Epub 2000 May 15.
- Menon AK**, Mayor S, Schwarz RT. (1990)
Biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei*: involvement of mannosyl-phosphoryldolichol as the mannose donor.
EMBO J.;9(13):4249-58.
- Menon AK**, Eppinger M, Mayor S, Schwarz RT. (1993)
Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminal phosphoethanolamine group in trypanosome glycosylphosphatidylinositols.
*EMBO J.*12(5):1907-14.
- Menon AK**, Vidugiriene J. (1994)
Topology of GPI biosynthesis in the endoplasmic reticulum.
Braz J Med Biol Res. ;27(2):167-75.

- Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. (1996)**
Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy.
Microbiol Rev. ;60(2):301-15.
- Meshnick SR. (2002)**
Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity.
Int J Parasitol. 4;32(13):1655-60.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. (1976)**
The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy.
N Engl J Med. 5;295(6):302-4.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. (2002)**
The pathogenic basis of malaria.
Nature. 7;415(6872):673-9.
- Misek DE, Saltiel AR. (1992)**
An inositol phosphate glycan derived from a *Trypanosoma brucei* glycosyl-phosphatidylinositol mimics some of the metabolic actions of insulin.
J Biol Chem. 15;267(23):16266-73.
- Miyata T, Yamada N, Iida Y, Nishimura J, Takeda J, Kitani T, Kinoshita T. (1994)**
Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
N Engl J Med. 27;330(4):249-55.
- Modellierer-Gruppe**
Infektionsepidemiologie und Interventionsstrategien
Universität Tübingen
http://www.uni-tuebingen.de/modeling/Mod_Malaria_Cycle_de.html
- Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpoire J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, D'Urbano L, Sanou I, Sawadogo A, Modiano G, Coluzzi M. (2001)**
Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria.
Nature. 15;414(6861):305-8.
- Mohsen AH, Green ST, West JN, McKendrick MW. (2001)**
Myocarditis associated with *Plasmodium falciparum* malaria: a case report and a review of the literature.
J Travel Med. ;8(4):219-2
- Molineaux L. (1988)**
The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control.
In: Wernsdorfer WH, McGregor I, (editors) . *Malaria: principles and practice of malariology.* Vol 2. Edinburgh: Churchill Livingstone.

- Moorthy VS**, Imoukhuede EB, Milligan P, Bojang K, Keating S, Kaye P, Pinder M, Gilbert SC, Walraven G, Greenwood BM, Hill AS. (2004)
A Randomised, Double-Blind, Controlled Vaccine Efficacy Trial of DNA/MVA ME-TRAP Against Malaria Infection in Gambian Adults.
Plos Med. 26;1(2):e33
- Mota MM**, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A. (2001)
Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection.
Science. 5;291(5501):141-4.
- Muheki C**, McIntyre D, Barnes KI. (2004)
Artemisinin-based combination therapy reduces expenditure on malaria treatment in KwaZulu Natal, South Africa.
Trop Med Int Health. ;9(9):959-66.
- Mumberg D**, Muller R, Funk M. (1995)
Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds.
Gene. 14;156(1):119-22.
- Murakami Y**, Siripanyapinyo U, Hong Y, Kang JY, Ishihara S, Nakakuma H, Maeda Y, Kinoshita T . (2003)
PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidyl inositol-anchor.
Mol Biol Cell. 14(10):4285-95 Epub 2003
- Murphy SC**, Breman JG. (2001)
Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy.
Am J Trop Med Hyg. ;64(1-2 Suppl):57-67.
- Nash GB**, Cooke BM, Marsh K, Berendt A, Newbold C, Stuart J. (1992)
Rheological analysis of the adhesive interactions of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum.
Blood. 1;79(3):798-807.
- Newton CR**, Kirkham FJ, Winstanley PA, Pasvol G, Peshu N, Warrell DA, Marsh K. (1991)
Intracranial pressure in African children with cerebral malaria.
Lancet. 9;337(8741):573-6.
- Nussenzweig V**, Nussenzweig RS. (1985)
Circumsporozoite proteins of malaria parasites.
Cell. ;42(2):401-3.
- Ockenhouse CF**, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR. (1992)
Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1.
J Exp Med. 1;176(4):1183-9.

- O'Donnell R**, Preiser PR, Williamson DH, Moore PW, Cowman AF, Crabb BS. (2001)
An alteration in concatameric structure is associated with efficient segregation of plasmids in transfected *Plasmodium falciparum* parasites.
Nucleic Acids Res. 1;29(3):716-24.
- Oga A**, Sadamitu D, Hattori Y, Nakamura Y, Kohno M, Kawauchi S, Sasaki K. (2001)
Imported malaria in a Japanese male: an autopsy report.
Pathol Int. ;51(5):371-5.
- Ohishi K**, Kurimoto Y, Inoue N, Endo Y, Takeda J, Kinoshita T. (1996)
Cloning and characterization of the murine GPI anchor synthesis gene *Pigf*, a homologue of the human *PIGF* gene.
Genomics. 15;34(3):340-6.
- Olliaro P.** (2001)
Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs.
Pharmacol Ther. ;89(2):207-19.
- O'Neil-Dunne I**, Achur RN, Agbor-Enoh ST, Valiyaveetil M, Naik RS, Ockenhouse CF, Zhou A, Megnekou R, Leke R, Taylor DW, Gowda DC. (2001)
Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy
Infect Immun. ;69(12):7487-92.
- O'Neill PM**, Bray PG, Hawley SR, Ward SA, Park BK. (1998)
4-Aminoquinolines--past, present, and future: a chemical perspective.
Pharmacol Ther. ;77(1):29-58.
- Orlean P**, Albright C, Robbins PW. (1988)
Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein.
J Biol Chem. 25;263(33):17499-507.
- Orlean P.** (1990)
Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol.;10(11):5796-805.
- Palaeos** Eukarya Glossar
(<http://www.palaeos.com/Eukarya/Lists/EuGlossary/EuGlossary.htm>)
- Palmer RM**, Ferrige AG, Moncada S. (1987)
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.
Nature. 11-17;327(6122):524-6.

- Papakrivos J, Newbold CI, Lingelbach K (2005)**
A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the Plasmodium falciparum cytoadherence molecule PfEMP-1.
*Mol. Microbiol.*55(4):1272-84.
- Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ, Smith DH, Gilles HM. (1976)**
Fetal haemoglobin and malaria.
Lancet. 12;1(7972):1269-72.
- Pasvol G, Clough B, Carlsson J. (1992)**
Malaria and the red cell membrane.
Blood Rev. ;6(4):183-92.
- Pavithra SR, Banumathy G, Joy O, Singh V, Tatu U. (2004)**
Recurrent fever promotes plasmodium falciparum development in human erythrocytes.
J Biol Chem. 2004 5;279(45):46692-9. Epub Aug 31.
- Payne D. (2001)**
All in the blood.
Biologist (London).;48(1):6.
- Peoc'h MY, Gyure KA, Morrison AL. (2000)**
Postmortem diagnosis of cerebral malaria.
Am J Forensic Med Pathol. ;21(4):366-9.
- Perlmann P, Troye-Blomberg M. (2000)**
Malaria blood-stage infection and its control by the immune system.
Folia Biol (Praha).;46(6):210-8.
- Petmitr P, Pongvilairat G, Wilairat P. (1997)**
Large scale culture technique for pure Plasmodium falciparum gametocytes.
Southeast Asian J Trop Med Public Health. ;28(1):18-21.
- Plowe, C. V., J. G. Kublin, and O. K. Doumbo. (1998)**
P. falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and role in clinical resistance to antifolates.
Drug Resist. Updates 1:389-396
- Pu L, Scocca JR, Walker BK, Krag SS. (2003)**
The divergent 5' ends of DPM2 mRNAs originate from the alternative splicing of two adjacent introns: characterization of the hamster DPM2 gene.
*Biochem Biophys Res Commun.*19;312(3):817-24.
- Ray RN, Chatterjea JB, Chaudhuri RN. (1964)**
Observations on the resistance in Hb e Thalassaemia disease to induced infection with Plasmodium vivax.
Bull World Health Organ.;30:51-5.

Redmond, W. B. (1941)

Immunity to human malaria: characteristics of immunity.
p. 231–238. *In* F. R. Moulton (ed.)

A symposium on human malaria with special reference to North America and the Caribbean Region, no. 15. American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C.

Richie TL, Saul A. (2002)

Progress and challenges for malaria vaccines.
Nature. 7;415(6872):694-701.

Ricke CH, Staalsoe T, Koram K, Akanmori BD, Riley EM, Theander TG, Hviid L. (2000)

Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A.
J Immunol. 15;165(6):3309-16.

Ridley, R. G. (1997)

Haemoglobin Degradation and Haem Polymerization as Antimalarial Targets
J. Pharm. Pharmacol. 49 (Suppl. 2): 43-48).

Ridley RG. (2002)

Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs.
Nature. 7;415(6872):686-93.

Ridley, RG. (2003)

Malaria: To kill a parasite
Nature 424, 887 - 889

Riley EM. (2000)

The London School of Hygiene and Tropical Medicine: a new century of malaria research.
Mem Inst Oswaldo Cruz.;95 Suppl 1:25-32.

Robert A, Cazelles J, Meunier B. (2001)

Characterization of the Alkylation Product of Heme by the Antimalarial Drug Artemisinin.
Angew Chem Int Ed Engl. 18;40(10):1954-1957.

Robert-Koch-Institut, (2003, 2006).

RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten -Merkblätter für Ärzte.

Robert-Koch-Institut, (2004).

„Epidemiologisches Bulletin Nr. 22“

Robert-Koch-Institut, (2005).

„Epidemiologisches Bulletin Nr. 35“

Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl. (2003)

© Urban & Fischer

- Rockett** KA, Awburn MM, Rockett EJ, Cowden WB, Clark IA. (1994)
Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression
Parasite Immunol.;16(5):243-9.
- Rogier** C, Commenges D, Trape JF. (1996)
Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations.
Am J Trop Med Hyg. 54(6):613-9.
- Roport** C, Almeida IC, Closel M, Travassos LR, Ferguson MA, Cohen P, Gazzinelli RT. (2001)
Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide.
J Immunol. 1;166(5):3423-31.
- Rosse** WF. (1990)
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and decay-accelerating factor.
Annu Rev Med.;41:431-6.
- Rowe** JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. (1997)
P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1.
Nature. 17;388(6639):292-5.
- Rowe** JA, Kyes SA. (2004)
The role of *Plasmodium falciparum* var genes in malaria in pregnancy.
Mol Microbiol.;53(4):1011-9.
- Rowen** R. J., (2002)
Artemisinin: From Malaria to Cancer Treatment.
Townsend Letter.
- Rush** JS, Waechter CJ. (1995)
Transmembrane movement of a water-soluble analogue of mannosylphosphoryldolichol is mediated by an endoplasmic reticulum protein.
J Cell Biol. 130(3):529-36.
- Ruwende** C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N, et al. (1995)
Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria.
*Nature.*20;376(6537):246-9.
- Samuelson** J, Banarjee S, Magnelli P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW (2005)
The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1;102(5):1548-53. Epub 2005 Jan 21.

- Schares G**, Zinecker CF, Schmidt J, Azzouz N, Conraths FJ, Gerold P, Schwarz RT. (2000)
Structural analysis of free and protein-bound glycosyl-phosphatidylinositols of
Neospora caninum.
Mol Biochem Parasitol. 5;105(1):155-61.
- Sambrook J**, Fritsch EF und Maniatis T (1989)
Molecular cloning, 2nd edition
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. ;74(12):5463-7.
- Schimitschek E.**, Werner G. T. (1985)
Malaria, Fleckfieber, Pest.
Hirzelverlag Stuttgart
- Schmidt A**, Schwarz RT, Gerold P. (1998)
Plasmodium falciparum: asexual erythrocytic stages synthesize two structurally
distinct free and protein-bound glycosylphosphatidylinositols in a maturation-
dependent manner
Exp Parasitol.;88(2):95-102.
- Schneider D**, Shahabuddin M. (2000)
Malaria parasite development in a *Drosophila* model.
Science. 30;288(5475):2376-9.
- Schofield L, Tachado SD.** (1996)
Regulation of host cell function by glycosylphosphatidylinositols of the
parasitic protozoa.
Immunol Cell Biol.;74(6):555-63.
- Schofield L**, Hackett F. (1993)
Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria
parasites.
J Exp Med. 1;177(1):145-53.
- Schofield L**, Vivas L, Hackett F, Gerold P, Schwarz RT, Tachado S. (1993)
Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the
dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*:
prospects for the immunotherapy of severe malaria.
Ann Trop Med Parasitol. ;87(6):617-26.
- Schofield L**, Gerold P, Schwarz RT, Tachado S. (1994)
Signal transduction in host cells mediated by glycosylphosphatidylinositols of
the parasitic protozoa, or why do the parasitic protozoa have so many GPI molecules?
Braz J Med Biol Res.;27(2):249-54.
- Schofield L**, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. (2002)
Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria.
Nature. 15;418(6899):785-9.

- Schofield** L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. (1996)
Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction.
J Immunol. 1;156(5):1886-96.
- Schwarz** M, Thiel C, Lubbehusen J, Dorland B, de Koning T, von Figura K, Lehle L, Korner C. (2004)
Deficiency of GDP-Man:GlcNAc2-PP-dolichol mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ik.
*Am J Hum Genet.*74(3):472-81. Epub 2004 Feb 16.
- Senaud** J, Chobotar B, Scholtyseck E. (1976)
Role of the micropore in nutrition of the Sporozoa. Ultrastructural study of Plasmodium cathemerium, Eimeria ferrisi, E. stiedai, Besnoitia jellisoni, and Frenkelia sp.
Tropenmed Parasitol.;27(2):145-59.
- Shams-Eldin** H (2001)
Klonierung und Charakterisierung eines Gens (GPI-1) der Biosynthese des GPI-Toxins des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*.
Dr. med. vet. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen, 102 pp.
- Shams-Eldin** H, Azzouz N, Kedees MH, Orlean P, Kinoshita T, Schwarz RT. (2002)
The GPII homologue from Plasmodium falciparum complements a Saccharomyces cerevisiae GPII anchoring mutant.
Mol Biochem Parasitol.;120(1):73-81.
- Sharma** CB, Knauer R, Lehle L. (2001)
Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in yeast: the ALG3 gene encodes the Dol-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransferase.
Biol Chem.;382(2):321-8.
- Sharma** YD. (1991)
Knobs, knob proteins and cytoadherence in falciparum malaria.
Int J Biochem.;23(9):775-89.
- Sharma** YD. (1997)
Knob proteins in falciparum malaria.
Indian J Med Res.;106:53-62.
- Singh** C, Srivastav NC, Puri SK. (2004)
Synthesis and antimalarial activity of 6-cycloalkylvinyl substituted 1,2,4-trioxanes.
*Bioorg Med Chem.*15;12(22):5745-52.
- Sinnis** P. (1996)
The malaria sporozoite's journey into the liver.
Infect Agents Dis.;5(3):182-9.

- Sinton, J.A. & Shute, P.G. (1938)**
A report on the longevity of mosquitoes in relation to the transmission of malaria in nature.
Report to the Public Health. Medical Subcommittee, 85. London. Ministry of Health.
- Siveke J, Caselitz J, Püschel K (2001)**
Morphologie und Verlauf der fatalen Malaria tropica.
Rechtsmedizin; 11: 82–88.
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH. (1995)**
Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes.
Cell.14;82(1):101-10.
- Smith TK, Sharma DK, Crossman A, Brimacombe JS, Ferguson MA. (1999)**
Selective inhibitors of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway of *Trypanosoma brucei*.
EMBO J. 1;18(21):5922-30.
- Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K. (1999)**
Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population.
Bull World Health Organ.;77(8):624-40.
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI . (2005)**
The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.
Nature 434: 214-217
- Somner EA, Black J, Pasvol G. (2000)**
Multiple human serum components act as bridging molecules in rosette formation by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.
Blood 15;95(2):674-82.
- Southern EM. (1975)**
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J Mol Biol. 5;98(3):503-17.
- Sprung I, Carnes L, Watt GM, Flitsch SL. (2003)**
Synthesis of novel acceptor substrates for the dolichyl phosphate mannose synthase from yeast.
Chembiochem.4;4(4):319-32.
- Spurway TD, Dalley JA, High S, Bulleid NJ. (2001)**
Early events in glycosylphosphatidylinositol anchor addition. substrate proteins associate with the transamidase subunit *gpi8p*.
J Biol Chem. 11;276(19):15975-82. Epub 2001 Feb 23.

- Stetson CA Jr.** (1966)
The state of hemoglobin in sickled erythrocytes.
J Exp Med. 1;123(2):341-346.
- Stevens VL, Raetz CR.** (1991)
Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants.
J Biol Chem. 5;266(16):10039-42.
- Striepen B, Zinecker CF, Damm JB, Melgers PA, Gerwig GJ, Koolen M, Vliegenthart JF, Dubremetz JF, Schwarz RT.** (1997)
Molecular structure of the "low molecular weight antigen" of *Toxoplasma gondii*: a glucose alpha 1-4 N-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic.
*J Mol Biol.*7;266(4):797-813.
- Suguitan AL Jr, Leke RG, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, Fogako J, Megnekou R, Taylor DW.** (2003)
Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria.
*J Infect Dis.*1;188(7):1074-82. Epub 2003 Sep 23.
- Sullivan AD, Meshnick SR.** (1996)
Haemozoin: Identification and quantification.
Parasitol Today.;12(4):161-3.
- Tachado SD, Schofield L.** (1994)
Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Trypanosoma brucei* regulates IL-1 alpha and TNF-alpha expression in macrophages by protein tyrosine kinase mediated signal transduction.
Biochem Biophys Res Commun. 15;205(2):984-91.
- Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, Schofield L.** (1996)
Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway.
*J Immunol.*1;156(5):1897-1907.
- Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L.** (1997)
Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties.
Proc Natl Acad Sci U S A. 15;94(8):4022-7.
- Tachado SD, Mazhari-Tabrizi R, Schofield L.** (1999)
Specificity in signal transduction among glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp.
Parasite Immunol.;21(12):609-17.

- Takahashi M**, Takeda J, Hirose S, Hyman R, Inoue N, Miyata T, Ueda E, Kitani T, Medof ME, Kinoshita T. (1993)
Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
J Exp Med. 1;177(2):517-21.
- Takahashi M**, Inoue N, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Endo Y, Fujita T, Takeda J, Kinoshita T. (1996)
PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor.
EMBO J. 15;15(16):4254-61.
- Takeuchi O**, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. (2000)
Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway.
J Immunol. 15;164(2):554-7.
- Taliaferro**, W. H. (1949)
Immunity to the malarial infections
p. 941. *In* M. F. Boyd (ed.), *Malariology*. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Tanner W**, Lehle L. (1987)
Protein glycosylation in yeast.
Biochim Biophys Acta. 27;906(1):81-99.
- Thein SL**. (1993)
 β -Thalassaemia.
Bailliere's Clinical Haematol. 6: 151-175
- Thiel C**, Schwarz M, Hasilik M, Grieben U, Hanefeld F, Lehle L, von Figura K, Korner C. (2002)
Deficiency of dolichyl-P-Man:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ig.
Biochem J. 1;367(Pt 1):195-201.
- Thiel C**, Schwarz M, Peng J, Grzmil M, Hasilik M, Bräulke T, Kohlschütter A, von Figura K, Lehle L, Korner C. (2003)
A new type of congenital disorders of glycosylation (CDG-Ii) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis.
J Biol Chem. 20;278(25):22498-505. Epub 2003 Apr 08.
- Thomson**, J. G. (1933)
Immunity in malaria.
Trans R. Soc. Trop Med. Hyg. 26:483-514.

- Tomita S, Inoue N, Maeda Y, Ohishi K, Takeda J, Kinoshita T. (1998)**
A homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Dpmlp is not sufficient for synthesis of dolichol-phosphate-mannose in mammalian cells.
J Biol Chem. 10;273(15):9249-54.
- Tomita M. (1999)**
Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Biochim Biophys Acta. Oct 8;1455(2-3):269-86.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979)**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A.;76(9):4350-4.
- Tracey, J. & Webster, L. (1996)**
Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections.
In J. Hardman, P.Molinoff, R. Rudon & A. Gilman (Eds.)
Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, pp978-1017, New York, Pergamon Press
- Trager W, Jensen JB. (1976)**
Human malaria parasites in continuous culture.
*Science.*20;193(4254):673-5.
- Trager W, Jensen JB. (1997)**
Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: its impact on malaria research.
Int J Parasitol.;27(9):989-1006.
- Trape JF, Rogier C. (1996)**
Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission.
Parasitol Today.;12(6):236-40.
- Varki A. (1993)**
Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.
Glycobiology.;3(2):97-130.
- Varki, Cummings, Esko, Marth, Hart und Freeze (eds). (1999)**
The essentials of Glycobiology
Cold Spring Harbor Press; ISBN 0879695595
- Vennerstrom JL, Arbe-Barnes S, Brun R, Charman SA, Chiu FC, Chollet J, Dong Y, Dorn A, Hunziker D, Matile H, McIntosh K, Padmanilayam M, Santo Tomas J, Scheurer C, Scorneaux B, Tang Y, Urwyler H, Wittlin S, Charman WN. (2004)**
Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate.
*Nature.*19;430(7002):900-4.
- Venzmer G.**
Geisseln der Tropen
Kosmos, Franckhsche Verlagshandlung, Stuttgart 1928

- Vidugiriene J, Menon AK. (1993)**
Early lipid intermediates in glycosyl-phosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer.
J Cell Biol. 121(5):987-96
- Vidugiriene J, Menon AK. (1994)**
The GPI anchor of cell-surface proteins is synthesized on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum.
J Cell Biol. 127(2):333-41
- Vijaykumar M, Naik RS, Gowda DC. (2001)**
Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis.
J Biol Chem. 9;276(10):6909-12. Epub 2001 Jan 10.
- Vishwakarma RA, Menon AK. (2005)**
Flip-flop of glycosylphosphatidylinositols (GPI's) across the ER.
Chem Commun (Camb). 28; (4):453-5. Epub. 2004
- Walker DJ, Pitsch JL, Peng MM, Robinson BL, Peters W, Bhisutthibhan J, Meshnick SR. (2000)**
Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen Plasmodium yoelii.
Antimicrob Agents Chemother. 44(2):344-7.
- Walter PR, Garin Y, Blot P. (1982)**
Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study.
Am J Pathol. ;109(3):330-42.
- Wang P, Wang Q, Sims PF, Hyde JE. (2002)**
Rapid positive selection of stable integrants following transfection of Plasmodium falciparum.
Mol Biochem Parasitol. 7;123(1):1-10.
- Ware FE, Lehrman MA. (1998)**
Expression cloning of a novel suppressor of the Lec15 and Lec35 glycosylation mutations of Chinese hamster ovary cells.
J Biol Chem. 22;273(21):13366.
- Warrell DA. (1997)**
Cerebral malaria: clinical features, pathophysiology and treatment.
Ann Trop Med Parasitol.;91(7):875-84.
- Warrell DA. (1999)**
Management of severe malaria.
Parassitologia.;41(1-3):287-94.

- Watanabe R**, Murakami Y, Marmor MD, Inoue N, Maeda Y, Hino J, Kangawa K, Julius M, Kinoshita T. (2000)
Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2.
*EMBO J.*15;19(16):4402-11.
- Weatherall DJ**, Clegg JB. (2001)
Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem.
Bull World Health Organ.;79(8):704-12.
- Weatherall DJ**, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ. (2002)
Malaria and the red cell.
Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).:35-57.
- White**, NJ und Ho M. (1992)
The pathophysiology of malaria.
Adv Parasitol. 31: 83-173
- White** NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, Kokwaro G, Ouma J, Hien TT, Molyneux ME, Taylor TE, Newbold CI, Ruebush TK 2nd, Danis M, Greenwood BM, Anderson RM, Olliaro P. (1999)
Averting a malaria disaster.
*Lancet.*5;353(9168):1965-7.
- White** NJ. (1997)
Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo.
Antimicrob Agents Chemother.;41(7):1413-22.
- White** N. (1999)
Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 29;354(1384):739-49.
- Wichmann** O, Loscher T, Jelinek T. (2003)
Fatal malaria in a German couple returning from Burkina Faso.
Infection.;31(4):260-2.
- World Health Organization** (1990)
Severe and complicated malaria
(2nd edn). *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 84 (suppl 2): 1–65.
- World Health Organization** (2003)
“Africa Malaria Report”
- World Health Organization** (2004)
“What is Malaria?”, “Children and Malaria”, “Facts on Acts”
RBM Infosheets
- World Health Organization** (2006; 2007)
“What is Malaria?” Infoblätter

- Yamada N**, Miyata T, Maeda K, Kitani T, Takeda J, Kinoshita T. (1995)
Somatic mutations of the PIG-A gene found in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Blood. 15;85(4):885-92.
- Yamamoto M**, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K, Akira S. (2004)
Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta.
Nature. 8;430(6996):218-22.
- Yapo Ette**, H. M.D.; Koffi, K. M.D.; Botti, K. M.D.; Jouvét, A. M.D.; Effi, A. B. M.D.; Honde, M. M.D. (2002)
Sudden Death Caused by Parasites: Postmortem Cerebral Malaria Discoveries in the African Endemic Zone.
American Journal of Forensic Medicine & Pathology. 23(2):202-207.
- Yeung S**, Pongtavornpinyo W, Hastings IM, Mills AJ, White NJ. (2004)
Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices.
Am J Trop Med Hyg.;71(2 Suppl):179-86.
- Zimmerman JW**, Specht CA, Cazares BX, Robbins PW. (1996)
The isolation of a Dol-P-Man synthase from *Ustilago maydis* that functions in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast. 30;12(8):765-71.
- Zimmerman PA**, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Boatman BA, Kazura JW. (1999)
Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea.
Proc Natl Acad Sci U S A. 23;96(24):13973-7.
- Zinecker CF**, Striepen B, Tomavo S, Dubremetz JF, Schwarz RT. (1998)
The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides.
Mol Biochem Parasitol. 30;97(1-2):241-6.
- Zitzmann N**, Mehlert A, Carrouée S, Rudd PM, Ferguson MA, Carrouée S. (2000)
Protein structure controls the processing of the N-linked oligosaccharides and glycosylphosphatidylinositol glycans of variant surface glycoproteins expressed in bloodstream form *Trypanosoma brucei*.
Glycobiology.;10(3):243-9.

8. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe Parasitologie durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R.T. Schwarz für die Möglichkeit, unter seiner Leitung promovieren zu können, für zahlreiche Korrekturen und anregende Diskussionen.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Hosam Shams-Eldin, der mir viele Methoden Molekularbiologischen Arbeitens beibrachte und darüber hinaus auch großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit trägt.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe Parasitologie danke ich für gutes Arbeitsklima, Hilfe und Beratung.

Herrn Prof. Dr. Klenk danke ich für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei meinem Onkel, Dr. Arnulf Dorn bedanken. Er hat unermüdlich korrigiert und mir einige seiner Abbildungen zur Verfügung gestellt.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Germán Horn, der mir sehr bei der Durchführung einiger Experimente geholfen hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und Freunden, die mich stets „seelisch und moralisch“ unterstützt haben.

9. LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Caroline Julia Marlies Dorn

Anschrift: Brauhausstr.14, 36043 Fulda

Geburtsdatum: 28.08.1979

Geburtsort: Würzburg

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Konfession: katholisch

Eltern: Vater: Dr. Klaus Dorn, Hochschuldozent für Katholische Theologie an der Philipps-Universität Marburg

Mutter: Ursula Dorn, MA der Kunstgeschichte und der Europäischen Ethnologie, Geschäftsführerin der Gesellschaft für Christlich-Jüdische Zusammenarbeit Marburg

Geschwister: Philipp Dorn, 23 Jahre, Produktdesign-Student an der FH Hannover

Schulbildung:

1986-1990 Grundschule Brüder-Grimm in Marburg

1990-1999 Gymnasium Elisabethschule Marburg

1999 Allgemeine Hochschulreife, Note sehr gut (1,3)

Hochschulausbildung:

1999-2006 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

Facharztausbildung:

Seit 09/2006 in der Weiterbildung zur Internistin in der Medizinischen Klinik II; Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie, Diabetologie, Infektiologie am Klinikum Fulda

Dissertation:

„Konstruktion und Charakterisierung einer Mutante des GPI-Biosyntheseweges von *Plasmodium falciparum*“, eingereicht im Dezember 2007

Prüfungen:

- 2001 Ärztliche Vorprüfung, Note gut (2,33)
- 2002 1. Staatsexamen, Note befriedigend (3)
- 2004 2. Staatsexamen, Note gut (1,66)
- 2006 3. Staatsexamen, Note sehr gut (1)

Praktika:

- Krankenpflegepraktikum: 02-03/2000 Internistische Abteilung Diakoniekrankenhaus
Marburg-Wehrda
- 08-09/2000 Früh- und Neugeborenenstation der
Universitätskinderklinik Marburg
- Seminar Medizinische Parasitologie 11/2007 am Missionsärztlichen Institut Würzburg

Famulaturen:

1. Notfall-Ambulanz des Rhein/Main-Flughafens Frankfurt
2. Alman Hastanesi- Deutsches Krankenhaus Istanbul, Pädiatrie
3. Marien-Krankenhaus Amberg, Abteilung für Innere Medizin
4. Medizinische Mikrobiologie, Parasitologie

Praktisches Jahr:

- Innere Medizin: Klinikum Fulda 04-08/2005
- Chirurgie: Klinikum Fulda 08-11/2005
- Kinder- und Jugendheilkunde: Universitätskinderklinik Marburg 11/05-03/06

Fremdsprachenkenntnisse:

- Englisch (Abschluss: Abitur)
- Französisch (Abschluss: Abitur)
- Latein (Abschluss: Latinum)
- Spanisch
- Türkisch (Grundkenntnisse)

Auslandsaufenthalte:

- USA-Austausch März/April 1996
- Frankreich Austausch Sommer 1993, 1994, 1995, 1998

Israel-Austausch Herbst 1998, 1999

Famulatur in Istanbul Oktober 2002

Interessen:

Freunde treffen, reisen, lesen, Klavier spielen, Volleyball spielen, Sprachkurse

Weitere Tätigkeiten:

Teilnahme am Musikwettbewerb „Jugend musiziert“ im Fach Klavier 1996

Ehrenamtliche Mitbetreuung israelischer und deutscher Schüler beim Israel-Austausch im Herbst 1999

Tutorin für Erstsemester des Medizinstudiums SS 2000, WS 2000/2001

Studentische Hilfskraft im Kurs für Neuroanatomie 2000/2001

Ehrenamtliche Mitbetreuung einer Jugendfreizeit der Katholischen Jungen Gemeinde (KjG) in Schweden Sommer 2003

Mitbetreuung des Mikrobiologischen Praktikums für Biologen im Fach Parasitologie 2005

10. ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Konstruktion und Charakterisierung einer Mutante des GPI-Biosyntheseweges von *Plasmodium falciparum* im Medizinischen Zentrum für Hygiene und medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Schwarz mit Unterstützung durch Dr. Shams-Eldin ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ergebnisse vorliegender Arbeit werden unter dem Titel „The malaria parasite *Plasmodium falciparum* represents a new class in the clade of dolichol phosphate mannose synthase enzymes“ von Shams-Eldin H, Santos de Macedo C, Niehus S, Dorn C, Azzouz N, Schwarz RT veröffentlicht.

Marburg, den 4.12.2007

(Caroline Julia Marlies Dorn)

11. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

a) in Marburg:

Albert, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behr, Beyer, Berndt, Bertalanffy, Bien, Czubayko, Daut, Dobbelstein, Doss, Ebel, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Folz, Garten, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Grimm, Griss, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Happle, Hasilik, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Herzum, Hesse, Höffken, Hörsch, Hörle, Hofbauer, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kann, Kern, Kim-Berger, Klaus, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kühnert, Kuhlmann, Lang, Lange, Lill, Lohoff, Mann, Maisch, Martin, Maier, Mennel, Moll, Moosdorf, Mutters, Neubauer, Oertel, Paul, Prinz, Radsak, Renschmidt, Renz, Restrepo, Richter, Riera, Röhm, Roth-Dobbelstein, Romminger, Rothmund, Schäfer, Schepelmann, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schrader, Schreiber, Schwarz, Seyberth, Sekundo, Slenczka, Sturm, Stempel, Suske, Tebbe, Vogelmeier, Voigt, von Knobloch, Westermann, Wagner, Wahl, Weihe, Werner, v. Wichert, Wilke, Wulf, Zemlin, Zwiorek

b) in Fulda:

Arps, Berkhoff, Bonzel, Conze, Dietl, Distelrath, Draf, Fassbinder, Greim, Günther, Heim, Hellinger, Hertel, Höffkes, Jaspersen, Langeheinecke, Manke, Meissel, Müller, Plappert, Ranze, Repp, Roth, Rüttger, Schoppet, Seipel, Steegmann, Wagner, Walther, Weber, Wessinghage, Witzleb, Wörsdörfer, Ziehe